

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DEL CATÁN (*Atractosteus spatula*)
COMO ESPECIE MONITORA DE CONTAMINACIÓN
UTILIZANDO BIOINDICADORES BIOQUÍMICOS**

POR

M.C. JULIO CÉSAR CRUZ VALDEZ

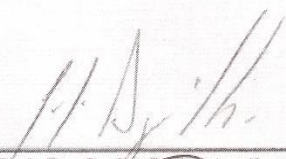
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA
SILVESTRE Y DESARROLLO SUSTENTABLE**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

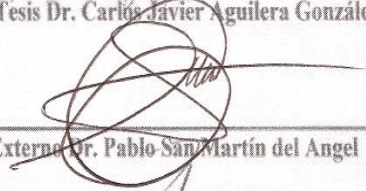
MARZO 2011

EVALUACIÓN DEL CATÁN (*Atractosteus spatula*) COMO ESPECIE
MONITORA DE CONTAMINACIÓN UTILIZANDO BIOINDICADORES
BIOQUÍMICOS

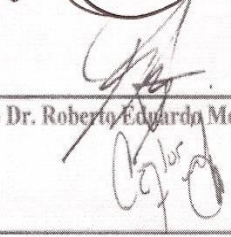
Comité de Tesis



Director de Tesis Dr. Carlos Javier Aguilera González



Director Externo Dr. Pablo San Martín del Ángel



Secretario Dr. Roberto Eduardo Mendoza Alfaro

Vocal Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna



Vocal Dra. María Adriana Núñez González



Vocal Dr. Roberto Mercado Hernández

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Página
Lista de tablas.....	6
Lista de figuras.....	8
Lista de abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 ANTECEDENTES.....	17
2.1 Especies centinela para el monitoreo ambiental.....	17
2.2 Características del catán como especie centinela.....	19
2.3 Bioindicadores bioquímicos de contaminación.....	22
3 HIPÓTESIS.....	30
4 JUSTIFICACIÓN.....	31
5 OBJETIVO.....	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Organismos experimentales.....	33
6.2 Condiciones experimentales.....	33
6.2.1 Expresión de bioindicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán.....	33
6.2.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades.....	36
6.2.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías.....	38
6.3 Análisis de los indicadores bioquímicos de contaminación.....	41
6.3.1 Elaboración de extractos.....	41
6.3.2 Obtención de la fracción microsomal en extractos de hígado.....	41
6.3.3 Determinación de la concentración de proteína en los extractos..	42
6.3.4 Cuantificación de vitelogenina (VTG).....	43
6.3.5 Evaluación de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y	

butirilcolinesterasa (BChE).....	46
6.3.6 Evaluación de la actividad de carboxilesterasa (CaE).....	46
6.3.7 Evaluación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) y fosfatasa ácida (ACP).....	47
6.3.8 Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	48
6.3.9 Evaluación de la actividad de Glutación-s-transferasa (GST).....	50
6.3.10 Evaluación del Citocromo P450 (CYP1A).....	51
6.3.10.1 Proteínas del CYP1A por inmunodifusión.....	51
6.3.10.2 Proteínas del Citocromo P450 por Electroforesis.....	51
6.3.10.3 Proteínas del CYP1A por Western Blot	52
6.3.10.4 Evaluación de la actividad enzimática del CYP1A Etoxiresorufin o-deetilasa (EROD).....	53
6.3.10.5 Análisis de la expresión genética del CYP1A.....	54
6.4 Análisis estadístico.....	56
7 RESULTADOS.....	57
7.1 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán.....	57
7.1.1 Vitelogenina (VTG).....	57
7.1.2 Esterasas: acetilcolinesterasa (AChE).....	59
7.1.3 Esterasas: butirilcolinesterasa (BChE).....	60
7.1.4 Esterasas: carboxilesterasa (CaE).....	61
7.1.5 Fosfatasa alcalina (ALP).....	62
7.1.6 Fosfatasa ácida (ACP).....	63
7.1.7 Superóxido Dismutasa (SOD).....	64
7.1.8 Glutación-s-transferasa totales (GSTt).....	65
7.1.9 Citocromo P450 (CYP1A).....	66
7.1.9.1 Inmunodifusión.....	66
7.1.9.2 Actividad enzimática EROD del CYP1A.....	68
7.1.9.3 Expresión del mRNA CYP1A.....	70
7.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades.....	72
7.2.1 Vitelogenina (VTG).....	72
7.2.2 Esterasas: acetilcolinesterasa (AChE).....	73

7.2.3 Esterasas: butirilcolinesterasa (BChE).....	75
7.2.4 Esterasas: carboxilesterasa (CaE).....	76
7.2.5 Fosfatasa alcalina (ALP).....	78
7.2.6 Fosfatasa ácida (ACP).....	79
7.2.7 Superóxido Dismutasa (SOD).....	80
7.2.8 Glutación-s-transferasa totales (GSTt).....	81
7.2.9 Citocromo P450 (CYP1A).....	83
7.2.9.1 Actividad enzimática EROD del CYP1A.....	83
7.2.9.2 Proteínas del Citocromo P450 por Electroforesis.....	83
7.2.9.3 Proteínas del CYP1A por Western Blot.....	86
7.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías.....	87
7.3.1 Vitelogenina (VTG).....	87
7.3.2 Acetilcolinesterasa (AChE).....	88
7.3.3 Butirilcolinesterasa (BuChE).....	90
7.3.4 Carboxilesterasa (CaE).....	91
7.3.5 Fosfatasa alcalina (ALP).....	93
7.3.6 Superóxido dismutasa (SOD).....	94
7.3.7 Glutación-s-transferasa GSTm.....	95
7.4 Relaciones entre el tipo de contaminante y la respuesta conjunta de los diferentes indicadores bioquímicos utilizados.....	97
7.4.1 Compuestos estrogénicos (E2).....	97
7.4.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (β -naftoflavona [H]).....	103
7.4.3 Plaguicidas organofosforados (diazinon [OP]).....	107
8 DISCUSIÓN.....	110
8.1 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán.....	110
8.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades.....	122
8.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías.....	125
8.4 Relaciones entre el tipo de contaminante y la respuesta conjunta de	

los diferentes indicadores bioquímicos utilizados.....	127
9 CONCLUSIONES.....	135
10 LITERATURA CITADA.....	137
APÉNDICES.....	151
Apéndice A. Publicaciones originadas de la tesis.....	151
Apéndice B. Congresos Internacionales.....	152

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Tejidos analizados para cada uno de los xenobióticos evaluados.....	36
2.	Xenobióticos evaluados en cada grupo de edad de los catanes.....	37
3.	Xenobióticos evaluados mediante diferentes vías de exposición.....	40
4.	Curva estándar de SOD.....	49
5.	Secuencias y datos técnicos de los oligonucleótidos utilizados (Zapata, 2002).....	55
6.	Concentración promedio de vitelogenina en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos.....	58
7.	Actividad tipo carboxilesterasa (CaE) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos.....	62
8.	Actividad tipo fosfatasa alcalina (ALP) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos.....	63
9.	Actividad tipo fosfatasa ácida (ACP) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos.....	64
10.	Concentración promedio de vitelogenina en hígado de catanes de diferentes edades.....	73
11.	Actividad acetilcolinesterasa (AChE) en hígado de catanes de diferentes edades.....	74
12.	Actividad butirilcolinesterasa (BChE) en hígado de catanes de diferentes edades.....	76
13.	Actividad carboxilesterasa (CaE) en hígado de catanes de diferentes edades.....	77
14.	Actividad fosfatasa alcalina (ALP) en hígado de catanes de diferentes edades.....	79
15.	Actividad fosfatasa ácida (ACP) en hígado de catanes de diferentes edades.....	80
16.	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado de catanes de diferentes edades.....	81
17.	Actividad glutatión-s-transferasa (GST) en hígado de catanes de diferentes edades.....	82
18.	Valores de concentración de proteína expresados como porcentaje de intensidad de banda en los carriles correspondientes a las muestras de los tratamientos evaluados y posteriormente analizados en gel de electroforesis.....	84
19.	Concentración de vitelogenina (VTG) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.....	88
20.	Actividad acetilcolinesterasa (AChE) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.....	89
21.	Actividad butirilcolinesterasa (BChE) en hígado de	

	catanes expuestos por diferentes vías.....	91
22.	Actividad carboxilesterasa (CaE) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.....	92
23.	Actividad fosfatasa alcalina (ALP) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.....	94
24.	Actividad superoxido dismutasa (SOD) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.	95
25	Actividad superoxido glutatión s transferasa microsomal (GSTm) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Tolerancia de especies de lepisosteidos a la contaminación (página de la U.S. Environmental Protection Agency).....	19
2.	Especificidad de los bioindicadores de acuerdo a distintos efectos fisiológicos causados por compuestos contaminantes.....	25
3.	Concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en ppm en catanes silvestres de Tamaulipas y Nuevo León (García <i>et al.</i> , 2009).....	27
4.	Canaletas de 500 litros utilizadas en el bioensayo.....	34
5.	a) Aplicación de los tratamientos respectivos mediante inyección intraperitoneal; b) obtención de muestras detejidos.....	35
6.	Contenedores de plástico cubiertos con bolsas de polietileno.....	40
7.	Acuarios de 60 galones donde fueron distribuidos los catanes en sus respectivos tratamientos.....	40
8.	Esquema del ELISA competitivo.....	45
9.	Concentración promedio de vitelogenina en diversos tejidos evaluados de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos de forma directa.....	58
10.	Actividad promedio de acetilcolinesterasa en hígado de catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.....	59
11.	Actividad promedio de butirilcolinesterasa en hígado de catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.....	60
12.	Actividad promedio de SOD en catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.....	65
13.	Actividad promedio de GST _t en catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.....	66
14.	Inmunodifusión doble en geles de agarosa al 1% con las muestras de los catanes expuestos a los distintos tratamientos.....	67
15.	Fotografía del espectro de absorbancia a 482 nm mostrando la presencia del sustrato 7-ethoxyresorufin utilizado para determinar la actividad EROD en las muestras microsomales de catanes y tilapia.....	68
16.	Fotografía de las cubetas correspondientes a las muestras microsomales de hígado de tilapia (C+), y las cubetas correspondientes a las muestras microsomales de hígado de catán (H).....	69
17.	a) Pico de absorbancia a 572 nm correspondiente al producto de la actividad EROD (resorufin) en las muestras microsomales de tilapia inducida con β -naftoflavona; b) Barrido espectrofotométrico a 572 nm en las muestras	

microsomales de catán	69
18. Fotografía del gel de agarosa mostrando las bandas de RNA obtenido de las muestras de hígado de catán expuesto a β -naftoflavona (H), catán control (C) y tilapia expuesta a β -naftoflavona (C+).....	70
19. Fotografía de geles de agarosa mostrando los productos de las reacciones de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para tilapia.....	71
20. Fotografía del gel de electroforesis donde se muestra la separación de proteínas en las muestras microsomales de hígado en los catanes de 6 meses de los distintos tratamientos.....	85
21. a) Fotografía del gel de poliacrilamida donde se observa la separación de proteínas en muestras microsomales de hígado de catanes correspondientes a los distintos tratamientos evaluados; b) Membrana correspondiente al análisis de Western-Blot donde se observa la ausencia de bandas correspondientes a la proteína del CYP1A.....	86
22. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a E2.....	98
23. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 12 meses con exposición directa a E2.....	99
24. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a E2.....	100
25. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a E2 a través del medio acuático.....	101
26. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a E2 a través del alimento.....	102
27. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto).....	103
28. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 12 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto)...	104
29. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto)....	105
30. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a naftoflavona (naphto) a través del medio acuático.....	106
31. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a diazinon.....	107
32. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a diazinon.....	108
33. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a diazinon a través del alimento.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

HAP:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
CYP450:	Citocromo P-450
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR:	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
PCB=BPC:	Bifenilos policlorados
EPA:	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
IP:	Intraperitoneal
UV:	Ultravioleta
VIS:	Visible
A,C,G,T,U:	Adenina, citosina, guanina, timina, uracilo
min.	Minutos
nm:	Nanometro
V:v:	Volumen-volumen
OD:	Densidad óptica
H=BNF:	β -naftoflavona
E2:	17 β -estradiol
OP:	Diazinón (compuesto organofosforado)
i.a./L:	Ingrediente activo por litro
ng vtg:	Nanogramos de vitelogenina
CYP1A1:	Citocromo P450 subfamilia 1A1
Pb:	Pares de bases
CB:	Carbamatos
CDNB:	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DTNB:	Acido ditionitrobenzoico
EC:	Enzyme Comission (número asignado a cada enzima)
GPx:	Glutación peroxidasa
PBS:	Amortiguador salino fosfatado
Naphto.:	Naftoflavona
Vmax:	Velocidad máxima
Δ Abs:	Valor obtenido de la absorbancia final menos la absorbancia inicial en una reacción enzimática

RESUMEN

El catán (*Atractosteus spatula*) es una especie nativa en la vertiente del Golfo de México para la cual se ha logrado desarrollar una tecnología para su cultivo. Esta especie posee características potenciales para ser utilizada como monitora de contaminación, destacando su resistencia a condiciones extremas de temperatura, oxígeno y salinidad, sus hábitos bentónicos, así como la posición que ocupa en la red trófica. Actualmente, dentro de los bioindicadores de contaminación más utilizados destacan los bioquímicos y en particular diversas enzimas. Así, se utilizan comúnmente enzimas del tipo esterasas que son afectadas por plaguicidas, al igual que enzimas de detoxificación como: etoxi-resorufina-o-desetilasa (EROD), glutatión-s-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD), las que son afectadas por diversos contaminantes. Por otra parte, la síntesis de vitelogenina (VTG) es utilizada como indicador del efecto de compuestos estrogénicos, presentes en desechos industriales y urbanos y la expresión del gen CYP1A, que codifica para proteínas del citocromo P450, ha sido ampliamente utilizada para detectar derivados de petróleo. Considerando lo anterior, el presente estudio fue orientado a evaluar la respuesta y sensibilidad de bioindicadores bioquímicos en catanes cultivados expuestos a diferentes tipos de contaminantes. Para este efecto, se realizaron bioensayos con catanes de 6, 12 y 24 meses. Se evaluaron los compuestos naftoflavona (H); diazinon (OP); estradiol (E2) y aceite de pescado (FO) como control, administrados mediante inyección intraperitoneal, a través del alimento ó a través del medio acuático. Se obtuvieron muestras de hígado, branquias, plasma y mucus para evaluar los bioindicadores carboxilesterasa (CaE); acetilcolinesterasa (AChE); butirilcolinesterasa (BChE); EROD; GST; SOD; fosfatasa alcalina (ALP); fosfatasa ácida (ACP) síntesis de VTG; proteínas y la expresión de mRNA del CYP1A. La actividad enzimática CaE, AChE, BChE, ALP, ACP, EROD, SOD y GST se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando sustratos artificiales. La VTG se determinó mediante un inmunoensayo (ELISA). Las proteínas del CYP1A fueron evaluadas mediante electroforesis, inmunodifusión y western blot. El mRNA CYP1A fue evaluado mediante PCR con oligonucleótidos desarrollados para Tilapia. El hígado presentó la mayor respuesta al considerar los bioindicadores analizados. Los catanes de seis meses resultaron más susceptibles a los contaminantes, presentando efectos neurotóxicos con los tres compuestos evaluados. La actividad de las esterasas AChE, BChE y CaE disminuyó en catanes expuestos a OP. La actividad ALP aumentó en los catanes expuestos a E2 y OP, mientras que la ACP no presentó variaciones. La actividad de SOD aumentó en catanes de 6 meses tratados con E2, OP y H, así como en catanes de 12 meses tratados con E2. La actividad de GST generalmente fue más baja en catanes tratados con E2, H y OP. La síntesis de VTG fue asociada solo en catanes expuestos a E2. No fue posible detectar actividad EROD, proteínas ó mRNA del CYP1A en ninguna muestra de catán. La incorporación de contaminantes a través del alimento incrementó la respuesta de los bioindicadores. El sistema de defensa contra radicales libres representa un mecanismo primario contra contaminantes en los catanes, como lo sugiere el incremento de la SOD y la reducción simultánea de la GST ante hidrocarburos, organofosforados y estrogénicos. Las variaciones de estos bioindicadores en el catán confirman su potencial como especie monitora de contaminación.

ABSTRACT

The alligator gar (*Atractosteus spatula*) is the largest fish inhabiting the rivers draining into the Gulf of Mexico and at the present the technology for its culture has already been developed. Alligator gar provides several advantages as sentinel species, as a result of their ability to grow in waters of variable quality, the fact that most of the time they thrive in the bottom and their top position in the food web. Nowadays, several molecules are being used as biochemical biomarkers in fishes, among these the activity of enzymes like esterases undergo variations when organisms are exposed to pesticides. On the other hand, glutathione s-transferase (GST) superoxide dismutase (SOD) and 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) are popular due to their role in detoxification and other molecules like vitellogenin (VTG) is considered regular tools for testing endocrine-disrupting Chemicals. Another useful biomarker is the expression of the CYP1A gen which play an important role as the main detoxification enzymatic system for PAHs in teleostean fishes. Therefore, the present research was aimed to evaluate the sensitivity of this sort of biomarkers of pollution in cultured alligator gar. Undifferentiated juveniles of 6, 12 and 24 months were exposed to an hydrocarbon compound (H); an organophosphate pesticide (OP); an estrogenic compound (E2); and fish oil as control (FO) by different pathways, such as direct exposure (by intraperitoneal injection), feed and added to the water. In order to evaluate the biomarkers samples of liver, plasma, gills and mucus were taken. Enzymatic activities (CaE, AChE, ACP, GST, SOD and EROD) were determined spectrophotometrically. Measurement of Vtg was performed by an ELISA. Proteins of CYP1A were determined by electrophoresis, immunological reactions in gels and by western blot. The mRNA CYP1A was evaluated by rt-PCR using primers designed for *Oreochromis niloticus*. The highest response of the biomarkers was observed in liver tissue. Alligator gar of 6 months resulted most sensitive to pollutants. The activities of AChE, BChE y CaE were significantly lower in those individuals treated with OP. ALP activity was higher in fish treated with E2 and OP, ACP activity didn't vary between the treatments. SOD activity was higher in gars of 6 months treated with E2, H and OP, in contrast SOD was high only in 12 months gars treated with E2. GST activity was generally lower in gars treated with E2, H and OP. Presence of VTG in the evaluated tissues was only associated to gars exposed to E2. EROD activity and proteins or mRNA of CYP1A were not registered in any sample. The response of biomarkers was higher when gars were exposed through the food pathway, specially with E2. The biomarkers evaluated turn out to be useful indicators of pollution in cultured juvenile alligator gars and this species can be used for environmental monitoring.

1 INTRODUCCIÓN

La República Mexicana cuenta con aproximadamente 11,592.77 km de litoral, 1,567,300 hectáreas están cubiertas por estuarios, correspondiendo 892,800 ha al Pacífico y 674,500 ha al Golfo de México (INEGI, 1984; Contreras, 1993). Dentro de los océanos y mares del país el Golfo de México destaca por su gran productividad (Gore, 1992). Las escorrentías de los ríos y la mezcla de agua provocada por el viento son dos de los principales factores que afectan la productividad de las poblaciones de peces en las áreas tropicales y subtropicales tales como el Golfo de México (Lloret *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, el Golfo de México es una de las principales regiones productoras de petróleo del mundo, lo que en repetidas ocasiones ha generado consecuencias ambientales negativas debido al vertido de los desechos de esta industria (Hanna & Blough, 2000), así como por el resultado de sus actividades secundarias principalmente la refinación, el transporte, y el almacenamiento.

La productividad biológica de las zonas costeras es compartida con actividades de la industria petrolera en algunas regiones del mundo; tal es el caso de México, donde la producción de petróleo en la plataforma continental alcanza volúmenes considerables (San Martín, 2006). Por ello, las pesquerías del Golfo de México han estado sujetas a una contaminación crónica, así como a derrames de petróleo intermitentes por muchos años. Los ecosistemas acuáticos del interior de México igualmente se han visto continuamente afectados por diversos contaminantes producidos por actividades humanas tales como la agricultura y diversos procesos industriales, por lo cual algunos compuestos químicos como pesticidas

organoclorados, organofosforados y metales pesados, se han registrado en cuerpos de agua dulce (Volke y Velasco, 2002).

En muchas regiones de México, y Estados Unidos, el catán representa un importante recurso pesquero, y alimenticio, además de ser utilizado en la pesca deportiva (Mendoza *et al.*, 2008). Debido a sus hábitos alimenticios como depredadores y carroñeros, ayuda a mantener el balance ecológico en los ecosistemas que habita. Es importante resaltar que el catán es una especie pancrónica, que ha sobrevivido con pocos cambios a través de millones de años, lo que significa que posee características de resistencia y adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, lo cual puede ser aprovechado para ser utilizada como especie monitora de contaminación ambiental, tanto en ecosistemas de agua dulce como de agua salobre (Aguilera *et al.*, 2010).

Contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorinados (BPCs), plaguicidas organofosforados, carbamatos y otros compuestos con características de disruptores endócrinos (compuestos capaces de causar una disrupción del sistema de control endócrino en organismos acuáticos o terrestres) han sido localizados en muchos ecosistemas acuáticos nacionales como producto de las actividades urbanas, agrícolas e industriales. Este tipo de compuestos pueden ser absorbidos por los organismos acuáticos de forma directa a través de las branquias o piel, por ingestión de partículas suspendidas o al consumir alimento contaminado en una cadena trófica, lo cual puede resultar en la biomagnificación de los contaminantes (Corbella, 1998). Las moléculas que constituyen estos compuestos son altamente lipofílicas, por lo que pueden penetrar fácilmente las células. Los efectos iniciales de los xenobióticos (compuestos externos que alteran la fisiología de

los organismos) al entrar al organismo se producen al interactuar con moléculas endógenas y pueden ser divididos en tres grupos:

- a) Los xenobióticos pertenecientes al primer grupo son compuestos hidrófobos y pueden ser secuestrados y neutralizados en la fracción lipídica de los organismos acuáticos o terrestres.
- b) Los xenobióticos del segundo grupo, pueden unirse específicamente a algunas moléculas celulares, por ejemplo el DDT se puede unir a los receptores estrogénicos y producir efectos feminizantes en juveniles y machos (Harrison *et al.*, 1995; Kupfer, 1995; Gimeno *et al.*, 1996).
- c) En el tercer grupo, los xenobióticos pueden interactuar con enzimas de detoxificación o biotransformación. Estas enzimas habitualmente metabolizan los contaminantes convirtiéndolos en compuestos hidrofílicos no reactivos, los que son mas fáciles de excretar, o bien pueden convertirlos en metabolitos reactivos, que pueden resultar más tóxicos que los compuestos originales (Hayes *et al.*, 2005).

Con la finalidad de evaluar los efectos que tienen los contaminantes en los organismos se utilizan indicadores biológicos, los cuales se definen como medidas de fluidos corporales, células, tejidos u otras variables bióticas que indican la presencia y magnitud de una respuesta ocasionada por un estresor. Los sistemas bioquímicos y genéticos de homeostasis en peces pueden variar en cuestión de minutos u horas en respuesta al estímulo de un estresor, por lo tanto, estos indicadores poseen una alta relevancia toxicológica. De aquí, que las tecnologías genómicas y proteómicas hayan adquirido un gran interés para los toxicólogos ambientales, debido al gran potencial que tienen para identificar los modos de acción de los xenobióticos, volviéndose

herramientas valiosas en la evaluación del riesgo para los ecosistemas acuáticos (Corbella, 1998; San Martín, 2006).

Por otra parte, los métodos inmunológicos son procedimientos analíticos cualitativos de “screening” (para detectar presencia o ausencia de xenobióticos), o procedimientos cuantitativos precisos. La especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo provee una técnica altamente sensible. Estas características le confieren a los métodos inmunológicos una gran ventaja al ser utilizados en la evaluación de bioindicadores de contaminación en organismos acuáticos (Romano, 1999). Considerando lo anterior, es evidente la necesidad de realizar estudios para evaluar técnicas bioquímicas, moleculares e inmunológicas, que permitan detectar e incluso predecir los efectos de diversos contaminantes en la fauna y flora de los sistemas lagunares costeros y de agua dulce locales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Especies centinela para el monitoreo ambiental

Los peces presentan la mayor diversidad dentro de los vertebrados, por lo cual varias de las especies cumplen con los requisitos para ser utilizadas como centinelas en el análisis de bioindicadores. Las especies son seleccionadas principalmente por su fácil cultivo, relevancia ecológica y ocasionalmente por su importancia económica, sin embargo, un rango mucho menor de especies ha sido empleada en análisis de toxicidad durante sus ciclos de vida completos o parciales, porque los disruptores endócrinos ocasionan principalmente efectos subletales a largo plazo y en menor medida efectos agudos (Ankley y Johnson, 2004). Algunas especies como la trucha arcoiris no han sido utilizadas para análisis durante el ciclo de vida completo o parcial, debido al tiempo que tardan en alcanzar su madurez y a su gran tamaño. En contraste, peces pequeños de agua dulce tales como el pez cebra (*Danio rerio*) o el medaka (*Oryzias latipes*), ofrecen ventajas prácticas para realizar experimentos a nivel de laboratorio, sin embargo, su biología es muy diferente a la de especies silvestres, las que a menudo poseen ciclos de vida y tiempos de maduración sexual más largos. Los disruptores endócrinos pueden mostrar efectos moleculares idénticos en dos especies, pero debido a las particularidades anatómicas y fisiológicas de cada especie los efectos fisiológicos, morfológicos o respuestas biológicas serán necesariamente diferentes. Por ejemplo, los xenoestrógenos pueden inducir la síntesis de vitelogenina en los peces cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*), y llegan a ocasionar la formación de organismos intersexuados en medaka pero no en

los peces cebra (Gray *et al.*, 1998; Örn *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2002; Van der Ven *et al.*, 2003). De forma similar la exposición a etinilestradiol en la sardina de cabeza plana (*Pimephales promelas*) genera efectos diferentes a los observados en los peces cebra (*Danio rerio*), así en éstos últimos resulta en la inhibición hasta en un 100% de la reproducción ocasionada por una inhibición del desarrollo testicular (Fenske *et al.*, 2004), mientras que en la sardina de cabeza plana el efecto resultante es la feminización completa (Länge *et al.*, 2001).

Igualmente, la extrapolación de los efectos cualitativos de xenobióticos entre especies de peces es un problema, de la misma manera que la extrapolación de los efectos cuantitativos de diferentes concentraciones. Las especies de peces responden a diferentes dosis de estimulación, lo cual refleja diferencias en su fisiología básica (sensibilidad de sus receptores y capacidad de síntesis), por ejemplo, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) puede producir cientos de miligramos de vitelogenina en respuesta a la exposición a un compuesto estrogénico, mientras que la carpa (*Cyprinus carpio*) sólo produce cientos de microgramos al ser expuesta a la misma dosis de estrogénico (Tyler *et al.*, 1998). Considerando este contexto resulta importante conocer el efecto de diversos xenobióticos en la fisiología de especies silvestres con ciclos reproductivos largos, que permitan un mejor entendimiento de sus diversas interacciones. En la figura 1 se observa la tolerancia de los lepisosteidos a la contaminación.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY

Biological Indicators of Watershed Health Share

Contact Us Search: All EPA This Area

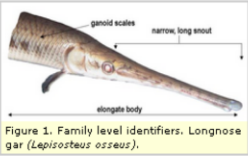
You are here: [EPA Home](#) » [Biological Indicators of Watershed Health](#) » [Indicator Species](#) » [Fish](#) » [Sunfish](#)

Gars (Lepisosteidae)

With a toothy maw and slender body, gars communicate "predator". This family is represented by just two genera and five species in the United States, including one of America's largest fishes, the fearsome alligator gar, which can reach up to nine feet in length and weigh nearly 300 pounds! This gigantic predator is known to feed on fish, crabs, turtles, ducks and even small mammals.

Family Level Identifiers (see Fig. 1):

- Body elongate.
- Covered with diamond-shaped (ganoid) scales.
- Long and narrow snout.
- Dorsal and anal fin set posteriorly.
- More - [tips about genus identification](#).



Habitat:

Gars prefer sluggish or still waters with good clarity and submersed vegetation. They are perhaps most common in large rivers (sluggish reaches), wetlands, oxbow lakes and coastal marshes.

Pollution Tolerance:

Generally, gars are tolerant of pollution and somewhat tolerant of habitat disturbance. With a unique swim bladder that is described as "lunglike" (Potter, 1927), gars are able to survive in areas of low dissolved oxygen.

Table 1. Tolerance designations for selected gar species.

Species Name	Common Name	Pollution Tolerance	Habitat Disturbance
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Spotted Gar	M	MT
<i>Lepisosteus osseus</i>	Longnose Gar	M	T
<i>Lepisosteus platostomus</i>	Shortnose Gar	M	MT
<i>Lepisosteus platyrhincus</i>	Florida Gar	M	NR
<i>Lepisosteus spatula</i>	Alligator Gar	M	MT

Key

Pollution Tolerance	Habitat Disturbance
T = Tolerant	T = Tolerant
M = Intermediate	MT = Moderately Tolerant
I = Intolerant	MI = Moderately Intolerant
NR = No ranking	I = Intolerant
	NR = No ranking

Figura 1. Tolerancia de especies de lepisosteidos a la contaminación (página de la U.S. Environmental Protection Agency).

2.2 Características del catán como especie centinela

El catán presenta varias características fisiológicas y comportamentales que lo hacen un excelente candidato a especie centinela, entre ellas destacan:

1. Es una especie nativa: el rango de distribución del catán abarca desde los ríos Ohio y Missouri en Norte América, hasta la laguna de Tamiahua en México y su distribución se expande a los estados de Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Morales, 1987). Al ser una especie nativa su utilización

como especie monitora de contaminación ambiental en cuerpos de agua de estas zonas, no representa ningún riesgo al realizar bioensayos in situ, y se encuentra adaptado a la calidad de los cuerpos de agua de la región.

2. Características eurihalinas: es una especie que se adapta bien tanto a cuerpos de agua dulce como de agua salada y puede tolerar aguas con contenido salino enteramente marino (Santillán, 2005), lo cual le confiere un alto potencial para ser utilizada en los distintos ecosistemas acuáticos, que van desde ríos de agua dulce hasta lagunas con alta salinidad.

3. Posición trófica: los hábitos alimenticios como depredadores y carroñeros en conjunto con el tamaño que alcanzan los adultos posicionan al catán en los niveles más altos de la cadena alimenticia de los ecosistemas acuáticos donde se encuentra (Morales, 1987; Santillán, 2005). Esto significa que esta especie no sólo tiene una exposición directa a los contaminantes en el medio acuático o en los sedimentos, sino que adicionalmente, la exposición a los contaminantes se da por procesos de bioacumulación a través de la red trófica. Este tipo de exposición, por medio de la cual se incrementan considerablemente los niveles de los contaminantes, tiende a provocar un mayor riesgo toxicológico para las especies (Corbella, 1998). Adicionalmente, los hábitos carnívoros y carroñeros del catán pueden ser aprovechados para realizar bioensayos de laboratorio o campo en los que pueden ser alimentados con organismos (vivos o muertos) tomados de los sitios en evaluación, para así medir la respuesta de bioindicadores, lo que permitiría conocer riesgos toxicológicos similares para otras especies ictiófagas (e.g. aves y mamíferos, incluido el hombre), que no están expuestos de manera continua a los contaminantes en el agua o sedimentos.

4. Se produce en condiciones controladas: el grupo ecofisiología de la UANL ha

desarrollado la tecnología necesaria para el cultivo del catán. Después de más de diez años de investigación se ha logrado estandarizar una metodología para la reproducción y el cultivo larvario de esta especie con lo cual la obtención de crías de catán en condiciones controladas permite en primera instancia contar con organismos de diferentes edades y tallas que pueden ser utilizados para programas de repoblación y/o acuicultura, pero que alternativamente podrían igualmente ser destinados para estudios de monitoreo ambiental, particularmente en aquellos sitios en los que se plantean iniciar programas de repoblación o acuicultura, permitiendo una mayor certidumbre de éxito al descartar efectos por contaminantes en los organismos depositados. Actualmente, existen instalaciones adecuadas para la reproducción controlada de la especie en diversas instituciones públicas y privadas de México, además de aquellas que igualmente se están desarrollando en Estados Unidos.

5. Especie pancrónica: la gran mayoría de los vertebrados y algunos invertebrados poseen un sistema de detoxificación, constituido por la superfamilia del sistema citocromo P450 (CYP450), que facilita la eliminación de compuestos extraños, al involucrar sistemas enzimáticos diferentes, encargados de ejecutar reacciones de hidroxilación y conjugación (San Martín, 2006). Los primeros registros del sistema detoxificante del citocromo P450 (CYP) fueron encontrados en bacterias y en vertebrados ancestrales de hace más de 550 millones de años, sin embargo, los CYP responsables de la transformación de los xenobióticos pudieron haber aparecido en los peces primitivos hace 450 millones de años (Nebert *et al.*, 1989; Nebert *et al.*, 1991). La teoría sobre la evolución de los CYPs, supone que las plantas desarrollaron la capacidad de sintetizar tóxicos en sus tejidos, para evitar ser ingeridas por los animales, por lo tanto los animales se adaptaron desarrollando el sistema de CYPs para degradar la mayoría de las toxinas ingeridas. El evento de la duplicación que

originó la divergencia de CYP1A1 y CYP1A2 en los mamíferos de un solo gen CYP1A ancestral se ha sugerido que ocurrió hace menos de 250 millones de años, etapa geológica en la cual aparecieron los lepisosteidos. Por lo tanto, el catán al ser una especie pancrónica, y con pocos cambios evolutivos, sus sistemas enzimáticos de CYPs serían más simples o diferentes en comparación con otras especies. De la misma forma, otras enzimas y proteínas utilizadas como bioindicadores pueden tener respuestas diferentes a las reportadas en otros peces, lo cual ayudaría a entender un poco más el funcionamiento de los sistemas de respuesta y de detoxificación de contaminantes en peces y vertebrados superiores.

2.3 Bioindicadores bioquímicos de contaminación

Las respuestas de algunas enzimas que metabolizan xenobióticos en peces han mostrado su uso potencial como bioindicadores para monitorear niveles tóxicos de contaminantes ambientales. La enzima ethoxiresorufin o-deethylasa (EROD), una monooxigenasa citocromo específica dependiente de P450, ha sido utilizada como un bioindicador que responde particularmente a contaminación por HAPs (Payne *et al.*, 1987).

Otra clase de enzimas utilizadas como bioindicadores son las esterasas (Labrot *et al.*, 1996). Estas enzimas son sensibles a la inhibición por pesticidas organofosforados y carbamatos e incluyen a las colinesterasas (ChEs) y carboxilesterasas (CaEs). Entre las ChEs utilizadas destacan la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). La inhibición de la actividad de ChEs ha sido asociada con la exposición a insecticidas organofosforados, carbamatos y otros xenobióticos neurotóxicos (Habig y Di Giulio, 1991). Por otra parte, las CaEs

representan un grupo heterogéneo de isoenzimas que pueden catalizar la hidrólisis de un amplio rango de esteres, tioesteres y amidas xenobióticos (Huang *et al.*, 1996), e igualmente son inhibidas por xenobióticos neurotóxicos (Wheelock *et al.*, 2005). En un estudio para evaluar la actividad de las esterasas en el catán manchado (*L. oculatus*) como bioindicadores de contaminantes múltiples, en la región baja del Río Mississippi, se observó una disminución significativa de la actividad enzimática de AChE y BuChE en organismos de zonas contaminadas con hidrocarburos clorinados tales como hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno y metales pesados (Huang *et al.*, 1997). La glutatión-s-transferasa (GST) representa uno de los mayores grupos de enzimas detoxificantes presentes en la fase II de la biotransformación (Perera, 2000), esta enzima cataliza la conjugación del glutatión (GSH) a una variedad de sustratos y es capaz de convertir xenobióticos hidrofóbicos en compuestos hidrofílicos que pueden ser excretados a través de la orina (Ketterer y Taylor, 1990; Armstrong, 1997; González del Pliego, 2009). La enzima se encuentra en prácticamente todas las células eucariotas y pudo haber evolucionado para proveer protección al organismo contra las sustancias tóxicas presentes en la comida y el ambiente (Nebert *et al.*, 1996). La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la destrucción de radicales libres del oxígeno, protege a las células metabolizadoras de oxígeno contra los efectos dañinos de los radicales superóxido libres (Petkau *et al.*, 1975; Fridovich, 1972; Lavelle *et al.*, 1973; Paschen y Weser, 1973; González del Pliego, 2009). La SOD está ampliamente distribuida en la naturaleza; Gregory *et al.* (1974) mencionan que está presente en todas las células metabolizadoras de oxígeno y Hewitt y Morris (1975) la han encontrado en bacterias anaeróbicas. Las actividades enzimáticas de catalasa, glutatión-s-transferasa (GST) y el nivel de malondialdeído (MDA) en tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a los pesticidas 2,4-D y azinfosmetil no fueron

afectadas por la exposición, sin embargo, las actividades de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PD) y glutatión reductasa (GR) se incrementaron significativamente. Adicionalmente, la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) se incrementó en los tratamientos individuales, mientras que decreció al combinar estos pesticidas. 2,4-D no afectó la actividad de superóxido dismutasa (SOD), pero hubo un decremento en el tratamiento con azinfosmetil. El tratamiento combinado de los pesticidas ejerció un efecto sinérgico en la actividad SOD y tuvo un efecto antagonístico en actividades G6PD, GPx y GR. Estos resultados demostraron que la tilapia resiste el estrés oxidativo a través de mecanismos antioxidantes e impidiendo incrementos en la peroxidación de lípidos (Oruç y Üner, 2000).

En un estudio para evaluar la presencia de compuestos organoclorados en 3 lagos de Louisiana (el lago Providence, el lago Bruin, y el lago St. John), en los cuales se tomaron muestras de varias especies, se encontraron residuos de 13 diferentes compuestos organoclorados. Las importantes concentraciones de muchos de estos compuestos a través de las redes tróficas mostraron que los lagos actúan como recipientes, acumulando los residuos generados por las actividades agrícolas cercanas a los mismos. El DDT, y sus metabolitos TDE, y DDMU, además de toxafenos, y otros PCBs fueron los principales compuestos de organoclorados detectados. Particularmente interesante fue la clara biomagnificación de los residuos, registrándose los más altos valores en organismos consumidores terciarios tales como el catán manchado *L. oculatus*, *Butorides striatus* y *Micropterus salmoides* (Niethammer *et al.*, 1984). Al mismo tiempo, en muestras de peces del lago Chicot (Arkansas) se encontraron DDT, metabolitos de DDT y heptacloro, en concentraciones significativamente más altas en la misma especie (*L. oculatus*) y el bagre *Ictalurus natalis*, en comparación con las otras especies examinadas (Cooper y

Knight, 1987). Igualmente, en un estudio en el cual se analizaron sedimentos y muestras de 8 especies de peces del refugio de vida silvestre Yazoo National, Mississippi, se encontró una acumulación de 12 plaguicidas organoclorados en la mayoría de los peces, superior a los sedimentos muestreados y la biomagnificación de los plaguicidas fue evidente de los sedimentos al pez mosquito (*Gambusia affinis*) y de estos al catán manchado (*L. oculatus*) (Ford y Hill, 1991). Por otra parte, en muestras analizadas de catanes silvestres de Tamaulipas y Nuevo León para plaguicidas organoclorados, sólo ha sido posible detectar en niveles importantes el DDE, de hasta 5.7 mg/kg., el cual es un derivado del DDT (García *et al.*, 2009).

Los diferentes tipos de contaminación pueden causar diferentes respuestas fisiológicas en los organismos. En la figura 2 se observa una clasificación de los diferentes tipos de bioindicadores de acuerdo a los efectos fisiológicos causados por los contaminantes.

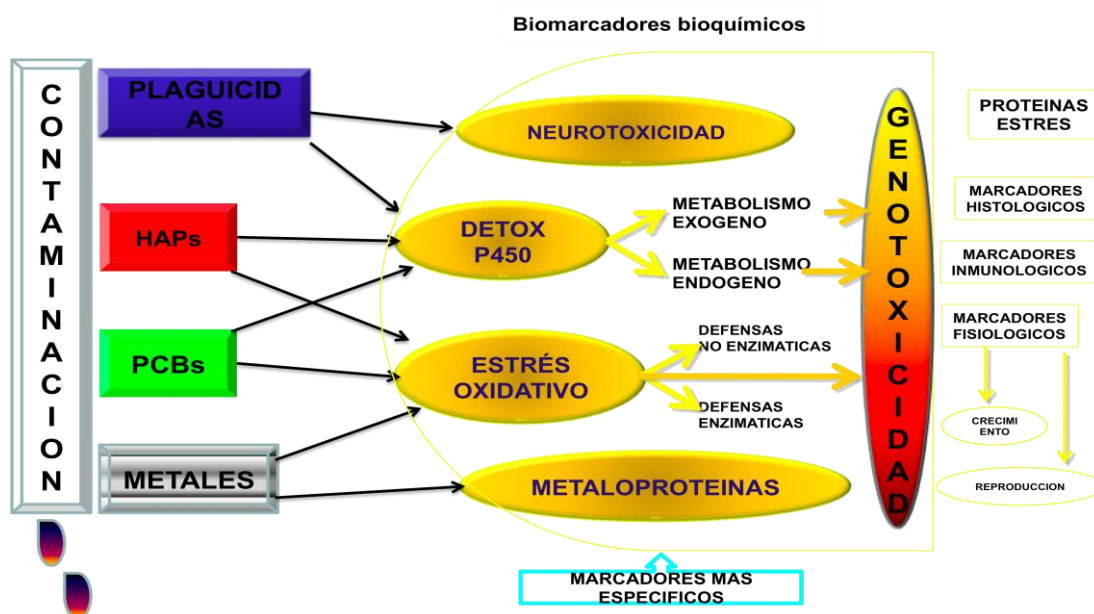


Figura 2. Especificidad de los bioindicadores de acuerdo a distintos efectos fisiológicos causados por compuestos contaminantes.

Se han registrado lesiones en el hígado de tres especies de lepisosteidos (*L. osseus*, *L. oculatus* y *L. platostomus*) provenientes de áreas contaminadas por hidrocarburos del río Mississippi. Los cortes histológicos de hígado en estos organismos mostraron abundante melanización y centros de macrófagos, pancreatitis y proliferaciones ductales en el páncreas exócrino. Otras lesiones observadas fueron parasitismo, inflamación, y necrosis multifocal. Mientras que un análisis pigmentario de los centros de melanomacrófagos (MMC) en *L. oculatus* indicó un incremento en los niveles de hierro hepatocelular, y los grandes MMC pudieron ser debidos a cuerpos cargados de contaminantes (Hartley *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, en la región baja del río Mississippi contaminada con hidrocarburos como hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno y metales pesados, se observó una disminución significativa de la actividad enzimática de esterasas (AChE y BuChE) en hígado y cerebro de *L. oculatus* (Huang *et al.*, 1997). Igualmente, en catanes manchados (*L. oculatus*) de un sitio contaminado con petróleo en Louisiana (Bayou Trepagnier) se observaron lesiones histológicas en las gónadas, caracterizadas por quistes multiloculares con líquido en los ductos espermáticos y quisteadenomas ováricos, mientras que en peces provenientes de un sitio cercano libre de contaminación (Bayou Traverse) no fueron observadas estas lesiones (Thiyagarajah, 2000). Por otra parte, en muestras analizadas de catanes silvestres de Tamaulipas y Nuevo León para hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) ha sido posible detectar diversos compuestos de este tipo y aunque los niveles encontrados no son muy elevados, los resultados muestran que igualmente estos compuestos se pueden acumular en los catanes (figura 3) (García *et al.*, 2009).

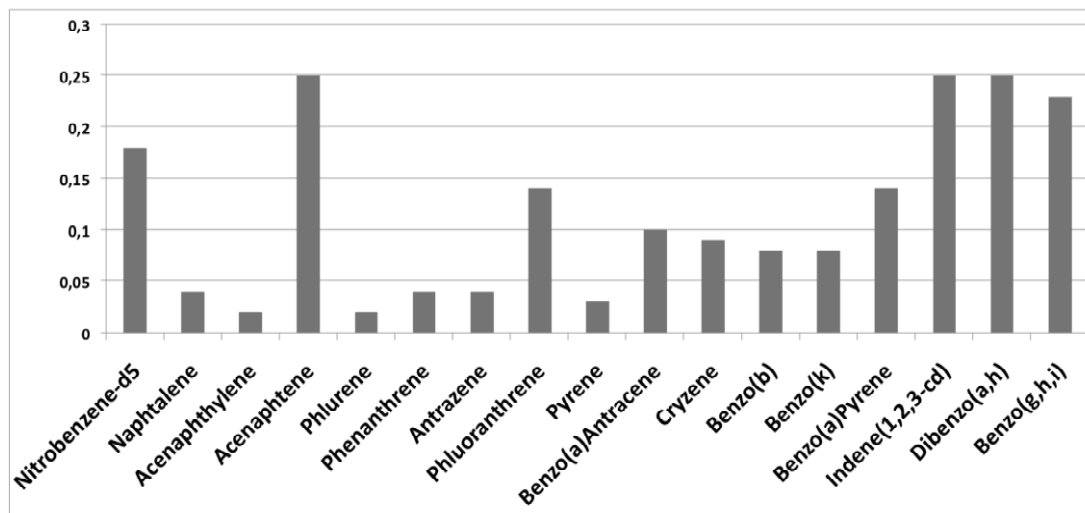


Figura 3. Concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en ppm en catanes silvestres de Tamaulipas y Nuevo León (García *et al.*, 2009).

La vitelogenina en peces puede ser una respuesta a contaminantes. Existen fuertes evidencias de la presencia de compuestos sintéticos o naturales que tienen el potencial de actuar como disruptores endocrinos al alterar la fisiología de los organismos. Estos compuestos pueden actuar como antagonistas o agonistas de los andrógenos y estrógenos así como de las hormonas tiroideas. Entre las principales fuentes de estos disruptores endocrinos se pueden señalar las descargas urbanas e industriales. Igualmente, se considera que estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos debido a que son muy persistentes y pueden acumularse por biomagnificación, lo que significa un riesgo tanto para los organismos silvestres como para el hombre. Particularmente, el uso de la vtg como bioindicador de disruptores estrogénicos y antiestrogénicos ha mostrado grandes ventajas tanto a nivel de laboratorio como de campo (Jobling *et al.*, 1998; Sumpter and Jobling, 1995). Al ser la vtg una molécula normalmente sintetizada en respuesta a estrógenos

endógenos presentes solamente en hembras maduras, su presencia en juveniles o machos es un claro indicio de la exposición a estrógenos exógenos. Las características más útiles de la vtg son su especificidad a estrógenos, la sensibilidad y la magnitud de respuesta de los peces que pueden incrementar sus niveles plasmáticos hasta en millones de veces, pasando de nanogramos hasta miligramos por mililitro su concentración plasmática (Santillán, 2005).

El uso de la vtg como biomarcador de compuestos estrogénicos en el catán actualmente es posible gracias a estudios previos que permitieron identificar, caracterizar y purificar tanto la vitelina ovárica como la vitelogenina plasmática del catán y pejelagarto (Hernández, 2002; Vela, 2003; Cortés, 2003). Igualmente han sido estandarizados métodos inmunológicos (ELISA competitivo) que permiten cuantificar vtg de catán en hígado, plasma, branquias o mucus, obteniendo de esta forma una herramienta bioquímica, precisa, sensible y que puede ser no invasiva (Santillán, 2005, Mendoza *et al.*, 2008). Un procedimiento similar para detectar vtg de otro lepisosteido ha sido utilizado para detectar alteraciones en el ciclo reproductivo en poblaciones silvestres de *L. platyrhinchus* (Orlando *et al.*, 2007).

Prácticamente no existen estudios sobre efectos de contaminantes u otros compuestos con propiedades estrogénicas en lepisosteidos. Lo anterior se puede atribuir a los escasos estudios sobre biología de la reproducción en este tipo de peces. Un aspecto que ha dificultado este tipo de estudios es la falta de dimorfismo sexual, los ciclos de vida y edades de maduración muy largos en algunas especies, como el catán, y en algunos casos las escasas poblaciones. No obstante, existen algunos estudios como el efectuado en el catán de Florida (*L. platyrhinchus*) en el que se evaluó la concentración de cortisol, 17β -estradiol y testosterona en plasma como respuesta al estrés causado por contaminantes. Aunque no se lograron encontrar

diferencias en la concentración de todas las hormonas entre hembras colectadas en sitios contaminados y libres de contaminación, los machos colectados en el sitio contaminado presentaron valores más bajos de 17β -estradiol, en comparación con los machos de un sitio no contaminado (Orlando *et al.*, 2002).

3 HIPÓTESIS

La exposición de individuos de catán (*A. spatula*) de distintas edades a diversos xenobióticos y mediante diferentes vías causa variaciones en la actividad de enzimas y en la síntesis de proteínas consideradas como indicadoras de contaminación, lo cual permitirá a su vez deducir los efectos que tienen estos contaminantes en las poblaciones silvestres.

4 JUSTIFICACIÓN

El catán *A. spatula* puede habitar ambientes de agua dulce y salobre, por lo tanto tiene un excelente potencial para ser utilizado como especie monitora de contaminación en los diversos sistemas acuáticos del Noreste del país.

El catán es una especie pancrónica, por lo cual, su evaluación permitiría una mejor comprensión de su capacidad de adaptación al ser comparado con otras especies, además esta especie posee importancia comercial acuícola en las regiones Noreste de México debido al consumo tradicional del mismo. Por otra parte, ya que sus poblaciones naturales se han reducido significativamente en los últimos años se revela indispensable evaluar el efecto de los contaminantes liberados por actividades humanas sobre esta especie.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la respuesta y sensibilidad de indicadores bioquímicos de contaminación en el catán (*Atractosteus spatula*) con la finalidad de proponer metodologías de monitoreo ambiental utilizando esta especie como centinela y contribuir a la comprensión de los efectos de los contaminantes en las poblaciones silvestres.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de diferentes xenobióticos (hidrocarburos, plaguicidas organofosforados y compuestos estrogénicos) en la actividad de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos (hígado, plasma y branquias) del catán:
2. Determinar la respuesta y sensibilidad de indicadores bioquímicos de contaminación en juveniles de catán de distintas edades.
3. Determinar la respuesta y sensibilidad de indicadores bioquímicos de contaminación en juveniles de catán expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías (inyección, medio acuático ó alimento).
4. Establecer posibles relaciones entre el tipo de xenobiótico con la respuesta conjunta de los diferentes indicadores bioquímicos utilizados.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Organismos experimentales

Para realizar los bioensayos se utilizaron ejemplares juveniles de catán (*Atractosteus spatula*) obtenidos de acuicultura. Crías de catán se obtuvieron del centro acuícola El Huasteco en Gómez Farías, Tamaulipas, donde se realizaron inducciones para el desove, los organismos de 3 a 7 días después de eclosionados fueron trasladados al Laboratorio Húmedo del Grupo Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., donde fueron aclimatados y mantenidos en estanques de cultivo hasta tener la edad requerida para realizar los bioensayos. La evaluación de los efectos de diversos xenobióticos en los catanes se realizó en catanes de 6, 12 y 24 meses.

6.2 Condiciones experimentales

6.2.1 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán

Para evaluar la respuesta de los indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos se utilizaron catanes juveniles de 24 meses de edad con un peso promedio de 309 ± 38.5 g. Los organismos fueron colocados y aclimatados en canaletas de fibra de vidrio (0.70 X 2.30 X 0.30 m) con capacidad de 500 litros, y recirculación de agua a través de un filtro de fibra y carbón activado (figura 4). Tres

organismos por tratamiento fueron utilizados en cada canaleta. Los tratamientos consistieron en la aplicación de:

- a) 17β -estradiol (E8875 SIGMA) como compuesto estrogénico (E2).
- b) β -naftoflavona (N3633 SIGMA) como hidrocarburo (H).
- c) Diazinon (0,0-Dieti-0-(2-isopropil-4-metil-6-piridiminil) fosforotioato) 25 % equivalente a 236 g de i.a./L, número de lote 107194 agroformuladora DELTA como plaguicida organofosforado (OP).
- d) Aceite de pescado menhaden (F8020 SIGMA) como control (C).



Figura 4. Canaletas de 500 litros utilizadas en el bioensayo.

Los compuestos fueron administrados mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 50 $\mu\text{g/g}$ de peso utilizando aceite de pescado menhaden como vehículo diluyente en 1 mL (figura 5a). Después de un lapso de 48 horas los organismos fueron sacrificados en hielo y mediante disección a 4°C se obtuvieron muestras de sangre, hígado, branquias y mucus (figura 5b). Las muestras de hígado y branquias

fueron cortadas y se colocaron en viales para ser almacenadas inmediatamente en nitrógeno líquido; las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción directa al corazón con jeringas de 5 mL, posteriormente la sangre fue centrifugada a 5,000 g, a 4 °C durante 10 minutos y se separó el plasma para ser almacenado a -70 °C. Las muestras de mucus solo fueron utilizadas para determinar VTG y se obtuvieron por raspado con espátula y se disolvieron en 1 mL de buffer PBS 0.1M pH 7.2 y se almacenaron en congelación a -20 °C.

Los indicadores bioquímicos de contaminación evaluados, con los métodos utilizados, son expuestos más adelante. En la tabla 1 se muestran los compuestos xenobióticos y los tejidos analizados.

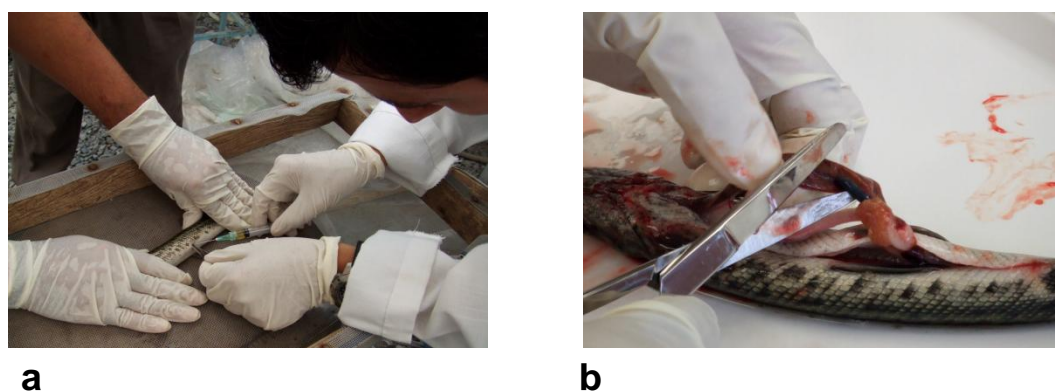


Figura 5. a) Aplicación de los tratamientos respectivos mediante inyección intraperitoneal; b) obtención de muestras de tejidos.

TABLA 1

Tejidos analizados para cada uno de los xenobióticos evaluados. E2 (17 β -estradiol), H (β -naftoflavona), OP (diazinon), C (control).

Xenobiótico	Tejido analizado			
	Plasma	Hígado	Branquias	Piel (Mucus)*
E2	√	√	√	√
H	√	√	√	√
OP	√	√	√	√
C	√	√	√	√

* Solo utilizado en la determinación de vitelogenina (VTG)

6.2.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades

Para evaluar la respuesta y sensibilidad de los indicadores bioquímicos en diferentes edades de juveniles de catán se utilizaron:

- a) catanes de seis meses de edad (6 M) con un peso promedio de 37.41 ± 20.6 g
- b) catanes de 12 meses de edad (12 M) con un peso promedio de 50 ± 23 g
- c) catanes de 24 meses de edad (24 M) con un peso promedio de 309.1 ± 38.5 g

Los organismos fueron colocados y aclimatados en canaletas de fibra de vidrio con capacidad de 500 litros, bajo las condiciones descritas en el apartado anterior.

En los grupos de edad 6 M y 24 M, tres organismos fueron expuestos a cada uno de los xenobióticos probados en el experimento anterior (E2, H y OP), además de un grupo control (C). Para el grupo de edad 12 M, el tratamiento con plaguicida organofosforado (OP) fue omitido (tabla 2).

TABLA 2

Xenobióticos evaluados (√) en cada grupo de edad de los catanes. E2 (17β-estradiol), H (β-naftoflavona), OP (diazinon), C (control).

Xenobiótico	Grupo de edad de los catanes		
	6 M	12 M	24 M
E2	√	√	√
H	√	√	√
OP	√		√
C	√	√	√

Los compuestos fueron administrados mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 50 µg/g de peso, como se indica en el apartado anterior. El tiempo de exposición después de la inyección fue de 48 horas y posteriormente los organismos fueron sacrificados en hielo para obtener muestras de hígado las cuales fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta evaluar los indicadores bioquímicos que se describen más adelante.

6.2.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías

Para evaluar la respuesta y sensibilidad de los indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a contaminantes mediante diferentes vías se consideraron las siguientes variables de exposición:

- a) Exposición directa a xenobióticos (D): Los compuestos respectivos a los tratamientos E2, H, OP y C fueron administrados mediante una inyección intraperitoneal a una dosis de 50 µg/g de peso utilizando aceite de pescado menhaden como vehículo diluyente, después de un lapso de 48 horas los organismos se colocaron en hielo para ser sacrificados y obtener muestras de hígado.
- b) Exposición a xenobióticos en el medio acuático (MA): Para esta forma de exposición se utilizó la metodología propuesta por Jönsson (2003). Los contaminantes correspondientes a los tratamientos E2, H y C fueron disueltos en 1 mL de DMSO y posteriormente se aplicaron en el agua de los tanques de cultivo para alcanzar una concentración final de 10^{-6} M. Un tanque de cultivo fue utilizado como control, al cual se le aplicó 1 mL de DMSO para determinar el efecto del diluyente. En este caso como tanques de cultivo se utilizaron contenedores plásticos cubiertos con bolsas de polietileno con capacidad de 48 litros de agua y provistos de oxígeno mediante air-lift (figura 6). El tiempo de exposición a los compuestos fue de 96 horas, y posteriormente los organismos se colocaron en hielo para ser sacrificados y obtener muestras de hígado.

- c) Exposición a xenobióticos mediante el alimento (A): Para suministrar los contaminantes, catanes juveniles fueron alimentados con crías de tilapia (*Oreochromis niloticus*) las cuales fueron previamente inyectadas con el compuesto respectivo a los tratamientos E2, OP y C. La dosis aplicada a las tilapias (2.34 ± 0.48 g) fue de $50 \mu\text{g/g}$ de peso, posteriormente se suministraron diariamente como alimento cuatro mojarras inyectadas en cada uno de los tratamientos durante un período de 28 días. Al finalizar el período de exposición los catanes se colocaron en hielo para ser sacrificados y mediante disección se obtuvieron muestras de hígado. En este caso para poder observar si los peces suministrados eran consumidos, como tanque de cultivo se utilizaron acuarios de cristal de 60 galones cubiertos con tapas para evitar que los peces saltaran fuera del acuario y con recirculación de agua a través de un filtro de fibra y carbón activado (figura 7).

Para estos bioensayos se utilizaron catanes juveniles de 6 meses de edad con un peso promedio de 170.8 ± 24 g, y para cada tratamiento se utilizaron 3 organismos en la exposición directa, y en la exposición a través del medio acuático, mientras que en la exposición a través del alimento se utilizaron 2 organismos por tratamiento.

En la tabla 3 se muestran los xenobióticos y las formas de exposición utilizadas para su evaluación.



Figura 6. Contenedores de plástico cubiertos con bolsas de polietileno.



Figura 7. Acuarios de 60 galones donde fueron distribuidos los catanes en sus respectivos tratamientos.

TABLA 3

Xenobióticos evaluados mediante diferentes vías de exposición. E2 (17 β -estradiol), H (β -naftoflavona), OP (diazinon), C (control).

Xenobiótico	Vía de exposición del contaminante		
	Directa (D)	Agua (MA)	Alimento (A)
E2	√	√	√
H	√	√	
OP	√		√
C	√	√ (DMSO)	√

6.3 Análisis de los indicadores bioquímicos de contaminación

6.3.1 Elaboración de extractos

Las muestras de hígado y branquias almacenadas en nitrógeno líquido fueron tratadas individualmente, cada muestra se pesó en una balanza digital OHAUS, y se adicionó agua bidestilada en una proporción de 1:10 (peso de muestra/volumen) para ser homogenizada a 4°C durante dos minutos en un homogenizador Glas-Col[®] a 100 rpm. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 10,621 g durante 15 minutos y a 4 °C, se desechó la grasa flotante y del sobrenadante se prepararon alícuotas de 0.5 mL para ser almacenadas a -70 °C para luego ser utilizadas en los respectivos análisis bioquímicos.

6.3.2 Obtención de la fracción microsomal en extractos de hígado

En muestras de los bioensayos de exposición a xenobióticos mediante diferentes vías, se prepararon extractos microsomales para la determinación de algunos de los bioindicadores, para lo cual se utilizó el método de precipitación por CaCl₂ descrito por Hamilton *et al.* (1999). Las muestras de hígado se procesaron individualmente y todos los procesos se realizaron a una temperatura de 4 °C. La muestra se homogenizó en una solución de KCl 140 mM en una proporción 1:4 (peso de muestra/volumen) a 100 rpm durante dos minutos a 4 °C. Los homogenizados se centrifugaron en volúmenes de 1.5 mL en microtubos a 6798 g durante 10 minutos a 2°C, se eliminó la grasa flotante y el sobrenadante se colocó en microtubos nuevos, se recuperó el volumen original (1.5 mL) adicionando KCl 140 mM y se

centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones descritas, el proceso se repitió hasta que ya no apareció grasa flotante en los microtubos. Posteriormente, el sobrenadante se colocó en un matraz Erlenmeyer y se agregó una solución de CaCl_2 8 mM hasta alcanzar una relación 1:7.5 (volumen de muestra/volumen de CaCl_2), posteriormente se agitó levemente durante 3 minutos, y la solución fue transferida a microtubos de 1.7 mL para ser centrifugada a 6798 g durante 10 minutos a 2 °C. Se eliminó el sobrenadante y los precipitados (pellets) se resuspendieron en 30 μL de buffer HEPES pH 7.8, los cuales se almacenaron a -70 °C para posteriormente ser utilizados como fracción microsomal en los análisis que se indican más adelante.

6.3.3 Determinación de la concentración de proteína en los extractos

En todos los casos en que se requirió conocer la concentración de proteínas, ésta se determinó por el método de Bradford (1976) adaptado a microplacas. Se utilizó una curva estándar de 0.05 a 0.5 mg de BSA (A-9647, Sigma) por mL de agua destilada. De cada dilución y de las muestras se colocaron 10 μL por pozo (con 2 repeticiones), más 200 μL de solución de trabajo 85% de H_2O , 3% etanol al 95%, 6% ácido fosfórico al 88% y 6% de la solución stock de Bradford (100 ml de etanol al 95%, 200 ml de ácido fosfórico al 88% y 350 mg de azul de Coomassie G) se mezclaron dentro del lector por 2 min y finalmente se leyeron las placas a 620 nm en un lector de microplacas (TECAN, Sunrise, Viena, Austria).

6.3.4 Cuantificación de vitelogenina (VTG)

La concentración de VTG se determinó mediante un inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de tipo competitivo previamente estandarizado por Mendoza *et al.* (2011), el cual está basado en el descrito por Mendoza *et al.* (1993), con algunas modificaciones. Se empleó VTG purificada de catán, un anticuerpo primario obtenido a partir de esta VTG (anti-VTG), y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG, Zymed Laboratories). El protocolo básico a seguir fue el siguiente (figura 8).

En los pozos de una microplaca (Nalgene, Nunc) se colocaron 100 ng de VTG diluidos en 200 μ L de buffer de carbonatos, excepto en los asignados al blanco (BI) y al de unión no específica (NSB). Posteriormente, la placa se incubó a 4 °C durante 12 horas y se desechó el contenido de la microplaca para lavar los pozos con buffer PBS-Tween 20 (1:1000). Enseguida se realizó un bloqueo colocando en todos los pozos 200 μ L de leche descremada al 5 % en buffer PBS y la microplaca se incubó a 37 °C durante 2 horas. Al terminar la incubación, se desechó la solución y nuevamente se lavaron los pozos. La competencia se realizó agregando a los pozos 200 μ L de una solución de buffer PBS-Tween y 5 % de leche descremada preincubada (1 hora a 37 °C) conteniendo 8.5 ng de Anti-VTG y cantidades conocidas de VTG para la curva estándar, o bien las muestras problema. De nuevo se incubó la microplaca a 27 °C durante 1 hora; después de lo cual se desechó la solución y se lavaron los pozos. Se colocaron 200 μ L de buffer PBS-Tween y 1 % de leche descremada conteniendo 0.015 μ g del anticuerpo secundario en cada pozo y se incubó a 37 °C durante 1 hora, para nuevamente desechar la solución y lavar los pozos. Para revelar la reacción se colocó en cada pozo 100 μ L de sustrato

ortofenilendiamina (0663P-OPD, Research Organics) (10x OPD en buffer de citratos 1 M, pH 4.5) y se incubó a 37 °C por 20 minutos en oscuridad. Finalmente la reacción se detuvo aplicando 50 µL de HCl 1 N por pozo y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas (TECAN, Sunrise Remote Control). Los controles se trataron de la siguiente manera: para el Blanco (Bl): se depositó sólo buffer de carbonatos (sin VTG), y después sólo buffer de dilución sin anti-VTG, el cual se consideró como punto de referencia (cero); para determinar el valor más alto de la curva (Bmax) se depositó VTG, pero al momento de competir sólo se depositó anti-VTG (sin VTG); para determinar la unión no específica (NSB) sólo se depositó anti-VTG.

Los resultados del ELISA se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{logit} = \text{Log}[(B/B_{\text{max}})/(1-B/B_{\text{max}})]$$

Donde B es la absorbancia de cada pozo menos la absorbancia del pozo designado para la unión no específica (NSB). Y B_{max} es la absorbancia del pozo asignado para el valor más alto de la curva.

A partir de los valores *logit* de los pozos con cantidades conocidas de VTG para la curva estándar se realizó una regresión que permitió calcular la cantidad de VTG en las muestras problema (Specker y Anderson, 1994). Finalmente, la concentración de VTG en la muestra se expresó como un porcentaje de la proteína total en dicha muestra.

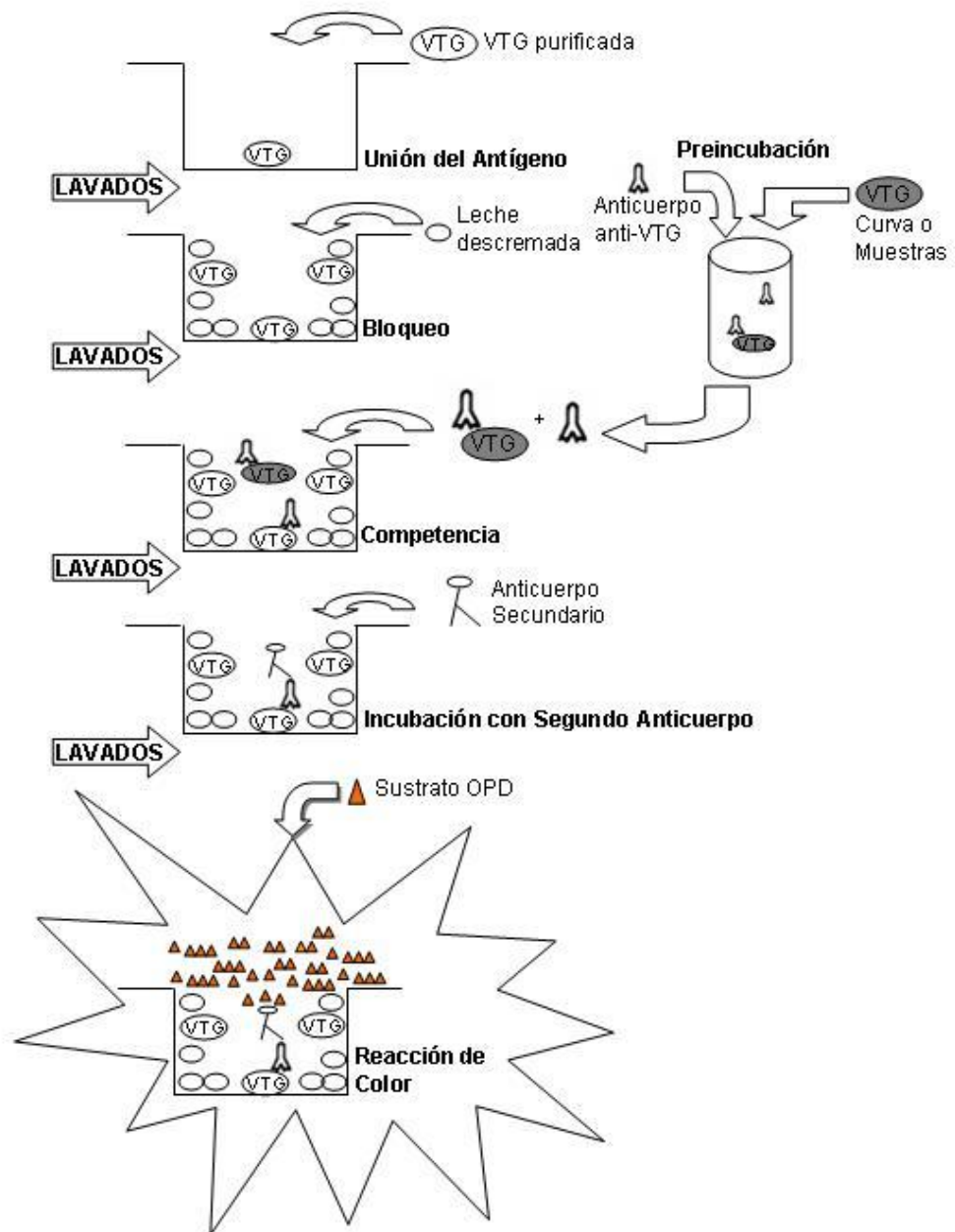


Figura 8. Diagrama de flujo de la técnica ELISA competitivo.

6.3.5 Evaluación de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE)

La actividad de tipo AChE y BChE se evaluó utilizando el método descrito por Ellman *et al.*, (1961) y modificado para su aplicación en microplacas por Huang *et al.* (1997). La reacción se llevó a cabo en microplacas, en las cuales se colocó por pozo 280 μL de ácido 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) en buffer PBS 0.1 M (pH 7.8) y 10 μL del extracto enzimático (homogenizados). La reacción fue iniciada agregando 10 μL de acetylthiocholine chloride (0.015 M) para la actividad AChE o butyrylthiocholine chloride (0.015 M) para la actividad BChE. Inmediatamente, en un lector de microplacas (TECAN, Sunrise Remote Control), se iniciaron lecturas de absorbancia a 405 nm en intervalos de 120 segundos y durante un tiempo total de 10 minutos. Para cada muestra se realizaron tres pozos (replicados analíticos) y como blancos se utilizaron 3 pozos por microplaca sustituyendo la muestra por buffer.

Con las lecturas entre intervalos se comprobó la linealidad de la reacción (condiciones saturantes de sustrato) y la actividad enzimática fue expresada como el incremento de absorbancia por minuto por miligramo de proteína en los extractos.

6.3.6 Evaluación de la actividad de carboxilesterasa (CaE)

La actividad tipo CaE fue determinada siguiendo el método descrito por Ellman *et al.*, (1961) y modificado para su aplicación en microplacas por Huang *et al.* (1997). Para lo anterior se realizó un ensayo en el cual se colocó en cada pozo 10 μL de extracto enzimático, 200 μL de buffer *tris*-HCl 50 mM (pH 7.1) y se agregaron 100 μL de *p*-nitrofenilacetato 2 mM como sustrato para iniciar la reacción,

inmediatamente después se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm en intervalos de 120 segundos y durante un tiempo total de 10 minutos. Para cada muestra se realizaron tres pozos (replicados analíticos) y como blancos se utilizaron 3 pozos por microplaca sustituyendo la muestra por buffer.

Con las lecturas entre intervalos se comprobó la linealidad de la reacción y la actividad enzimática fue expresada como el incremento de absorbancia por minuto por miligramo de proteína en los extractos.

6.3.7 Evaluación de la actividad fosfatasa alcalina (ALP) y fosfatasa ácida (ACP)

La actividad ALP y ACP fue evaluada utilizando 4-nitrofenil-fosfato como sustrato (Moyano *et al.*, 1996). La mezcla de reacción se realizó en microplacas y consistió en 10 μ L de extracto enzimático, 200 μ L de buffer dietanolamina 1.0 M (pH 9.8) con 50 mM $MgCl_2$ para la actividad ALP, o buffer de acetato de sodio-HCl 0.1 M (pH 4.8) para la actividad ACP. La reacción fue iniciada agregando 10 μ L de sustrato a una concentración final de 0.4 mM. Para cada muestra se realizaron tres replicados con lecturas de absorbancia a 405 nm cada 120 segundos durante un lapso total de 10 minutos, además se colocaron 3 blancos por microplaca los cuales no contenían enzimas. La actividad enzimática fue expresada como el incremento de absorbancia por minuto por miligramo de proteína en los extractos.

6.3.8 Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)

En este caso se utilizó un Kit para SOD de CAYMAN Chemical Company (Cat. 706002) el cual se basa en medir la producción de los radicales superóxido (O_2^-) generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina, los cuales son detectados por una sal de tetrazolium. Este método permite la detección de los tres principales tipos de SOD (Cu/Zn-, Mn-, y Fe-SOD) y puede ser a partir de muestras de plasma, suero, homogenizados de tejidos o células lisadas. La mezcla de reacción se realizó en los pozos de microplacas y básicamente consistió en 200 μ L de detector de radicales el cual se preparó diluyendo (50 μ L de sal de tetrazolium (tal como viene en el kit) en 19.95 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, conteniendo 0.1 mM ácido diethylenetriaminepentaacético (DTPA) y 0.1 mM hypoxanthine), luego se añadió 10 μ L de extracto enzimático o un estándar de SOD. La reacción se inició agregando 20 μ L de xantina oxidasa la cual se preparó diluyendo 50 μ L de xantina oxidasa (tal como viene en el kit) en 1.95 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0), catalizando así la liberación de radicales superóxido los cuales son captados por la sal de tratazolium, y cuantificados a una absorbancia de 450 nm, siendo la concentración de radicales inversamente proporcional a la actividad SOD en las muestras.

En cada microplaca se incluyó una curva estándar con concentraciones conocidas de la enzima SOD para lo cual se utilizó un estándar de SOD incluido en el kit y realizando las diluciones en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (tabla 4).

TABLA 4

Curva estándar de SOD.

Tubo	SOD stock (μL)	Buffer de muestra (μL)	Actividad Final de SOD (U/mL)
A	0	1000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	200	800	0.25

Se obtuvo una tasa de linearización (LR) dividiendo el valor de absorbancia obtenido del estándar A entre sí mismo y entre los valores de absorbancia de todos los puntos de la curva estándar de SOD y las muestras analizadas. Mediante una regresión lineal entre los valores de LR de la curva estándar y su concentración de SOD (U/mL), se obtuvo la concentración de SOD de las muestras analizadas. Una unidad (U/mL) es definida como la cantidad de SOD necesaria para exhibir el 50 % de dismutación de los radicales superóxido.

$$\text{SOD (U/mL)} = \frac{\text{LR muestra} - \text{intersección y}}{\text{pendiente}} \times \frac{0.23 \text{ mL}}{0.01 \text{ mL}} \times \text{dilución muestra}$$

6.3.9 Evaluación de la actividad de Glutación-s-transferasa (GST)

La actividad de GST fue determinada a partir de extractos completos siendo esta considerada como actividad GST totales (GST_T). Sin embargo, en el caso de los bioensayos de exposición a xenobióticos de forma directa, vía el medio acuático y vía el alimento; la actividad de GST fue determinada en la fracción microsomal (GST_m).

La actividad de GST se analizó de acuerdo a Mannervik y Danielson (1988) y Wilce y Parker (1994): la GST cataliza la conjugación de L-glutación con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a través del grupo tiol del glutación. El producto de la reacción es el conjugado GS-DNB el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm, por lo cual se puede considerar que el incremento de absorbancia (340 nm) es directamente proporcional a la actividad de GST en la muestra. La mezcla de reacción se llevo a cabo en celdas de cuarzo de 1 mL y consistió en 970 µL de buffer de fosfato salino Dulbecco's (pH 7.2), 10 µL de L-glutación reducido 200 mM (G4251 Sigma) y 10 µL de extracto enzimático. La reacción se inició agregando 10 µL de CDNB 100 mM (S2569 Sigma), se mezcló por inversión para inmediatamente iniciar lecturas de absorbancia a 340 nm cada 30 segundos durante un período de 5 minutos en un espectrofotómetro (Genesys 2, SPECTRONIC). La linealidad de la reacción fue determinada trazando los valores de absorbancia contra tiempo y la actividad específica de GST se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V(\text{mL}) \times \text{dil}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{enz}} (\text{mL})} = \mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}/\text{mg de proteína}$$

dil = factor de dilución de los extractos enzimáticos

ϵ_{mM} = coeficiente de extinción de CDNB conjugado a 340 nm (9.6 mM^{-1})

V = Volumen de reacción (1 mL)

V_{enz} = Volumen de muestra analizado (10 µL)

6.3.10 Evaluación del Citocromo P450 (CYP1A)

Para la evaluación del sistema de detoxificación basado en la presencia y actividad del Citocromo P450 se recurrió a diferentes aproximaciones que van desde las inmunológicas, pasando por las bioquímicas, hasta las genéticas, como se muestra a continuación.

6.3.10.1 Proteínas del CYP1A por inmunodifusión

Para establecer la presencia de proteínas del CYP1A en extractos de hígado se utilizó la técnica inmunodifusión doble, de acuerdo al método de Ouchterlony (1949). Las pruebas se llevaron a cabo en placas (12 x 6 cm) de agarosa al 1% en un buffer Tris-HCl 10mM (pH 7.3) con 0.1% de NaN₃, elaboradas sobre Gel-Bond (Pharmacia). Se realizaron pozos de 3 mm de diámetro en los que se depositaron 10 µl de extractos a probar, mientras que en una ranura central (7 x 0.3 cm) se colocaron 100 µl de anticuerpo policlonal Rabbit anti-fish CYP1A peptide (Cyp-11 Biosense) en dilución 1:500. Los geles se incubaron a 37°C en cámara húmeda por 24 hrs. Después se lavaron con una solución de NaCl 0.14 M y se prensaron en papel filtro hasta que estuvieron completamente secos. Por último, las líneas de precipitación se revelaron con azul de coomassie R-250 (0.1%) en etanol, ácido acético y agua (40:10:50) durante 2 hrs. y como decolorante se utilizó la misma solución sin el colorante.

6.3.10.2 Proteínas del Citocromo P450 por Electroforesis

Muestras de fracción microsomal fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page) utilizando un gel discontinuo de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). Las electroforesis se realizaron en una cámara vertical, Dual Modelo P9DS (OWL Separation Systems TM) con placas de 16 x 14.5 x 0.3 cm con 10 muestras por gel. El gel concentrador se preparó a una concentración de 4% y el gel separador a 12%. Se utilizó Tris-Glicina 10 X (0.25 M- 2 M, SDS 1%) pH 8.3, como buffer de cámara. Las muestras se prepararon mezclando los extractos con el buffer de muestra (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 8%, Glicerol 40%, 20 % de β -mercaptoetanol y Azul de Bromofenol 0.01 %) en proporción 1:3, para aplicar 60 μ g. de proteína por pozo. Los geles se corrieron a 25 mA y 200 V. Al finalizar la electroforesis la tinción de los geles se llevó a cabo la metodología de Weber y Osborn (1969) y el patrón de bandas fue analizado en un documentador Gel-Doc XR con software Image Lab (BIORAD).

6.3.10.3 Proteínas del CYP1A por Western Blot

Las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida realizados bajo las condiciones ya descritas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (N-8017, Sigma, poro 0.2 μ m) con un buffer de 0.02M Tris, 0.25M Glicina y 20% metanol pH 8.3 y se realizó una electrotransferencia a 2 mA y 14 V por cm^2 durante 45 minutos en una unidad de electrotransferencia OWL HEP-3. Al terminar la transferencia se bloqueó la membrana con TBST (Tris Buffered Saline Plus Tween 20: 20 mM Tris HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl y 0.05 % Tween 20) con 5 % leche descremada.

Enseguida, se incubó 2 horas con anticuerpo policlonal *Rabbit anti-fish CYP1A peptide* (Cyp-11 Biosense) disuelto 1:5000 en solución de bloqueo, se realizaron lavados con TBST y la membrana se incubó durante 1 hora con anticuerpo conjugado con peroxidasa (*HRP-Goat Anti-Rabbit IgG*, Zymed Laboratories) disuelto 1:10000 en solución de bloqueo. Finalmente, y después de 3 lavados, la membrana se reveló con 90 mL de TBST más 45 mg de 3'3 diaminobencidina tetrahidroclorídrica (D5637, Sigma) y 900 μ L de H₂O₂ 3%, se dejó en la solución en agitación hasta que se pudieran apreciar bandas y finalmente se detuvo la reacción con HCl 6N.

6.3.10.4 Evaluación de la actividad enzimática del CYP1A: Etoxiresorufin o-desetilasa (EROD)

Para evaluar la actividad EROD se utilizó el método espectrofotométrico de Klotz *et al.* (1984) descrito por Kennedy (1994), el cual consiste en la utilización del sustrato Ethoxyresorufin (7-ER) cuya dietilación es catalizada por el citocromo P-450 (P-450IA), el producto de la reacción es el resorufin (R), el cual absorbe a una longitud de onda de 572 nm, por lo cual, la reacción puede monitorearse de forma continua a 572 nm. La mezcla de reacción consistió en 480 μ L del sustrato 7-ER (2 μ M) en buffer Tris-HCl 0.1M (pH 8.0) con NaCl 0.1 M, 10 μ L de extracto utilizando la fracción microsomal y la mezcla se preincubó en baño de agua a 100°C por 3 minutos. Para iniciar la reacción se añadió 10 μ L de NADPH 29.9 mM (N1630 Sigma) en buffer Tris-HCl 50 mM, (pH 7.4 con dithiothreitol 1 mM, EDTA 1 mM y glycerol 20 %). Inmediatamente se registró la absorbancia a 572 nm cada 30 segundos durante 30 minutos en un espectrofotómetro (Genesys 2, SPECTRONIC).

La actividad EROD se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{nmol R formado/min/mL} = (\Delta A_{572}/\text{min}) * (\text{mmol}/73 \text{ L}) * (10^6 \text{ nmol/mmol}) * (1/1000 \text{ mL}) * (500/10) * (\text{dilución})$$

6.3.10.5 Análisis de la expresión genética del CYP1A

El análisis de la expresión del mRNA CYP1A se realizó mediante PCR siguiendo el método descrito por San Martín (2006). Para la extracción de RNA total, fueron homogeneizadas muestras de hígado en un mortero y en presencia de nitrógeno líquido, isotiocianato de guanidina, una solución de β -mercaptoetanol 4 M, sarcosil al 0.6% y citrato de sodio al 0.5% (Chomczynski y Sacchi, 1987). La integridad del RNA se verificó electroforéticamente, para ello se colocaron aproximadamente 1-3 μL de RNA total por carril en un gel de agarosa al 1.5%, previamente teñido con bromuro de etidio para observar las bandas de RNA con un transiluminador Biometra TI 3. El mRNA CYP1A presente en la muestra fue convertido a cDNA en una reacción de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando oligonucleótidos (primers) diseñados por Zapata (2002) para tilapia (*Oreochromis niloticus*) (tabla 5). La reacción con volumen final de 20 μL , contenía 0.5 μg de Oligo (dT), RNA muestra (2 μg) y como componentes adicionales 5X first strand buffer, cloruro de magnesio (MgCl_2) 50 mM, 0.1 M DTT y la enzima M-MLVRT Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (200 u, Gibco BRL), la cual fue incubada a 37 °C durante 1 hora.

El cDNA elaborado previamente (2 μ L) se utilizó en conjunto con los oligonucleótidos para realizar las reacciones de PCR, además de 100 mM dNTPs (incluyendo los 4 desoxinucleótidos), 10 pmol de cada oligonucleótido y 0.05 u/ μ L de Taq DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*, Gibco BRL-Life Technologies, Rockville MD) y como componentes adicionales: Buffer 10X PCR y MgCl₂ 50 mM. Las amplificaciones del mRNA CYP1A fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100 MJ Research, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización (1 min a 95 °C), alineamiento (1 min a 58 °C) y elongación (1 min a 72 °C), durante 36 ciclos, además de una incubación final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron corridos junto con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos en bromuro de etidio donde se observó la aparición de un fragmento de aproximadamente 564 pb correspondiente al mRNA CYP1A.

TABLA 5

Secuencias y datos técnicos de los oligonucleótidos utilizados (Zapata, 2002).

Upper Primer: 20-mer 5'CTTTGGCCGGCGCTATGACC 3' - a U CYP1A		
Lower Primer: 22 mer 5'GTGCAGTGCGGGATTGTGAAGG...3' - b L		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	61.2	61.2
Primer Overall Stability	-45.0 kc/m	-44.3 kc/m
Primer Location	307.326	870.849
Product Tm – Primer Tm	16.7°C	
Primer Tm Difference	0.0 °C	
Optimal Annealing Temperature	58.0 °C	
Product Length	564 bp (fragmento esperado)	
Product Tm (%GC Method)	77.9 °C	
Product GC Conten	46.8%	
Product Tm at 6xSSC	99.5 °C	

6.4 Análisis estadístico

Las actividades enzimáticas y concentraciones de vitelogenina fueron calculadas como promedios y desviaciones estándar.

Se evaluó la normalidad de los datos utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Para determinar las diferencias significativas de los indicadores bioquímicos de contaminación entre tratamientos se realizó la prueba paramétrica de ANOVA (de una vía) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para tres o más tratamientos, mientras que la prueba de t studentse utilizó para la comparación de dos tratamientos. El nivel de significancia estadística fue de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Statistic 9.0.

7 RESULTADOS

7.1 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán

7.1.1 Vitelogenina (VTG)

Los catanes expuestos a 17β -estradiol (E2) tuvieron concentraciones más altas de VTG en comparación con los catanes del grupo control (C), siendo consistente y significativa la variación para todos los tejidos analizados (hígado $F=29.55$, $P=0.0001$, $gl=23$; plasma $F=28.10$, $P=0.0001$, $gl=23$; branquias $F=66.35$, $P=0.0001$, $gl=23$; mucus $F=11.10$, $P=0.0001$, $gl=23$). Con este tratamiento (E2), la concentración más alta de VTG se presentó en hígado, seguido por los valores en branquias, plasma y finalmente la más baja fue en mucus, siendo significativa esta diferencia únicamente entre el hígado y los demás tejidos ($F= 16.44$, $P=0.0001$, $gl= 17$).

Por el contrario, los catanes expuestos a β -naftoflavona (H) y a diazinon (OP) no presentaron variaciones significativas en la concentración de VTG con respecto al grupo control, para todos los tejidos analizados. Con estos tratamientos (H y OP), la concentración más alta de VTG se presentó en hígado y branquias, sin diferencias significativas entre estos dos tejidos, seguidos por la concentración en plasma y finalmente la más baja fue en mucus, siendo estos dos tejidos diferentes significativamente a los anteriores (H: $F= 24.88$, $P=0.0001$, $gl= 23$; OP: $F= 24.88$, $P=0.0001$, $gl= 23$), (figura 9; tabla 6).

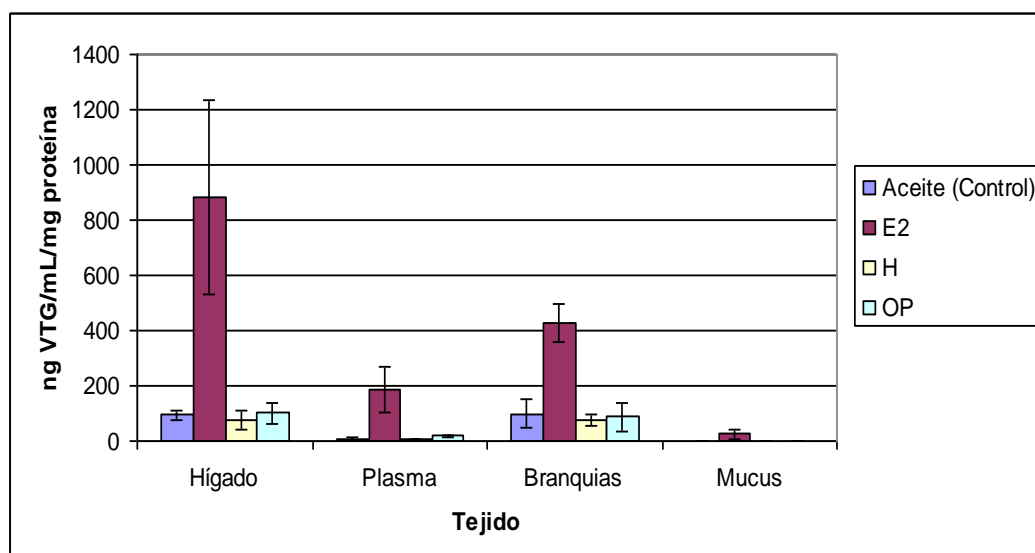


Figura 9. Concentración promedio (ng vtg/mL) de vitelogenina en diversos tejidos evaluados de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos de forma directa.

TABLA 6

Concentración promedio de vitelogenina en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos del mismo tejido, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tejidos del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador Vitelogenina (ng VTG / mL / mg proteína)			
	Hígado	Plasma	Branquias	Mucus
Aceite (Control)	93.79 ±19.03 B, a	7.18 ±5.6 B, b	98.33 ±51.81 B, a	0 B, c
17β-Estradiol	882.87 ±353.71 A, a	186.63 ±81.69 A, c	430.38 ±69.69 A, b	25.97 ±18.53 A, d
β-Naftoflavona	74.14 ±33.72 B, a	3.94 ±3.5 B, b	74.22 ±22.98 B, a	0 B, b
Diazinon	100.23 ±36.36 B, a	17.32 ±2.56 B, b	86.52 ±51.64 B, a	0 B, b

7.1.2 Esterasas: acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad AChE, solo fue posible detectarla en las muestras de hígado de los catanes utilizados en todos los tratamientos.

La actividad AChE en hígado fue significativamente menor en los catanes expuestos al pesticida organofosforado (OP) con respecto a los catanes de los otros tratamientos C, E2 y H ($F= 18.79$, $P=0.0001$, $gl= 35$). Sin embargo, entre estos tres tratamientos no se presentó diferencia significativa entre ellos (figura 10).

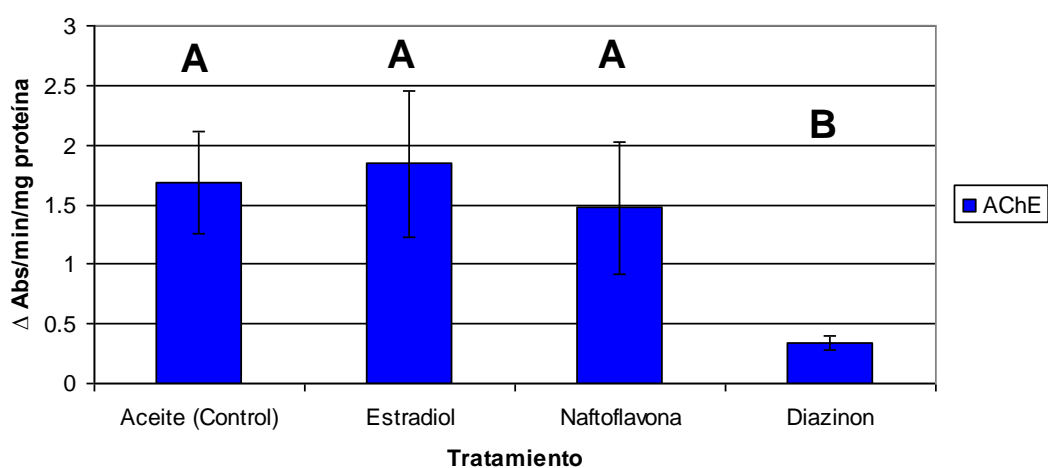


Figura 10. Actividad promedio de acetilcolinesterasa en hígado de catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.

7.1.3 Esterasas: butirilcolinesterasa (BChE)

Al igual que en el caso anterior, la actividad BChE, solo fue posible detectarla en las muestras de hígado de los catanes utilizados en todos los tratamientos.

La actividad BChE en hígado fue significativamente mayor en los catanes expuestos al hidrocarburo naftoflavona (H), seguido de los catanes del grupo control (C) y los expuestos a estradiol (E2), sin diferencias significativas entre ambos. Y finalmente, los catanes expuestos a diazinon (OP) presentaron la menor actividad de BChE, siendo estos valores estadísticamente significativos con los otros tratamientos ($F= 73.09$, $P=0.0001$, $gl= 35$) (figura 11).

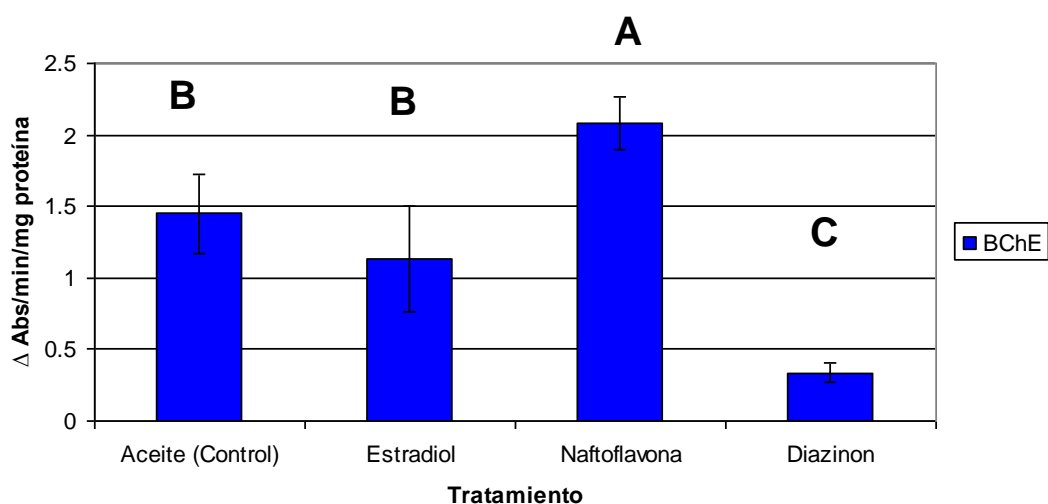


Figura 11. Actividad promedio de butirilcolinesterasa en hígado de catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.

7.1.4 Esterasas: carboxilesterasa (CaE)

A diferencia de las dos esterazas anteriores (AChE y BChE) la actividad CaE si fue posible detectarla en los tres tipos de tejidos analizados (tabla 7). En las muestras de hígado este indicador presentó el mismo patrón descrito para la AChE, siendo los catanes expuestos a diazinon (OP) los únicos que presentan una variación significativa menor respecto a los otros tratamientos ($F= 22.08$, $P=0.0001$, $gl= 35$).

En el caso de las muestras de branquias, este patrón se repite parcialmente, ya que los catanes expuestos a estradiol (E2) presentaron una actividad ligeramente menor a los catanes control, y ligeramente mayor a los expuestos a diazinon (OP), pero sin ser significativas estas diferencias, mientras que los catanes expuestos a diazinon (OP) presentaron una actividad significativamente menor a los catanes control ($F= 4.74$, $P=0.0075$, $gl= 35$).

En el caso de las muestras de plasma, la actividad CaE detectada fue muy baja en los catanes de todos los tratamientos y no se presentaron diferencias significativas entre estos ($F= 0.204$, $P=0.892$, $gl= 35$).

Por otra parte, en todos los catanes analizados la actividad CaE fue mayor en las muestras de hígado, seguido por las de branquias y la mas baja se presentó en plasma, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (C:F= 475.7, $P=0.0001$, $gl= 26$; E2: $F= 285.35$, $P=0.0001$, $gl= 26$; H: $F= 1118.9$, $P=0.0001$, $gl= 26$; OP: $F= 101.12$, $P=0.0001$, $gl= 26$).

TABLA 7

Actividad tipo carboxilesterasa (CaE) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos del mismo tejido, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tejidos del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador CaE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Hígado	Plasma	Branquias
Aceite (Control)	4.82 ± 0.57 A, a	0.013 ± 0.001 A c	1.77 ± 0.09 A b
17 β -Estradiol	4.72 ± 0.73 A, a	0.013 ± 0.004 A c	1.53 ± 0.08 AB b
β -Naftoflavona	5.05 ± 0.36 A, a	0.012 ± 0.002 A c	1.88 ± 0.16 A b
Diazinon	3.26 ± 0.27 B, a	0.013 ± 0.002 A c	1.20 ± 0.80 B b

7.1.5 Fosfatasa alcalina (ALP)

La actividad ALP no fue detectada en las muestras de plasma de todos los organismos analizados (tabla 8). En el caso de las muestras de hígado, la mayor actividad ALP se presentó en los catanes expuestos a diazinon (OP) siendo este valor significativamente diferente con los catanes control (C) y los expuestos a naftoflavona (H), no así con el tratamiento con estradiol (E2) ($F= 7.894$, $P=0.0004$, $gl= 35$). Por otra parte, en las muestras de branquias, no se presentaron diferencias significativas en la actividad ALP entre todos los tratamientos realizados ($F= 0.0139$, $P=0.997$, $gl= 35$).

Al comparar la actividad ALP entre tejidos, los valores de actividad promedio son más altos en las muestras de hígado con respecto a las de branquias pero esta diferencia solo fue significativa en los tratamientos con estradiol (E2) y diazinon (OP), mientras que en plasma no se detectó actividad de esta enzima (C: $F= 92.825$,

P= 0.0001, gl= 26; E2: F= 104.34, P=0.0001, gl= 26; H: F= 118.04, P= 0.0001, gl= 26; OP: F= 27.244, P= 0.0001, gl= 26).

TABLA 8

Actividad tipo fosfatasa alcalina (ALP) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos del mismo tejido, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tejidos del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador ALP (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Hígado	Plasma	Branquias
Aceite (Control)	7.83 ± 2.23 B, a	0 A b	6.68 ± 0.46 A a
17 β -Estradiol	8.51 ± 2.02 AB, a	0 A c	6.49 ± 1.01 A b
β -Naftoflavona	6.11 ± 0.41 B, a	0 A b	6.51 ± 1.69 A a
Diazinón	11.05 ± 3.15 A, a	0 A c	6.66 ± 4.55 A b

7.1.6 Fosfatasa ácida (ACP)

Al igual que la fosfatasa alcalina (ALP), la actividad de fosfatasa ácida (ACP) tampoco fue detectada en las muestras de plasma (tabla 9). Por otra parte, tanto en las muestras de hígado, como en las de branquias, no se registraron diferencias significativas en la actividad ACP entre los catanes expuestos a los diferentes tratamientos (hígado: F= 0.658, P=0.583, gl= 35; branquias: F= 0.252, P=0.859, gl= 35).

Con respecto a la actividad ACP entre tejidos esta fue mayor para las muestras de hígado siendo estadísticamente significativo en todos los tratamientos (C: F= 112.28,

P=0.0001, gl= 26; E2: F= 269.76, P=0.0001, gl= 26; H: F= 32.031, P=0.0001, gl= 26; OP: F= 85.379, P=0.0001, gl= 26).

TABLA 9

Actividad tipo fosfatasa ácida (ACP) en diversos tejidos de catanes expuestos a diferentes tipos de xenobióticos. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos del mismo tejido, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tejidos del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador ACP (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Hígado	Plasma	Branquias
Aceite (Control)	0.34 ± 0.09 A, a	0 A b	0.029 \pm 0.14 A b
17 β -Estradiol	0.36 ± 0.06 A, a	0 A b	0.031 \pm 0.011 A b
β -Naftoflavona	0.29 ± 0.15 A, a	0 A b	0.029 \pm 0.015 A b
Diazinón	0.31 ± 0.09 A, a	0 A b	0.026 \pm 0.03 A b

7.1.7 Superóxido Dismutasa (SOD)

Esta actividad solo fue ensayada en muestras de hígado y en este caso no se presentaron variaciones significativas en la actividad SOD al comparar los distintos tratamientos evaluados (F= 2.479, P=0.090, gl= 23), aunque se observó una menor actividad promedio en los catanes expuestos a β -naftoflavona (H) (figura 12).

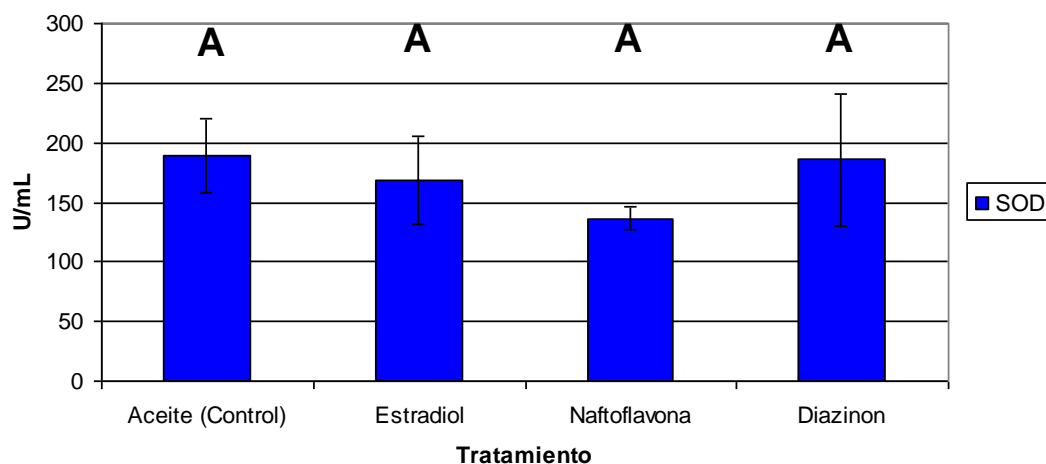


Figura 12. Actividad promedio de SOD en catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.

7.1.8 Glutación-s-transferasa totales (GST_t)

Al igual que en la SOD esta actividad solo fue evaluada en muestras de hígado. Sin embargo, en este caso si fue posible detectar diferencias significativas en la actividad GST entre tratamientos ($F= 13.37$, $P=0.00005$, $gl= 23$). Los catanes del tratamiento control, así como los expuestos a diazinon (OP) presentaron mayor actividad que los expuestos a estradiol (E2) y a naftoflavona (H) (figura 13).

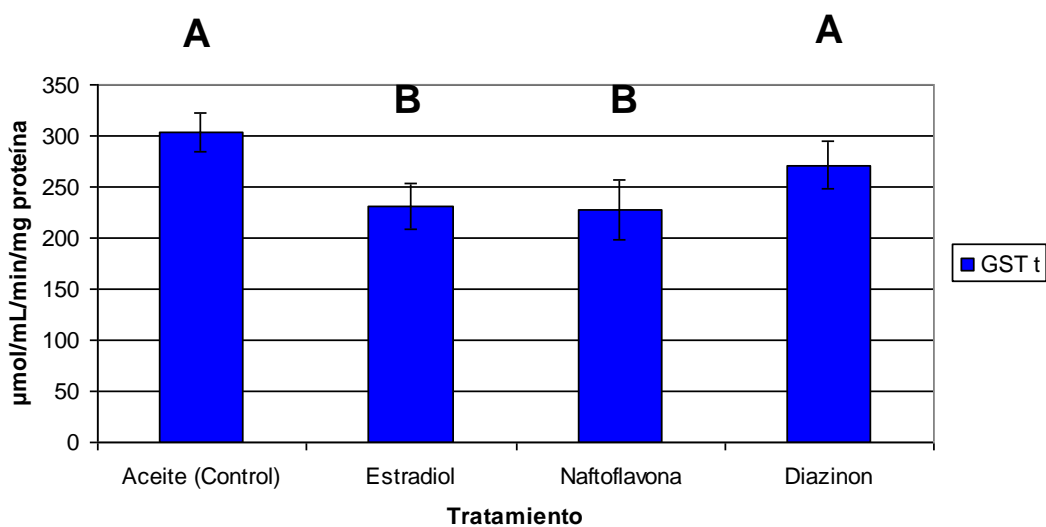


Figura 13. Actividad promedio de GST_t en catanes de los distintos tratamientos (xenobióticos evaluados) mediante inducción directa.

7.1.9 Citocromo P450 (CYP1A)

7.1.9.1 Inmunodifusión

Muestras de hígado (extractos completos) fueron analizadas utilizando un anticuerpo comercial policlonal contra proteínas del CYP1A, los cuales fueron elaborados utilizando dos péptidos sintéticos a partir de la secuencia del CYP1A de trucha arcoíris (Biosense). Sin embargo, no se pudieron observar líneas de precipitación entre este anticuerpo y las muestras de catán (figura 14).

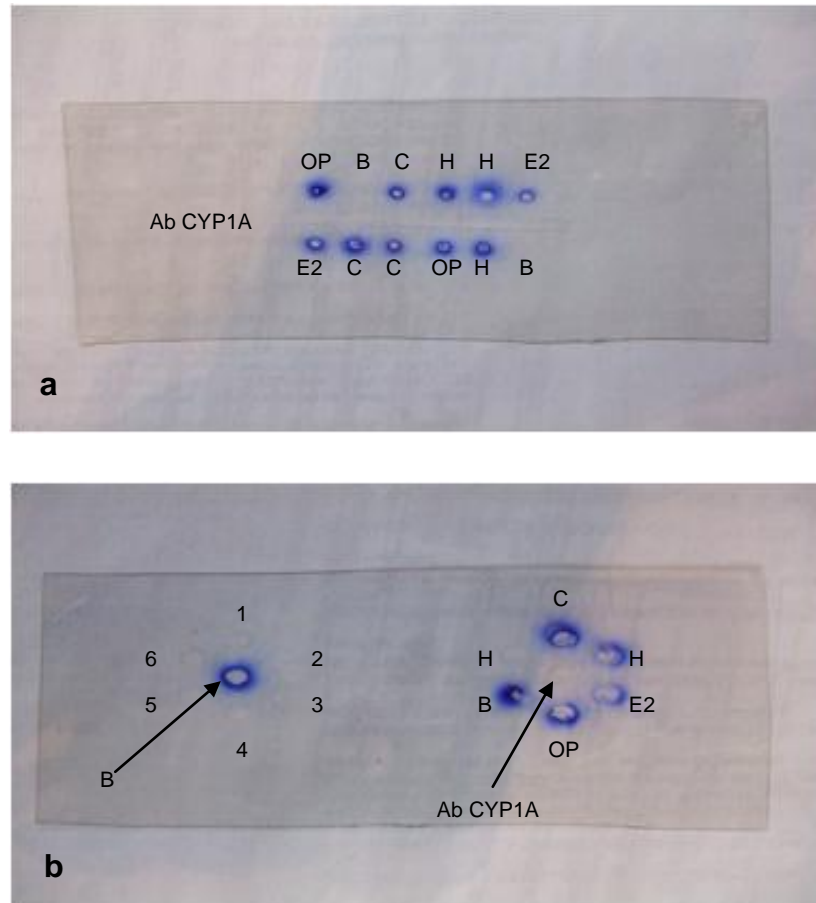


Figura 14. Inmunodifusión doble en geles de agarosa al 1% con las muestras de los catanes expuestos a los distintos tratamientos y donde se observa la ausencia de halos de precipitación. **a)** Línea central con anticuerpo CYP1A (1:500); B, blanco (buffer dilución); E2, 17 β -estradiol; H, β -naftoflavona; OP, diazinón; C, control. **b)** B, blanco (buffer dilución); 1, Ab CYP1A (1:3000); 2, Ab CYP1A (1:1500); 3, Ab CYP1A (1:1000); 4, Ab CYP1A (1:500); 5, Ab CYP1A (1:300); 6, Ab CYP1A (1:100); C, control; H, β -naftoflavona; E2, 17 β -estradiol; OP, diazinón.

7.1.9.2 Actividad enzimática EROD del CYP1A

Las muestras de extractos de hígado y branquias fueron evaluadas para determinar la actividad EROD utilizando el método espectrofotométrico de Klotz *et al.* (1984). Sin embargo, no se obtuvo registro de reacción en ninguna de las muestras. Cabe mencionar que la técnica fue previamente estandarizada utilizando muestras de hígado de tilapias inyectadas con naftoflavona en condiciones iguales a las realizadas con catán, obteniendo en este caso un claro registro de la actividad enzimática (figuras 15, 16, y 17).

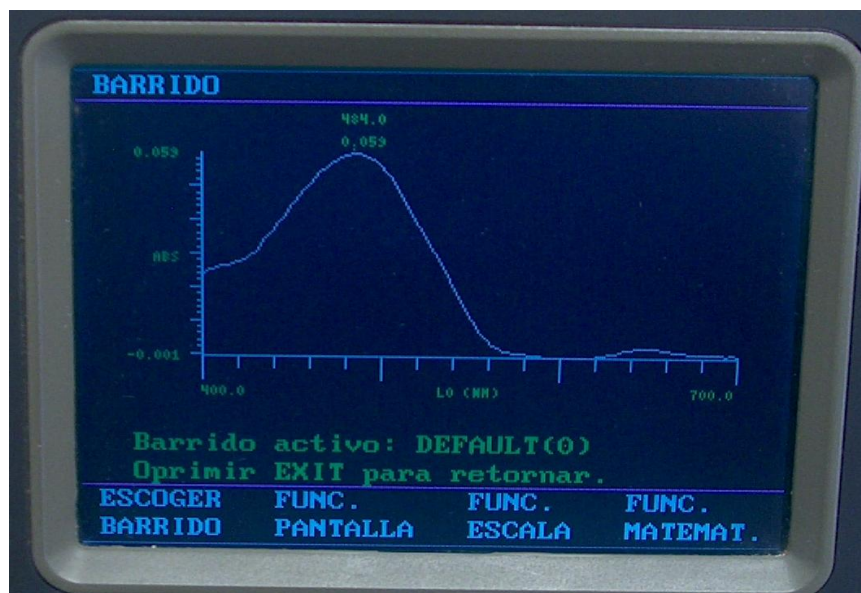


Figura 15. Fotografía del espectro de absorbancia a 482 nm mostrando la presencia del sustrato 7-ethoxyresorufin utilizado para determinar la actividad EROD en las muestras microsomaes de catanes y tilapia.

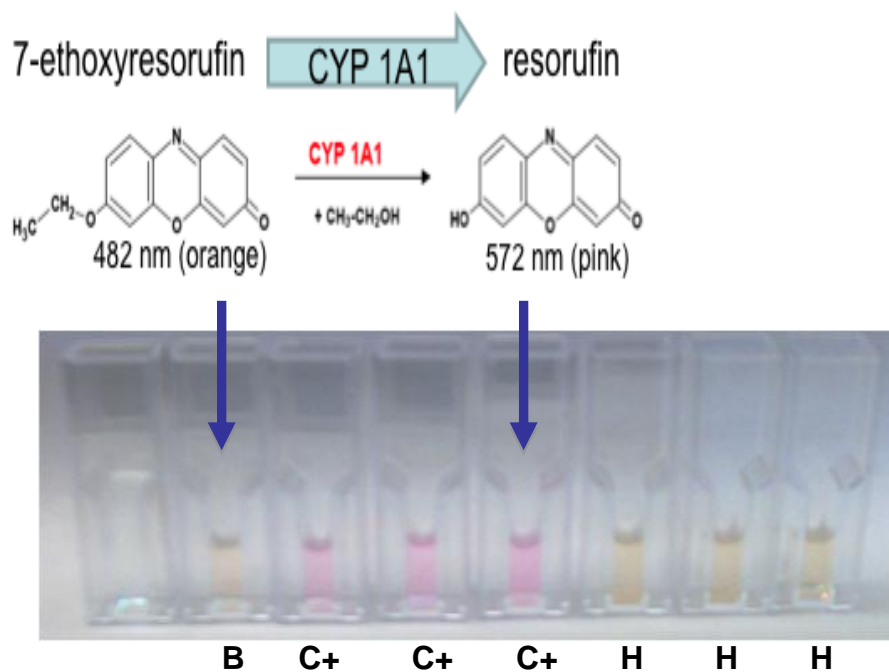


Figura 16. Fotografía de las cubetas correspondientes a las muestras microsomas de hígado de tilapia (C+), y las cubetas correspondientes a las muestras microsomas de hígado de catán (H).

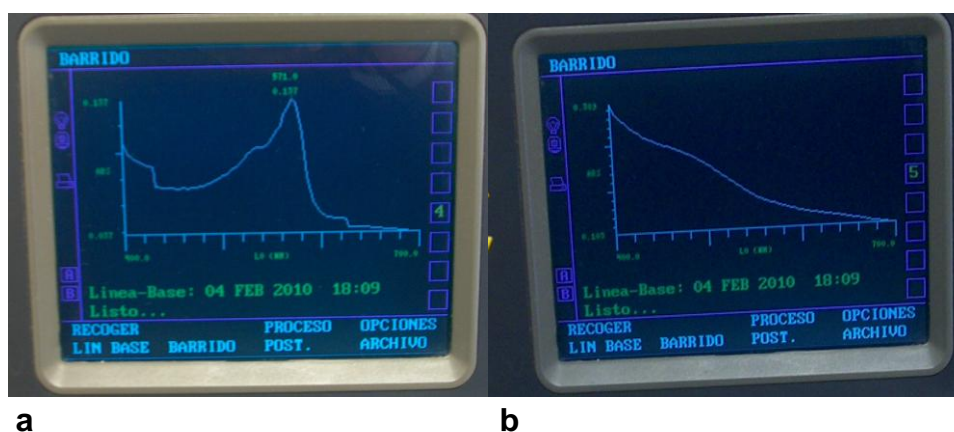


Figura 17. **a)** Pico de absorbancia a 572 nm correspondiente al producto de la actividad EROD (resorufin) en las muestras microsomas de tilapia inducida con β -naftoflavona; **b)** Barrido espectrofotométrico a 572 nm en las muestras microsomas de catán.

7.1.9.3 Expresión del mRNA CYP1A

De la misma forma que las dos pruebas anteriores, esta técnica no dio resultados positivos en las muestras de catán analizadas. Con los primers utilizados no se obtuvo el producto de PCR esperado el cual consiste en un fragmento de aproximadamente 564 pb correspondiente al mRNA CYP1A. Igualmente la técnica también fue previamente probada con muestras de hígado de tilapias inyectadas con naftoflavona (figuras 18 y 19).

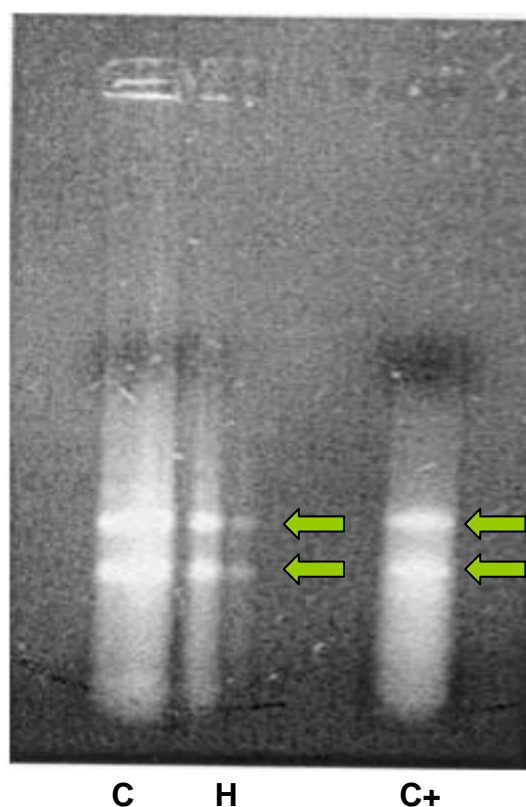


Figura 18. Gel de agarosa mostrando las bandas de RNA obtenido de las muestras de hígado de catán expuesto a β -naftoflavona (H), catán control (C) y tilapia expuesta a β -naftoflavona (C+).

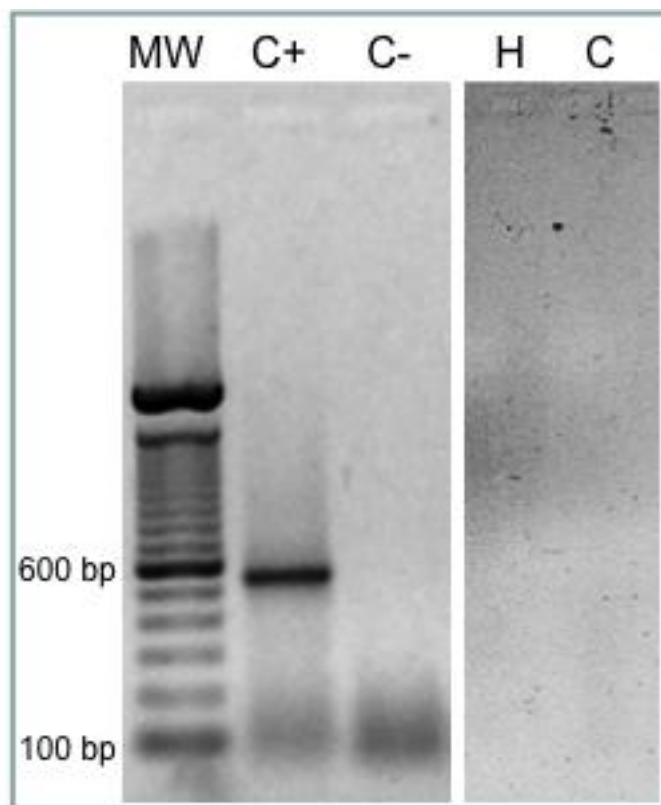


Figura 19. Geles de agarosa mostrando los productos de las reacciones de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para tilapia (MW, marcador de 100 pb; C+, tilapia tratada con β -naftoflavona; C-, tilapia control; H, catán tratado con β -naftoflavona; C, catán del grupo control), CYP1A1 (564 pb).

7.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades

7.2.1 Vitelogenina (VTG)

Los catanes expuestos a 17β -estradiol (E2) de las edades evaluadas (6, 12 y 24 meses) presentaron concentraciones significativamente más altas de VTG que los catanes del grupo control (C), así como en los expuestos a naftoflavona (H) y diazinon (OP) (6 meses: $F= 26.319$, $P=0.0001$, $gl= 23$; 12 meses: $F= 15.024$, $P=0.0013$, $gl= 11$; 24 meses: $F= 29.550$, $P=0.0001$, $gl= 23$). Igualmente, entre estos tres tratamientos (C, H y OP) no se presentaron diferencias significativas en la concentración de VTG para las tres edades (tabla 10).

Con respecto a la edad de los organismos solamente se encuentra diferencia significativa en la concentración de VTG entre los catanes de 6 y 24 meses del grupo control ($F= 6.683$, $P=0.010$, $gl= 15$). Mientras que para los otros tratamientos no se observan diferencias significativas en la concentración de VTG entre las diferentes edades (E2: $F= 1.347$, $P=0.294$, $gl= 15$; H: $F= 3.240$, $P=0.072$, $gl= 15$; OP: $t= 1.796$, $P=0.102$, $gl= 11$).

TABLA 10

Concentración promedio de vitelogenina en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador VTG (ng vtg/mL/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	202.56 ±52.05 B, a	161.60 ±80.99 B ab	93.79 ±19.03 B b
17β-Estradiol	1076.72 ±409.86 A, a	699.39 ±269.04 A a	882.87 ±353.71 A a
β-Naftoflavona	166.66 ±91.81 B, a	136.80 ±42.02 B a	74.14 ±33.72 B a
Diazinón	161.77 ±75.60 B, a	nd*	100.23 ±36.36 B a

nd: Tratamiento no evaluado.

7.2.2 Esterasas: acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad AChE en catanes de 6 meses fue significativamente mayor en los catanes control (C) respecto a los otros tratamientos ($F= 43.762$, $P=0.0001$, $gl= 35$), seguido de los catanes expuestos a naftoflavona (H) el cual también es significativamente mayor a los catanes expuestos a estradiol (E2) y diazinon (OP), sin ser estos significativamente diferentes (tabla 11).

En catanes de 12 meses la actividad AChE fue mayor en los catanes expuestos a estradiol (E2) con respecto a los catanes del grupo control (C) y los expuestos a naftoflavona (H), sin embargo, esta variación solo fue significativa entre los

tratamientos de estradiol (E2) y el grupo control (C) ($F= 8.972$, $P=0.015$, $gl= 8$). Mientras que en los catanes de 24 meses solo se observa un valor significativamente menor para los catanes expuestos a diazinon (OP) con respecto a los otros tres tratamientos ($F= 18.791$, $P=0.0001$, $gl= 35$).

En el caso de los catanes del grupo control (C) y los expuestos a diazinon (OP) no se presentaron diferencias significativas en la actividad AChE entre los catanes de las edades evaluadas (C: $F= 1.309$, $P=0.295$, $gl= 20$; OP: $t= -1.833$, $P=0.104$, $gl= 17$). Por otra parte en los catanes expuestos a estradiol (E2) solo los catanes de 6 meses presentaron actividad AChE menor que los catanes de 12 y 24 meses ($F= 20.658$, $P=0.0001$, $gl= 20$), mientras que los expuestos a naftoflavona (H) solo los catanes de 12 meses presentaron actividad AChE significativamente mayor con respecto a los de 6 meses ($F= 4.224$, $P=0.031$, $gl= 20$).

TABLA 11

Actividad acetilcolinesterasa (AChE) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador AChE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	1.99 ± 0.48 A, a	1.67 ± 0.14 B a	1.68 ± 0.43 A a
17 β -Estradiol	0.62 ± 0.41 C, b	2.45 ± 0.34 A a	1.84 ± 0.61 A a
β -Naftoflavona	1.23 ± 0.24 B, b	2.01 ± 0.11 AB a	1.47 ± 0.55 A ab
Diazinón	0.27 ± 0.06 C, a	Nd*	0.34 ± 0.06 B a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.3 Esterasas: butirilcolinesterasa (BChE)

La actividad BChE en catanes de 6 meses fue significativamente mayor en los catanes del grupo control (C) respecto a los otros tratamientos, seguidos por los catanes expuestos a naftoflavona (H) y estradiol (E2), sin diferencias significativas entre estos, mientras que los catanes expuestos a diazinon (OP) la actividad BChE presentó los valores significativamente menores ($F= 16.692$, $P=0.0001$, $gl= 35$) (tabla 12).

Para los catanes de 12 meses no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos realizados ($F= 0.469$, $P=0.646$, $gl= 8$). Mientras que a 24 meses nuevamente se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 73.098$, $P=0.0001$, $gl= 35$), siendo mas destacable el menor valor presentado en lo catanes expuestos a diazinon (OP).

Con respecto a las variaciones de actividad BChE entre diferentes edades, destacan los valores significativamente menores de los catanes de 6 meses respecto a los de 12 y 24 meses para los tratamientos del grupo control, estradiol y naftoflavona (C: $F= 14.603$, $P=0.0001$, $gl= 20$; E2: $F= 23.571$, $P=0.0001$, $gl= 20$; H: $F= 81.877$, $P=0.0001$, $gl= 20$). Mientras que en los catanes expuestos a diazinon (OP) no se presentan diferencias significativas entre catanes de 6 y 24 meses ($t= 0.646$, $P=0.527$, $gl= 17$).

TABLA 12

Actividad butirilcolinesterasa (BChE) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador BChE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	0.85 ± 0.21 A, b	1.25 ± 0.10 A a	1.44 ± 0.28 B a
17 β -Estradiol	0.39 ± 0.15 B, b	1.49 ± 0.29 A a	1.12 ± 0.37 B a
β -Naftoflavona	0.59 ± 0.19 B, c	1.47 ± 0.51 A b	2.08 ± 0.18 A a
Diazinón	0.36 ± 0.07 C, a	nd*	0.33 ± 0.07 C a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.4 Esterasas: carboxilesterasa (CaE)

La actividad CaE en catanes de 6 meses presentó el mismo comportamiento que la BChE, siendo significativamente mayor en los catanes del grupo control (C), seguidos por los catanes expuestos a naftoflavona (H) y estradiol (E2), mientras que los catanes expuestos a diazinon (OP) presentaron los menores valores ($F= 37.368$, $P=0.0001$, $gl= 35$). En catanes de 12 meses los expuestos a estradiol (E2) presentaron mayor actividad CaE ($F= 17.855$, $P=0.0001$, $gl= 17$), mientras que en catanes de 24 meses se repite el patrón encontrado para la actividad AChE donde los organismos expuestos a diazinon (OP) presentan una clara inhibición de esta actividad enzimática ($F= 22.085$, $P=0.0001$, $gl= 35$).

Con respecto a las variaciones de actividad CaE entre catanes de las edades evaluadas se observan diferencias significativas para todos los tratamientos (C: F= 16.594, P=0.0001, gl= 23; E2: F= 23.723, P=0.0001, gl= 23; H: F= 135.66, P=0.0001, gl= 23; OP: t= 11.07, P=0.0001, gl= 17), siendo generalmente mayores los valores de actividad para los catanes de 24 meses (tabla 13).

TABLA 13

Actividad carboxilesterasa (CaE) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador CaE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	4.38 \pm 0.84 A, a	2.75 \pm 0.62 B b	4.82 \pm 0.57 A a
17 β -Estradiol	2.75 \pm 0.31 B, b	4.21 \pm 0.78 A a	4.72 \pm 0.73 A a
β -Naftoflavona	3.06 \pm 0.24 B, b	2.01 \pm 0.51 B c	5.05 \pm 0.36 A a
Diazinón	2.10 \pm 0.14 C, b	nd*	3.26 \pm 0.27 B a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.5 Fosfatasa alcalina (ALP)

En los catanes de 6 meses se presentan diferencias en la actividad ALP ($F= 3.994$, $P=0.015$, $gl= 35$), sin embargo, estas solo son significativas entre los catanes expuestos a estradiol (E2) con los expuestos a diazinon (OP) (tabla 14). Mientras que en catanes de 12 meses la actividad ALP fue significativamente mayor en los organismos expuestos a estradiol (E2) respecto a los del grupo control y los expuestos a naftoflavona (H) ($F= 10.730$, $P=0.0012$, $gl= 17$). Finalmente en el caso de los catanes de 24 meses también se presentaron diferencias entre tratamientos ($F= 7.894$, $P=0.0004$, $gl= 35$), pero solo fueron significativas entre los catanes del grupo control (C) con los expuestos a diazinon (OP).

Lo relativo a la actividad ALP entre catanes de las edades evaluadas, se presentaron diferencias significativas en las tres edades de los catanes expuestos a naftoflavona (H) (H: $F= 18.263$, $P=0.0001$, $gl= 23$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las edades para los tratamientos control, estradiol (E2) y diazinon (OP) (C: $F= 0.885$, $P=0.428$, $gl= 23$; E2: $F= 2.236$, $P=0.132$, $gl= 23$; OP: $t= -0.835$, $P=0.415$, $gl= 17$).

TABLA 14

Actividad fosfatasa alcalina (ALP) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador ALP (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	7.69 \pm 3.33 AB, a	6.17 \pm 1.18 B a	7.83 \pm 2.23 B a
17 β -Estradiol	7.04 \pm 1.22 B, a	8.92 \pm 2.39 A a	8.51 \pm 2.02 AB a
β -Naftoflavona	7.99 \pm 1.49 AB, a	4.26 \pm 1.42 B c	6.11 \pm 0.41 B b
Diazinón	10.12 \pm 1.08 A, a	nd*	11.05 \pm 3.15 A a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.6 Fosfatasa ácida (ACP)

Los catanes de las tres edades evaluadas tuvieron pocas variaciones en la actividad promedio de ACP (tabla 15). Tanto en catanes de 6 y 24 meses no se presentaron diferencias significativas en la actividad ACP entre los tratamientos realizados (6 meses: $F= 0.715$, $P=0.0.631$, $gl= 35$; 24 meses: $F= 0.658$, $P=0.583$, $gl= 35$). Mientras que en los catanes de 12 meses solo los catanes expuestos a estradiol (E2) presentaron una actividad significativamente mayor de ACP ($F= 5.152$, $P=0.019$, $gl= 17$).

Igualmente al comparar entre las edades encontramos que los catanes de 12 meses fueron los que presentaron una actividad ACP significativamente menor para todos los tratamientos (C: $F= 63.711$, $P=0.0001$, $gl= 23$; E2: $F= 165.07$, $P=0.0001$, $gl= 23$; H: $F= 28.545$, $P=0.0001$, $gl= 23$; OP: $t= 2.043$, $P=0.075$, $gl= 17$).

TABLA 15

Actividad fosfatasa ácida (ACP) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador ACP (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	0.402 ± 0.05 A, a	0.201 ± 0.005 B b	0.343 ± 0.09 A a
17 β -Estradiol	0.404 ± 0.01 A, a	0.341 ± 0.013 A b	0.364 ± 0.06 A a
β -Naftoflavona	0.408 ± 0.05 A, a	0.201 ± 0.004 B b	0.298 ± 0.15 A ab
Diazinón	0.401 ± 0.03 A, a	nd*	0.318 ± 0.09 A a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.7 Superóxido Dismutasa (SOD)

Los catanes de 6 meses expuestos a estradiol (E2), naftoflavona (H) y diazinon (OP) tuvieron actividades SOD mayores con respecto al grupo control, siendo significativa con los catanes expuestos diazinon ($F= 6.587$, $P=0.0028$, $gl= 23$), mientras que los catanes de 12 meses tuvieron un incremento significativo de la actividad SOD en el tratamiento con estradiol ($F= 35.789$, $P=0.0080$, $gl= 5$). En los catanes de 24 meses no se presentaron variaciones significativas de la actividad de SOD ($F= 2.479$, $P=0.090$, $gl= 23$). Los valores de actividad promedio de SOD en los distintos tratamientos se muestran en la tabla 16.

Con respecto a las tres edades evaluadas los catanes de 6 meses presentaron la menor actividad de SOD siendo significativo en el tratamiento con estradiol (E2) ($F=5.053$, $P=0.028$, $gl=13$) y el grupo control ($F=13.195$, $P=0.001$, $gl=13$).

TABLA 16

Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador SOD (U/mL)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	88.4 ± 38.8 B, b	139.0 ± 5.5 B ab	188.8 ± 31.6 A a
17 β -Estradiol	112.7 ± 43.7 B, b	199.2 ± 13.3 A a	168.3 ± 37.2 A ab
β -Naftoflavona	115.1 ± 29.2 B, a	114.6 ± 10.7 B a	136.3 ± 10.7 A a
Diazinón	170.4 ± 9.9 A, a	nd*	185.6 ± 55.4 A a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.8 Glutación-s-transferasa totales (GST_t)

En catanes de 6 meses la actividad GST_t fue significativamente mayor para el grupo control (C) respecto a los tratamientos con estradiol (E2), naftoflavona (H) y diazinon (OP) ($F=11.266$, $P=0.0001$, $gl=23$). Mientras que en catanes de 12 meses la diferencia se presentó por los menores valores en catanes expuestos a naftoflavona respecto al control y estradiol ($F=85.796$, $P=0.0022$, $gl=5$). Finalmente en el caso de

catanes de 24 meses, tanto el grupo control como los expuestos a diazinon presentaron los mayores valores de actividad GST_t respecto a los expuestos a estradiol y naftoflavona (F= 13.378, P=0.0001, gl= 23).

En cuanto a la variación de actividad GST_t entre catanes de las edades evaluadas, solamente se presentaron diferencias en el tratamiento control entre organismos de 6 y 12 meses (F= 5.459, P=0.023, gl= 13) y en los expuestos a diazinon entre organismos de 6 y 24 meses (t= -9.627, P=0.0001, gl= 11). Los valores de actividad promedio de GST_t en los distintos tratamientos se muestran en la tabla 17.

TABLA 17

Actividad glutatión-s-transferasa (GST_t) en hígado de catanes de diferentes edades. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma edad, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre edades del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador GST (μmol/mL/min/mg proteína)		
	Catán 6 meses	Catán 12 meses	Catán 24 meses
Aceite (Control)	333.4 ±25.3 A, a	282.1 ±0.2 A b	302.9 ±19.2 A ab
17β-Estradiol	241.9 ±81.7 B, a	264.0 ±2.2 A a	230.8 ±22.7 B a
β-Naftoflavona	236.3 ±47.5 B, a	222.6 ±7.7 B a	228.1 ±29.4 B a
Diazinón	168.8 ±12.1 B, b	nd*	271.4 ±23.1 A a

nd: Tratamiento no evaluado

7.2.9 Citocromo P450 (CYP1A)

7.2.9.1 Actividad enzimática EROD del CYP1A

No se obtuvo registro de reacción de actividad EROD en ninguna de las muestras de hígado, tanto extractos completos como de la fracción microsomal en catanes de las edades evaluadas.

7.2.9.2 Proteínas del Citocromo P450 por Electroforesis

En este caso se realizó un gel de electroforesis con la fracción microsomal de hígado en catanes de 6 meses. En todos los carriles correspondientes a las muestras de los tratamientos evaluados se seleccionaron 11 bandas para ser comparadas (tabla 18). En el carril correspondiente al tratamiento con estradiol las bandas más notorias fueron en orden descendente, banda 6 (66.5 kDa y 18.5 % de banda), banda 11 (31.6 kDa y 17.4 % de banda), banda 5 (71.8 kDa y 11 % de banda), y banda 7 (63.3 kDa y 10.8 % de banda). En el carril correspondiente a naftoflavona las bandas más notorias fueron, banda 11 (32.8 % de banda), banda 7 (11.7 % de banda), banda 3 (92.8 kDa y 11.4 % de banda), y banda 6 (9.7 % de banda). En el carril correspondiente al control las bandas más notorias fueron, banda 11 (22.9 % de banda), banda 7 (13.1 % de banda), banda 3 (12.9 % de banda), y banda 6 (12 % de banda). En el carril correspondiente al diazinon las bandas más notorias fueron, banda 11 (25.2 % de banda), banda 7 (17.4 % de banda), banda 3 (12.7 % de banda), y banda 10 (51 kDa y 12 % de banda). La banda de proteína 11 fue la que mayor

concentración tuvo en todos los tratamientos y su mayor expresión fue en el tratamiento con naftoflavona (figura 20).

TABLA 18

Valores de concentración de proteína expresados como porcentaje de intensidad de banda en los carriles correspondientes a las muestras de los tratamientos evaluados y posteriormente analizados en gel de electroforesis.

Número de banda	PM (kDa)	Carriles			
		E2 % de banda	H % de banda	Control % de banda	OP % de banda
1	140.8	5.4	7.9	9.1	6.4
2	113.8	8.9	3.9	4.9	5.5
3	92.8	9.5	11.4	12.9	12.7
4	75.5	7.9	5.6	7.0	6.4
5	71.8	11.0	6.7	4.6	6.6
6	66.5	18.5	9.7	12.0	4.1
7	63.3	10.8	11.7	13.1	17.4
8	58.9	1.7	2.1	0.4	0.4
9	55.2	1.7	1.2	3.2	3.2
10	51	7.1	7.0	10.0	12.0
11	31.6	17.4	32.8	22.9	25.2

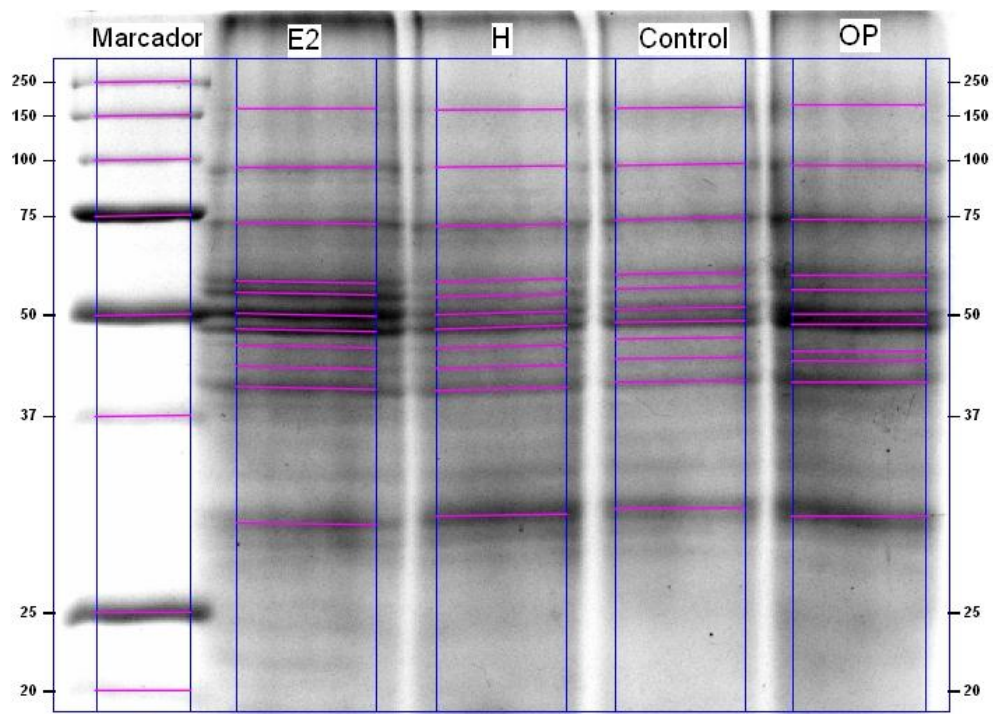


Figura. 20. Gel de electroforesis donde se observan las bandas de proteína en los carriles correspondientes a muestras microsomales de hígado de los tratamientos evaluados. E2, ratas tratadas con 17β-estradiol; H, ratas tratadas con β-naftoflavona; C, ratas grupo control; OP, ratas tratadas con diazinon.

7.2.9.3 Proteínas del CYP1A por Western Blot

Al igual que en las pruebas de inmunodifusión, no se obtuvo registro de reacción en ninguna de las muestras utilizando en este caso un gel de electroforesis de la fracción microsomal en ratones de 6 meses (explicado en la sección anterior) y el anticuerpo comercial policlonal contra proteínas del CYP1A (figura 21).

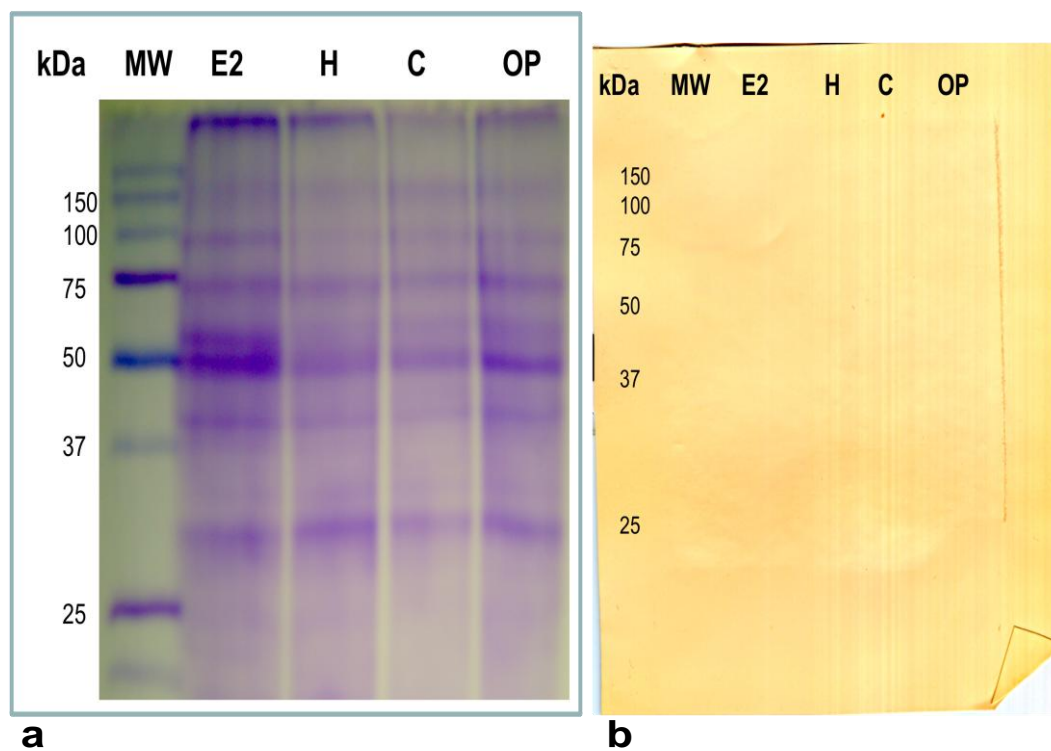


Figura 21. **a)** Gel de poliacrilamida donde se observa la separación de proteínas en muestras microsomales de hígado de ratones correspondientes a los distintos tratamientos evaluados (MW, marcador de peso molecular; E2, ratones tratados con 17 β -estradiol; H, ratones tratados con β -naftoflavona; C, ratones grupo control; OP ratones tratados con diazinon); **b)** Membrana correspondiente al análisis de Western-Blot donde se observa la ausencia de bandas correspondientes a la proteína del CYP1A.

7.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías

7.3.1 Vitelogenina (VTG)

La concentración de VTG en muestras de hígado de catanes de 6 meses expuestos a contaminantes por diferentes vías es presentada en la tabla 19. Los catanes expuestos a estradiol (E2) presentaron concentraciones de VTG significativamente mayores para todas las vías de exposición, directa (D: $F= 26.319$, $P=0.0001$, $gl= 23$); medio acuático (MA: $F= 86.822$, $P=0.0001$, $gl= 17$) y a través del alimento (A: $F= 46.570$, $P=0.0001$, $gl= 11$). Al mismo tiempo cuando los catanes fueron expuestos a los diferentes contaminantes se presentó una concentración estadísticamente mayor de VTG al utilizar la exposición a través del alimento en comparación a la exposición directa o vía el agua (C: $F= 30.172$, $P=0.0001$, $gl= 15$; E2: $F= 24.908$, $P=0.0001$, $gl= 15$; H: $t= 2.43$, $P=0.035$, $gl= 11$).

TABLA 19

Concentración de vitelogenina (VTG) en hígado de catanes de 6 meses de edad expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador VTG (ng vtg/mL/mg proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	202.5 ± 52 B, b	97.2 ± 61 B c	368 ± 42 B a
17β-Estradiol	1076.7 ± 409 A b	1802.8 ± 445 A b	3810.9 ± 997 A a
β-Naftoflavona	166.6 ± 91B, a	78.8 ± 32 B b	nd*
Diazinon	161.7 ± 75 B, a	Nd*	322.1 ± 170.1 B a

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.2 Acetilcolinesterasa (AChE)

Cuando los catanes son expuestos directamente a los contaminantes se presentaron mayores diferencias en la actividad AChE siendo significativamente mayor ($F= 43.762$, $P=0.0001$, $gl= 35$) el grupo control (C) respecto a los otros tratamientos, seguido de los expuestos a naftoflavona (H) y finalmente los expuestos a estradiol (E2) y diazinon (OP), sin diferencia entre estos dos (tabla 20). En el caso de los organismos expuestos vía el alimento, se presentó un valor estadísticamente menor en los expuestos a diazinon respecto al control y estradiol ($F= 28.263$, $P=0.0001$, $gl= 17$). Mientras que entre los expuestos vía el agua no se presentaron

diferencias en la actividad AChE entre los tratamientos analizados ($F= 3.7$, $P=0.39$, $gl= 26$).

Por otra parte, al analizar las formas de exposición, los ratones expuestos a estradiol de forma directa presentaron menor actividad de forma significativa en comparación con los expuestos vía el agua o a través del alimento del mismo tratamiento ($F= 8.251$, $P= 0.002$, $gl= 23$), igualmente hubo una menor actividad en los ratones del tratamiento control en la exposición directa con respecto a la exposición vía el agua y a través del alimento siendo esta diferencia significativa ($F= 39.478$, $P=0.0001$, $gl= 23$).

TABLA 20

Actividad acetilcolinesterasa (AChE) en hígado de ratones expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador AChE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	1.995 \pm 0.48 A, a	1.031 \pm 0.28 A b	1.252 \pm 0.28 A b
17 β -Estradiol	0.622 \pm 0.41C, b	1.061 \pm 0.23 A a	1.257 \pm 0.23 A a
β -Naftoflavona	1.234 \pm 0.24B, a	1.314 \pm 0.19 A a	Nd*
Diazinon	0.272 \pm 0.06 C, a	nd*	0.361 \pm 0.17 B a

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.3 Butirilcolinesterasa (BChE)

La actividad BChE presenta un patrón muy semejante al descrito para AChE (tabla 21). Presentando las mayores diferencias ($F= 16.692$, $P=0.0001$, $gl= 35$) cuando la exposición del contaminante es directa siendo los valores de mayor a menor en el grupo control (C), naftoflavona (H), estradiol (E2) y finalmente el diazinon (OP). En los expuestos vía el alimento, nuevamente se presenta el valor estadísticamente menor en los expuestos a diazinon ($F= 8.901$, $P=0.0073$, $gl= 11$). Mientras que los expuestos a través del agua, a diferencia de la AChE, se presenta un menor valor en los expuestos a estradiol respecto al control y naftoflavona ($F= 3.812$, $P=0.0458$, $gl= 17$).

Al analizar las formas de exposición, solamente se encontró diferencia significativa entre la exposición directa con estradiol y naftoflavona que presentaron menor actividad con respecto a la exposición del mismo tratamiento vía agua y a través del alimento (E2: $F= 9.364$, $P=0.002$, $gl= 18$; H: $t= -3.82$, $P= 0.0021$, $gl= 14$).

TABLA 21

Actividad butirilcolinesterasa (BChE) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador BChE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	0.85 \pm 0.21 A, a	1.214 \pm 0.18 A a	1.183 \pm 0.42 A a
17 β -Estradiol	0.394 \pm 0.15BC, b	0.785 \pm 0.29 B a	0.932 \pm 0.27 A a
β -Naftoflavona	0.590 \pm 0.19B, b	1.111 \pm 0.33 A a	Nd*
Diazinon	0.360 \pm 0.07 C, a	Nd*	0.279 \pm 0.18 B a

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.4 Carboxilesterasa (CaE)

La actividad CaE, nuevamente presenta un patrón muy semejante al descrito para AChE (tabla 22). Presentando las mayores diferencias ($F= 37.368$, $P=0.0001$, $gl= 35$) cuando la exposición del contaminante es directa siendo los valores de mayor a menor en el grupo control, naftoflavona, estradiol y finalmente el diazinon. En los expuestos vía el alimento, nuevamente se presenta el valor estadísticamente menor en los expuestos a diazinon ($F= 11.295$, $P=0.0035$, $gl= 11$). Mientras que los expuestos a través del agua no se presentaron diferencias entre los tratamientos analizados ($F= 1.571$, $P=0.240$, $gl= 17$).

Igualmente que en la AChE, al analizar las formas de exposición, solamente se encontró diferencia significativa entre la exposición directa con respecto a la exposición vía el agua y a través del alimento para el tratamiento control ($F= 10.147$, $P=0.001$, $gl= 18$).

TABLA 22

Actividad carboxilesterasa (CaE) en hígado de cataranes expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador CaE (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	4.386 \pm 0.84 A, a	2.873 \pm 0.4 A b	3.32 \pm 0.41 A b
17 β -Estradiol	2.756 \pm 0.31 B, a	3.054 \pm 0.52 A a	3.430 \pm 0.79 A a
β -Naftoflavona	3.068 \pm 0.24 B, a	3.399 \pm 0.61 A a	Nd*
Diazinon	2.104 \pm 0.14 C, a	nd*	1.748 \pm 0.36 B a

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.5 Fosfatasa alcalina (ALP)

Los ratones expuestos directamente a los contaminantes, a pesar que el promedio de actividad ALP es menor en el grupo control con respecto a los expuestos a diazinon (tabla 23), la actividad de estos últimos fue diferente de forma significativa únicamente con los expuestos a estradiol ($F= 3.99$, $P=0.015$, $gl= 35$). Mientras, que en los expuestos a través del agua, este menor valor del grupo control si es significativo respecto a los expuestos a naftoflavona ($F= 3.99$, $P=0.031$, $gl= 26$). De la misma forma, en los expuestos vía el alimento esta diferencia es significativa pero entre el control y el diazinon ($F= 11.93$, $P=0.0007$, $gl= 17$).

Al observar el efecto de la vía de exposición sobre la actividad ALP se puede observar un valor marcadamente mayor, hasta 10 veces en magnitud, en todos los tratamientos cuando los ratones son expuestos a contaminantes mediante inyección intraperitoneal directa (C: $F= 34.91$, $P=0.0001$, $gl= 23$; E2: $F= 197.01$, $P=0.0001$, $gl= 23$; H: $t= 14.73$, $P=0.0001$, $gl= 17$; OP: $t= 14.80$, $P=0.0001$, $gl= 14$).

TABLA 23

Actividad fosfatasa alcalina (ALP) en hígado de ratones expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador ALP (Δ Abs/min/mg proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	7.695 \pm 3.33 AB, a	0.346 \pm 0.09 B b	0.558 \pm 0.12 B b
17 β -Estradiol	7.042 \pm 1.22 B, a	0.521 \pm 0.21 AB b	0.626 \pm 0.15 B b
β -Naftoflavona	7.996 \pm 1.49 AB, a	0.591 \pm 0.22 A b	Nd*
Diazinon	10.125 \pm 1.08 A, a	nd*	1.991 \pm 0.97 A b

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.6 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD mostró que los ratones expuestos de forma directa al diazinon (tabla 24) tuvieron un incremento significativo de la actividad ($F= 6.58$, $P=0.0028$, $gl= 23$), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos al realizar las exposiciones a través del agua o del alimento (MA: $F= 0.298$, $P=0.746$, $gl= 17$; A: $F= 4.029$, $P=0.056$, $gl= 11$). Al analizar las diferentes formas de exposición, los ratones expuestos a los diversos tratamientos a través del alimento tuvieron mayor actividad de SOD seguido por los ratones expuestos a través del agua y finalmente los expuestos de forma directa (C: $F= 38.09$, $P= 0.0001$, $gl= 15$; E2: $F= 24.35$, $P= 0.0001$, $gl= 15$; H: $t= -3.51$, $P= 0.0055$, $gl= 11$; OP: $t= -9.95$, $P= 0.000002$, $gl= 11$).

TABLA 24

Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado de ratones expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador SOD (U/mL)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	88.44 ± 38.8 B, c	202.57 ± 31.5 A b	254.59 ± 51.3 A a
17β-Estradiol	112.71 ± 43.7 B, c	183.88 ± 45.7 A b	304.73 ± 34.7 A a
β-Naftoflavona	115.10 ± 29.2 B, b	194.43 ± 46.9 A a	nd*
Diazinon	170.41 ± 9.9 A, b	nd*	317.63 ± 44.9 A a

*nd: Tratamiento no determinado

7.3.7 Glutación-s-transferasa GSTm

La exposición directa por inyección intraperitoneal de contaminantes provocó efectos muy marcados ($F= 685.97$, $P=0.0001$, $gl= 11$) en la actividad GSTm, siendo significativa la diferencia entre todos los tratamientos con valores descendentes entre diazinon, grupo control, estradiol y naftoflavona (tabla 25). Mientras que en la exposición vía agua y vía alimento no se registraron diferencias significativas (MA: $F= 4.529$, $P= 0.063$, $gl= 8$; A: $F= 2.510$, $P= 0.161$, $gl= 8$).

Al analizar el efecto por la vía de exposición se muestran diferencias significativas entre estas en todos los tratamientos (C: F= 107.98, P=0.0001, gl= 8; E2: F= 146.99, P=0.0001, gl= 8; H: t= 27.67, P=0.00001, gl= 5; OP: t= 11.586, P=0.0003, gl= 5), presentando mayores valores en la exposición directa, seguido de la exposición en el alimento y mas bajos en la exposición vía agua.

TABLA 25

Actividad superoxido glutatión s transferasa microsomal (GSTm) en hígado de catanes expuestos por diferentes vías. Literales mayúsculas iguales indican grupos homogéneos entre tratamientos de la misma vía, literales minúsculas iguales indican grupos homogéneos entre vías de exposición del mismo tratamiento.

Tratamiento	Biomarcador GSTm ($\mu\text{mol/mL/min/mg}$ proteína)		
	Exposición directa (D)	Vía Agua (MA)	Vía Alimento (A)
Aceite (Control)	106.9 \pm 1.94 B, a	39.88 \pm 7.19 A c	65.24 \pm 6.31 A b
17 β -Estradiol	82.28 \pm 1.13 C, a	33.69 \pm 4.36 A c	55.02 \pm 3.99 A b
β -Naftoflavona	59.41 \pm 1.11 D, a	27.71 \pm 1.64 A b	Nd*
Diazinon	143.75 \pm 4.05 A, a	Nd*	67.99 \pm 10.57 A b

*nd: Tratamiento no determinado

7.4 Relaciones entre el tipo de contaminante y la respuesta conjunta de los diferentes indicadores bioquímicos utilizados

Con la finalidad de establecer que indicadores bioquímicos pudieran caracterizar de forma más clara el efecto de los diferentes tipos de xenobióticos evaluados, se presentan gráficamente las variaciones conjuntas de estos en relación al grupo control.

7.4.1 Compuestos estrogénicos (E2)

En la exposición directa de organismos de 6 meses a estradiol es posible detectar una marcada respuesta en el incremento de la concentración de VTG hepática (figura 22).

Al mismo tiempo, se aprecia un efecto neurotóxico al generar una inhibición de las esterasas. Igualmente, se observa una inhibición de la actividad GST y un incremento no significativo del sistema enzimático de estrés oxidativo de la SOD. La ALP no registra variaciones significativas.

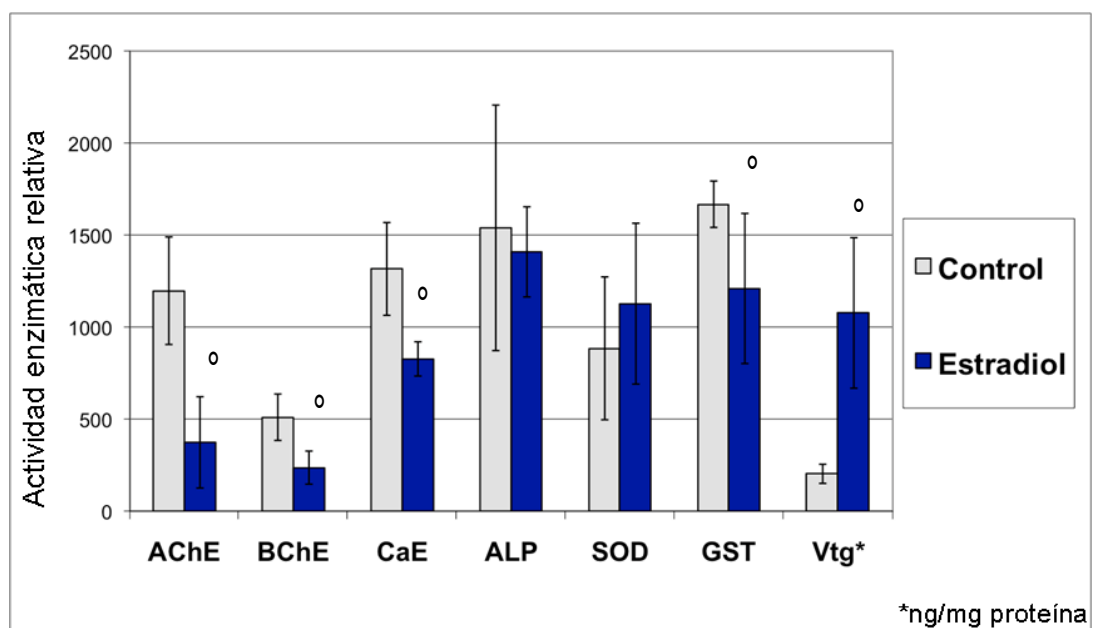


Figura 22. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a E2, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

Igualmente, en organismos de 12 meses se observa claramente el incremento en la concentración de VTG hepática por efecto del estradiol (figura 23).

No obstante se pierde el efecto de inhibición de esterasas. Mientras que la inhibición de la actividad GST y la respuesta en un incremento del sistema enzimático de estrés oxidativo de la SOD se sigue observando en esta edad. Se incrementa significativamente la ALP.

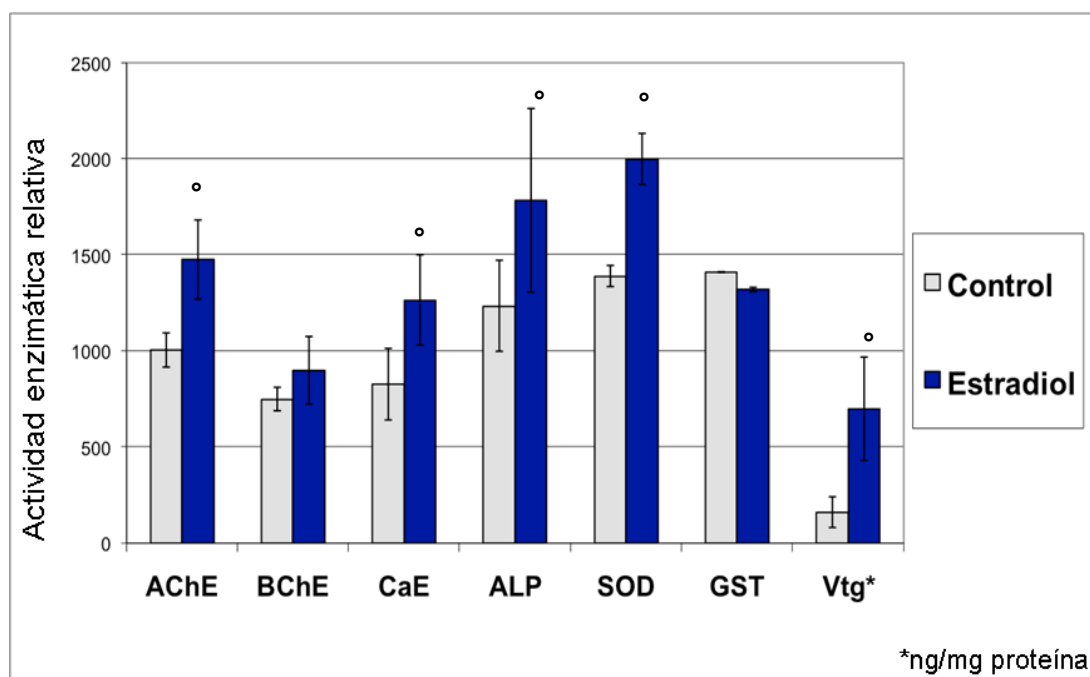


Figura 23. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 12 meses con exposición directa a E2, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

En organismos de 24 meses se sigue observando claramente el efecto feminizante del estradiol con el incremento en la concentración de VTG (figura 24). Igualmente se mantiene un efecto inhibitorio de la actividad GST. Por otra parte, los efectos sobre esterasas y actividad SOD no son significativos en esta edad.

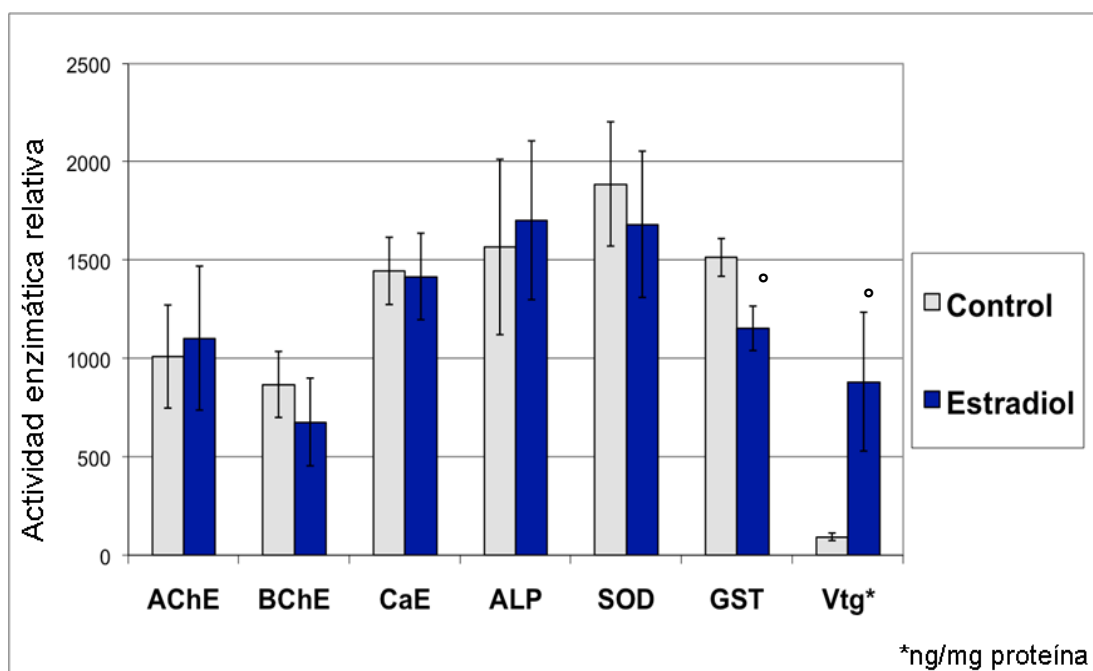


Figura 24. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a E2, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

Cuando el estradiol es aplicado disuelto en el agua, el efecto en la concentración de VTG es más marcado llegando a niveles de 1802 ng VTG/mL/mg proteína. Al mismo tiempo, los efectos inhibitorios en las otras enzimas no son observados y el incremento en la actividad ALP no es significativo (figura 25).

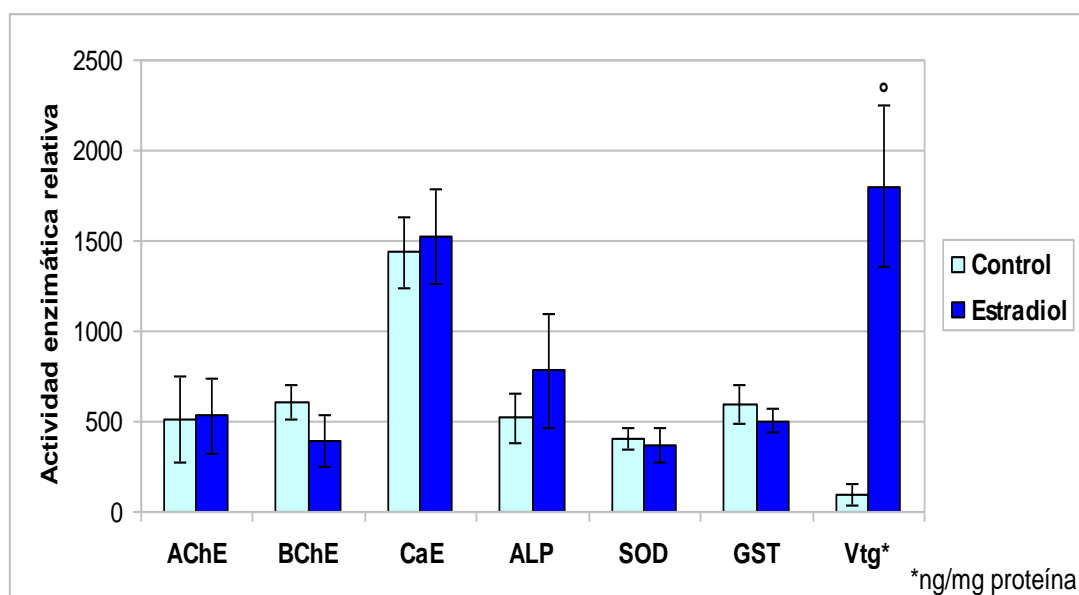


Figura 25. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a E2 a través del medio acuático, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

Lo anterior se observa nuevamente cuando el estradiol es suministrado a través del alimento, llegando los valores de VTG a más de 4000 ng VTG/mL/mg proteína, y únicamente hay un efecto inhibitorio significativo en la actividad de BChE (figura 26).

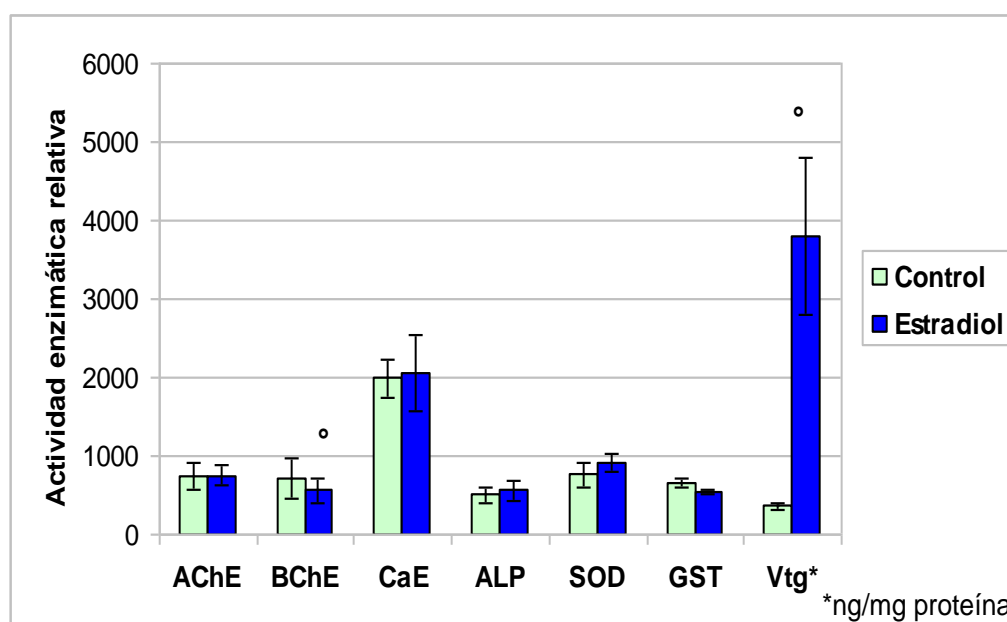


Figura 26. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a E2 a través del alimento, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

7.4.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (β -naftoflavona [H])

Al exponer directamente juveniles de 6 meses a naftoflavona, se pudo observar una inhibición de las 3 esterazas analizadas. Igualmente se presenta una inhibición de la GST y un incremento no significativo de la actividad SOD (figura 27).

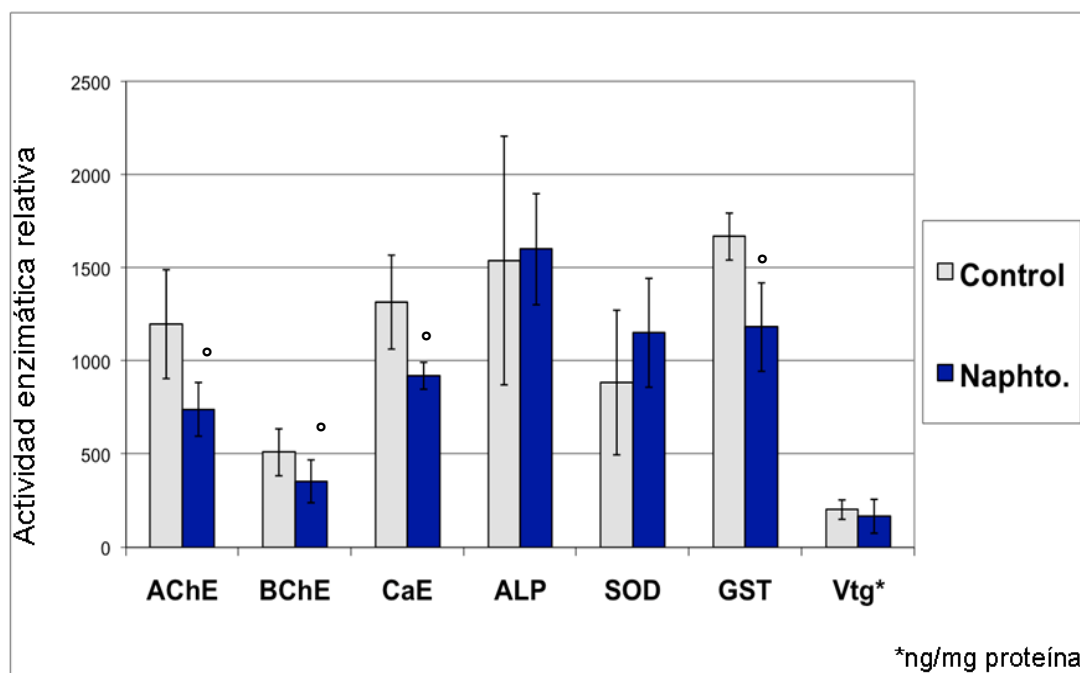


Figura 27. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto), ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

En organismos de 12 meses ya no se observa el efecto inhibitorio de las esterasas, ni el incremento en actividad SOD por la naftoflavona. Sin embargo, continúa el efecto inhibitorio en la actividad GST (figura 28).

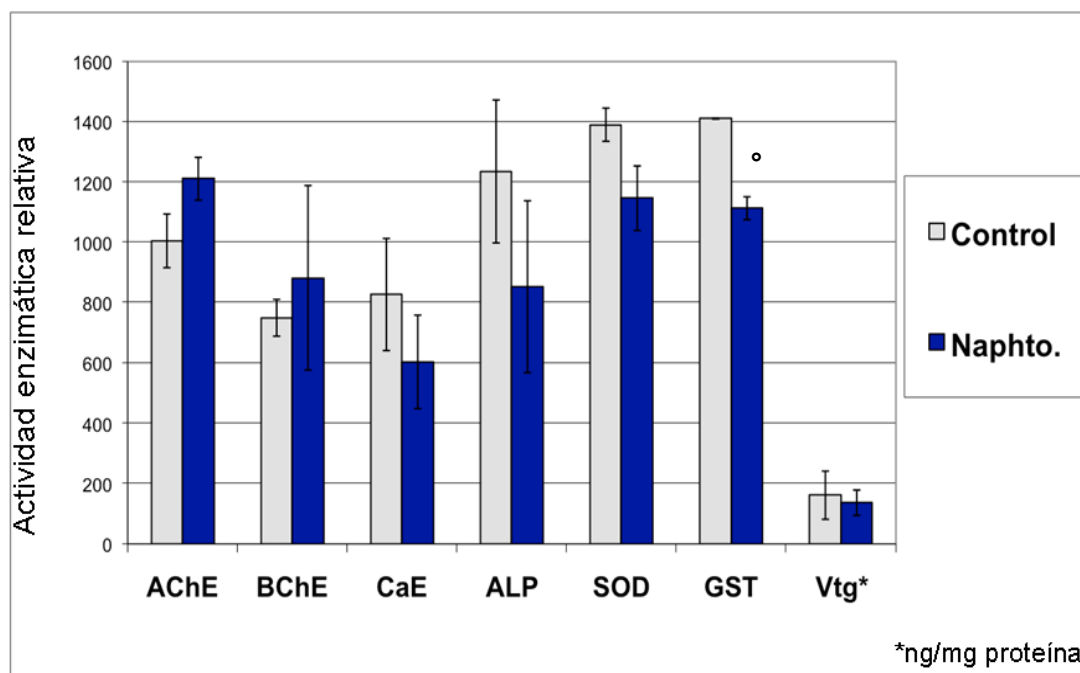


Figura 28. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 12 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto), ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

En organismos de 24 meses, solamente se observa un incremento significativo en la actividad BChE y una disminución significativa de la actividad GST (figura 29). Mientras que el resto de los indicadores no son alterados estadísticamente.

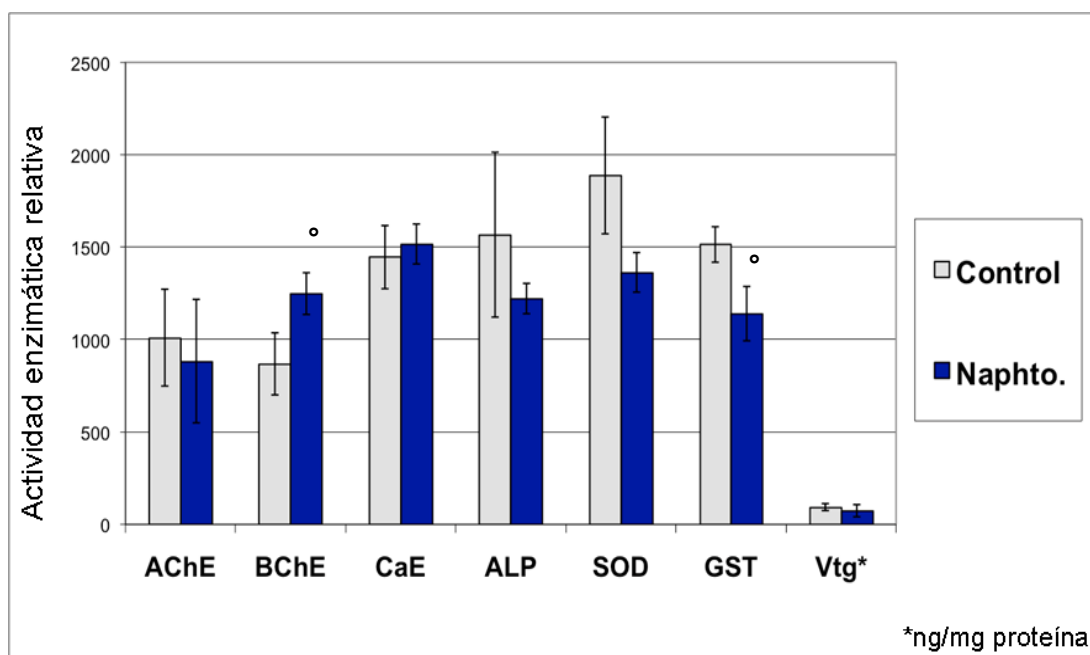


Figura 29. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a naftoflavona (naphto), ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

Cuando el hidrocarburo es incorporado a través del agua, la actividad ALP se incrementa significativamente (figura 30). Mientras que continúa observándose un efecto inhibitorio de la actividad GST sin ser significativo.

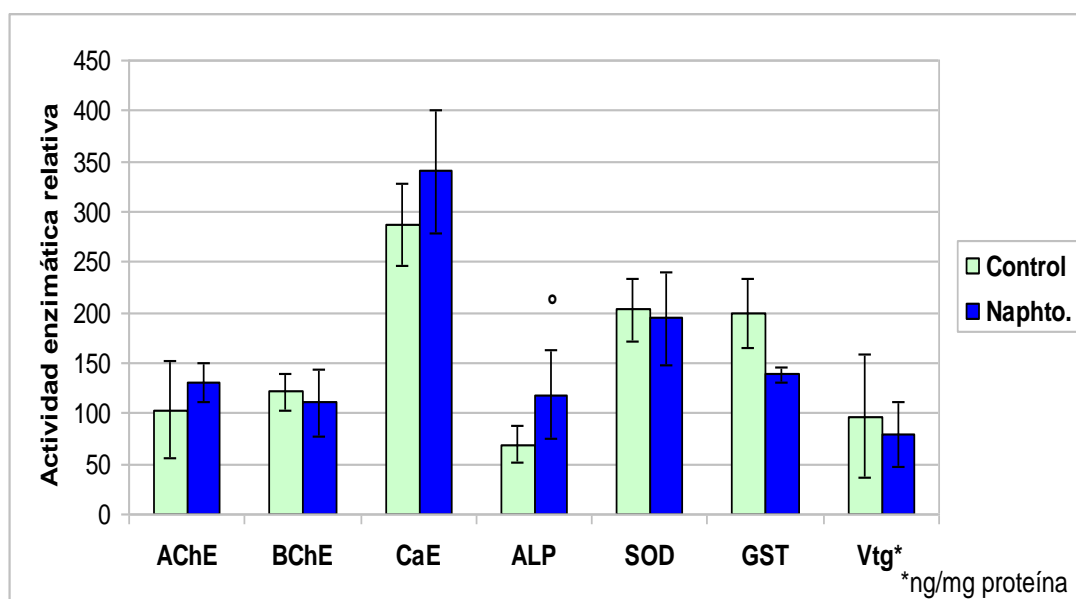


Figura 30. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a naftoflavona (naphto) a través del medio acuático, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

7.4.3 Plaguicidas organofosforados (diazinon [OP])

La exposición directa a un organofosforado en catanes de 6 meses reveló un claro efecto inhibitorio en la actividad de enzimas esterasas (figura 31). Igualmente se observó un efecto inhibitorio de la GST. Mientras que en la actividad SOD se produce un incremento por el diazinon. Todas estas diferencias son estadísticamente significativas.

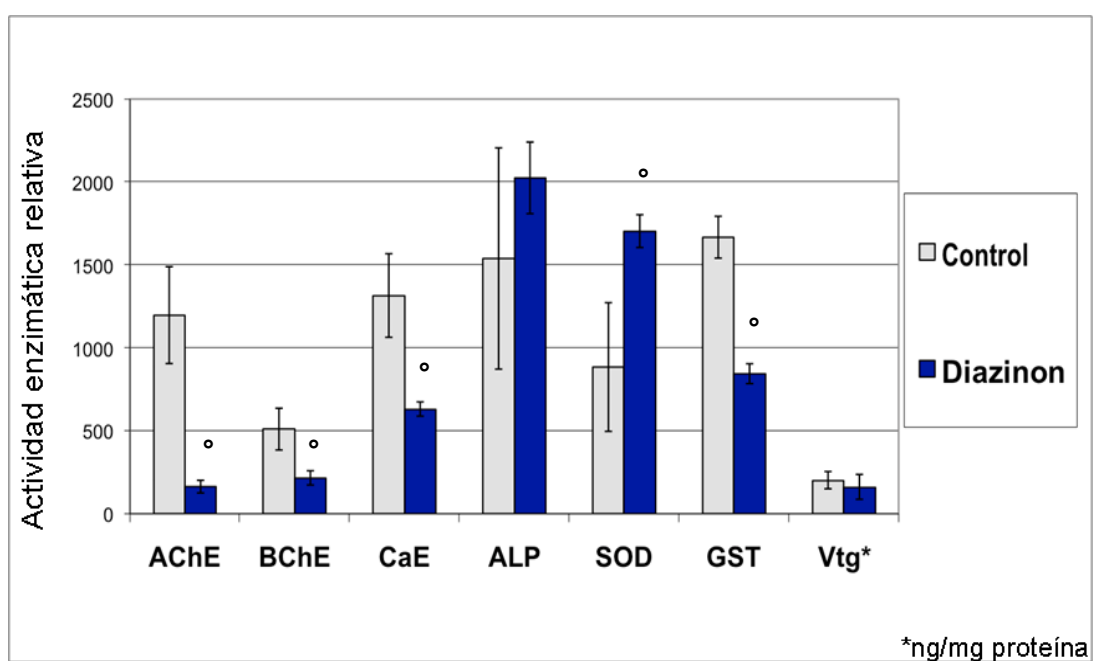


Figura 31. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 6 meses con exposición directa a diazinon, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

En organismos de 24 meses se sigue observando el efecto de inhibición en las esterasas (figura 32). Sin embargo, en esta edad ya no se observa el efecto inhibitorio en la GST ni el incremento en actividad de la SOD. Además, la actividad de ALP presenta un incremento significativo.

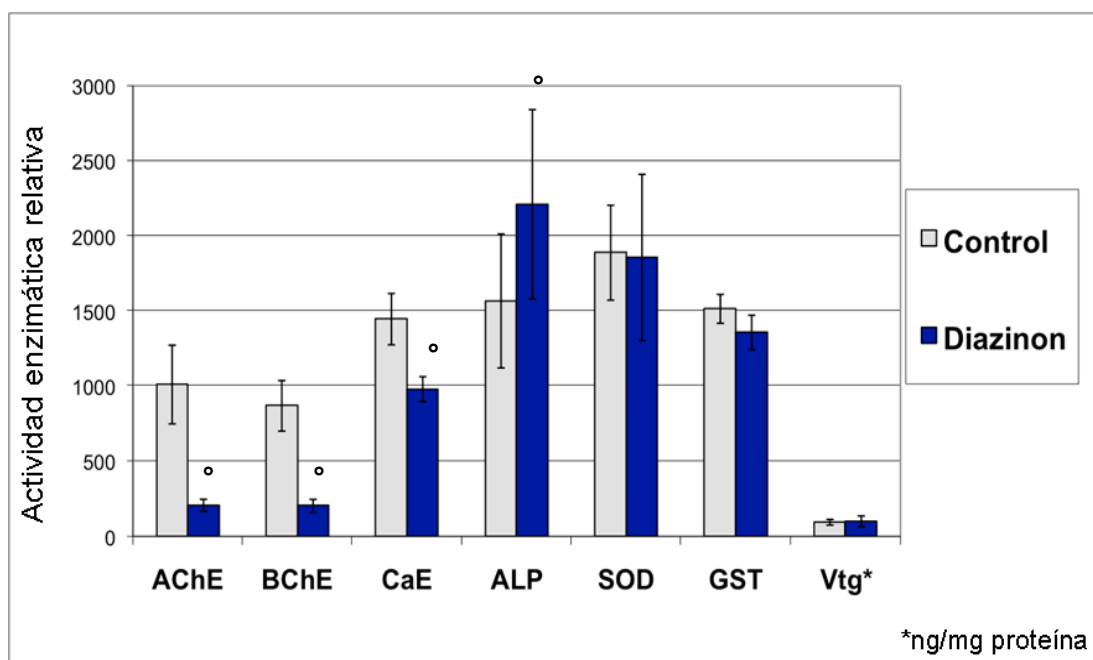


Figura 32. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes de 24 meses con exposición directa a diazinon, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

Cuando el pesticida organofosforado es suministrado a través del alimento, nuevamente se puede apreciar conjuntamente la inhibición de esterasas y el incremento de la actividad ALP (figura 33).

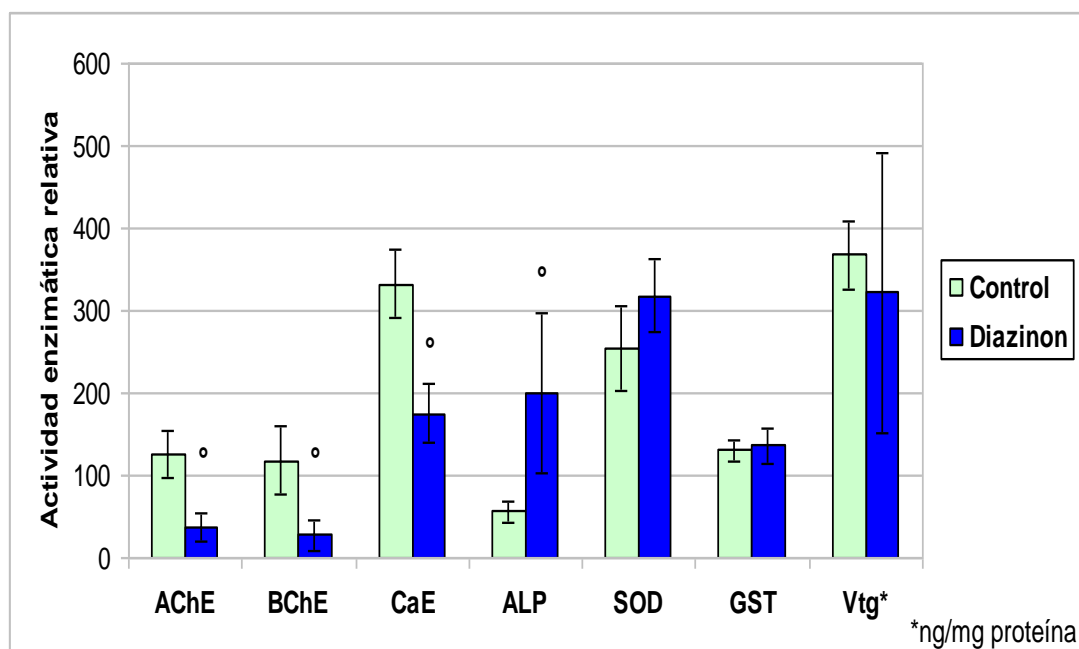


Figura 33. Variaciones de los indicadores bioquímicos en catanes expuestos a diazinon a través del alimento, ° indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento para este bioindicador. Los valores entre bioindicadores no son comparables.

8 DISCUSIÓN

8.1 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en diferentes tejidos del catán

VTG.- La concentración de VTG fue mayor en los organismos inducidos con 17β -estradiol (E2) para todos los tejidos analizados y para los organismos de todas las edades, lo cual muestra que solo este compuesto tuvo la capacidad de inducir la síntesis de esta proteína, como ha sido demostrado en otras especies de peces (Katsu *et al.*, 2008). Cabe notar que la VTG al ser específica de hembras puberes, ésta nunca fue observada en los organismos control (juveniles no inducidos). De forma similar, varios autores han reportado la inducción de una proteína de alto peso molecular después de una inyección con E2 (Flammarion *et al.*, 2000; Holbech *et al.*, 2001). La inducción de VTG en los juveniles inducidos con E2 también se apoyó en el incremento de la proteína total en plasma de hasta 25 veces su concentración, de la cual un 36 a 42 % corresponde a la VTG. Además se conoce que la VTG es sintetizada en el hígado por influencia del E2 y concordando con esto se pudo detectar VTG en hígado de catanes juveniles inducidos con E2. Actualmente se sabe que los receptores estrogénicos de los lepisosteidos son similares a los receptores de los teleosteos y que su activación depende primariamente del 17β -estradiol, pero también pueden ser sensibles a diversos disruptores endócrinos tales como el DDT/DDE (Katsu *et al.*, 2008).

Por otra parte la mayor concentración de VTG se presentó en muestras de hígado, lo cuál es de esperarse considerando que éste es el tejido responsable de sintetizar

ésta proteína (Barr, 1968; Carrillo, 1987; Nagler *et al.*, 1994). Las muestras de branquias y plasma siguieron, en este orden, en concentración de VTG. En este caso sería esperado que las muestras de plasma tuvieran mayor concentración al ser el medio en que es transportada la VTG (Barr, 1968; Ng y Idler, 1983; Norberg y Haux, 1985; Covens *et al.*, 1987; Ho, 1987; Carrillo, 1987; Mommsen y Walsh, 1988; Tyler *et al.*, 1988; Nagler *et al.*, 1994). No obstante, al expresar la concentración de VTG en función de la proteína total en la muestra y al ser este mismo medio abundante en otras proteínas que igualmente son acarreadas a través del organismo, la concentración relativa de VTG puede parecer menor al compararla con su contenido en branquias, siendo este tejido más abundante en proteínas estructurales poco solubles (e.g. colágeno de cartilago) y menos abundante en proteínas solubles, la concentración relativa de la VTG se ve incrementada, sobre todo sí este tejido puede ser utilizado como vía para expulsar al medio la VTG al no estar activos los ovarios responsables de la toma de la VTG plasmática en las hembras (Barr, 1968; Carrillo, 1987).

En cuanto a las muestras de mucus, en este caso solo fue posible detectar VTG en las muestras de los organismos inducidos con E2. En mucus se han detectado valores tan bajos como 5.3 ng/mg de proteína y en plasma tan altos como 27 mg/mL (Mendoza *et al.*, 2011). Estos valores concuerdan con los reportados por Orlando *et al.* (2007) quienes registraron valores de 25 mg/mL de plasma en una especie muy relacionada *L. platyrhincus* y con lo reportado por Cuisset *et al.* (1991) con valores de 25.57 mg/mL de plasma en otra especie primitiva (*Acipenser baeri*). Se ha sugerido la detección de VTG en mucus como un método para determinar el sexo en peces, ya sean silvestres o de acuicultura, cuando resulta difícil sexarlos por su carencia de dimorfismo sexual (Kishida y Specker, 1994). Actualmente, se ha

detectado VTG en mucus de varias especies de peces (Kishida y Specker, 1994; Van Veld *et al.*, 2005), y se ha sugerido que la VTG en mucus es derivada de la circulación secundaria en el sistema sanguíneo de los peces, la cual está conformada por microvasos distribuidos en las escamas. (Kishida y Specker, 1994). Sin embargo, aún no se conoce el significado de la presencia de VTG en el mucus de los peces, aunque se ha sugerido que la VTG podría servir como una fuente de alimento rico en proteína en algunas especies de cíclidos en las cuales los juveniles permanecen junto a los padres (Kishida y Specker, 1994). Además se ha sugerido que el mucus tiene la función de vía de excreción, particularmente en machos los cuales carecen de sitios de depositación (ovarios) para la VTG (Moncaut *et al.*, 2003).

Esterasas.- En el caso de la AChE y BChE solo fue posible determinarlas en muestras de hígado. Estas enzimas están asociadas al tejido nervioso, en donde actúan sobre la regulación de la transmisión de los impulsos nerviosos, por lo cual, uno de los tejidos más utilizados para su evaluación es el cerebro (Politoff *et al.*, 1975; Friedenbergl y Seligman, 1972; Nachmansohn, 1970). No obstante han sido detectadas en diferentes tejidos incluyendo hígado, branquias y sangre (Habig y Di Giulio, 1991; Huang *et al.*, 1997; Wolfe y Kendall, 1998; Chuiko, *et al.*, 2003). Se han reportado en hígado y cerebro de *Lepisosteus oculatus* (Huang *et al.*, 1997), y en plasma de *Lepisosteus osseus* (Frankel, 1982). Los compuestos organofosforados y carbamatos utilizados como plaguicidas pueden inhibir la actividad de las esterasas tipo B al unirse a éstas y cambiar su estructura molecular de tal forma que quedan inactivas (Thompson, 1999), esto concuerda con lo observado en los catanes juveniles que fueron expuestos al diazinon, en los cuales se registró una inhibición de las tres esterasas analizadas (AChE, BChE y CaE). En este caso, probablemente estas

enzimas no fueron detectadas en plasma y branquias debido a su baja concentración o por que no estaban presentes en la fracción utilizada.

La inhibición de éstas enzimas en los organismos expuestos a compuestos organofosforados ha sido ampliamente documentada en otras especies (Thompson, 1999; Huang *et al.*, 1997; Chuiko, 2000; Rodríguez y Gold, 2000; Küster, 2005; Whitehead *et al.*, 2005; Wheelock *et al.*, 2008; Vioque, 2008).

En el caso de las CaE estas si fueron detectadas en los tres tejidos analizados. Lo anterior es de esperarse considerando que las carboxilesterasas son enzimas que hidrolizan un gran rango de ésteres de ácidos carboxílicos y se presentan ampliamente en diferentes organismos, incluyendo animales, plantas y microorganismos (Jaeger *et al.*, 1994). En los lepisosteidos la actividad de estas enzimas ha sido reportada en hígado cerebro y plasma (Huang *et al.*, 1997 y Frankel, 1982) y en el caso del plasma fueron caracterizadas como isoenzimas de tipo arilesterasas (Frankel, 1982). La respuesta de estas enzimas fue similar a las colinesterasas siendo solo afectadas por el organofosforado. En este sentido ha sido señalado que las CaE pueden ser incluso más sensibles que las colinesterasas a este tipo de contaminantes, además las colinesterasas pueden revertir la inhibición después de cierto tiempo de exposición a los organofosforados, mientras que las carboxilesterasas una vez que han sido fosforiladas, no sufren reactivación espontánea (Maxwell y Brecht, 2001).

Fosfatasas.- Fosfatasas alcalinas (ALP) es un término amplio asociado a fosfomonoesterasas no específicas, mientras que las fosfatasas ácidas (ACP) catalizan la reacción de monoesteres más agua en alcohol y H_3PO_4 , siendo ambas ubicuitas en la naturaleza (Fernley, 1971; Hollander, 1971). Se han realizado

estudios en diversas especies y tejidos en las que se ha utilizado la actividad de las ALP como biomarcador (Mazorra *et al.*, 2002; Trof *et al.*, 2006).

Las fosfatasas alcalinas y ácidas fueron detectadas en hígado y branquias, presentando generalmente mayor actividad en hígado, especialmente la ACP la cual tuvo una actividad diez veces mayor en hígado con respecto a branquias. En otras especies también se han observado variaciones en la actividad de estas enzimas al comparar diferentes tejidos, tal es el caso de varias especies silvestres del río Mississippi: *Micropterus salmoides*; *Stizostedion vitreum*; *Pomoxis nigromaculatus*; *Lepisosteus platostomus*; *Esox lucius*; *Hiodon tergisus*; *Ictalurus punctatus*; *Aplodinotus grunniens*, las cuales tuvieron diez veces más actividad de ALP en riñones en comparación con la actividad de ALP en hígado (Cvancara y Huang, 1978).

La relación de actividad ALP-contaminantes no es estable, pues algunos contaminantes en ocasiones causan una inhibición de la actividad de ALP como es el caso del pez gato *Heteropneustes fossilis* que al ser expuesto a sulfonato de alquilbenceno tuvo una disminución de la actividad de ALP (Trivedi *et al.*, 2001), una inhibición de la actividad de ALP se observó en tejidos de la almeja *Scrobicularia plana* por efectos del mercurio (Mazorra *et al.*, 2002), igualmente la actividad de ALP en tejido nervioso de el pez *Channa marulius* disminuye significativamente debido al efecto del látex de plantas de la familia Euphorbiaceae y Apocynaceae (Singh y Singh, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que los altos niveles de plomo ocasionan una disminución de actividad de ALP en ratas (Singh *et al.*, 2008). Adicionalmente, el efecto de los xenobióticos en la actividad de ALP puede ser diferente en un mismo organismo dependiendo del tejido que se analice, por ejemplo en el cangrejo estuarino *Scylla serrata* al ser expuestos a naftaleno la actividad de

ALP disminuye en hepatopáncreas y ovario y se incrementa en hemolinfa (Vijayavel y Balasubramanian, 2006).

Otro resultado que vale la pena remarcar es el incremento de actividad de fosfatasas alcalinas (ALP) en catanes expuestos al compuesto organofosforado diazinon al ser administrado en el agua , lo cual puede ser atribuido a un incremento en la síntesis de este tipo de enzimas con la finalidad de metabolizar este compuesto y reducir el daño celular y fisiológico en el organismo. Mecanismos como este han sido descritos en insectos y han sido asociados al incremento en la resistencia a estos plaguicidas organofosforados (Scott, 1999; Srinivas *et al.*, 2006). El aumento en la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en los catanes expuestos a diazinon, sugiere el potencial de esta enzima como indicadora de contaminación ambiental, tal como ha sido sugerido en otras especies (Yousef, 2004; Silva *et al.*, 2004; Swarup *et al.*, 1998; Srinivas *et al.*, 2006). Estos resultados permiten suponer daños potenciales en las poblaciones de catán de cuencas cercanas a zonas agrícolas que utilizan plaguicidas de este tipo en grandes cantidades, los cuales pueden ser acarreados por lixiviación y acumulados a través de la red trófica hasta consumidores finales como los catanes, en los cuales se puede potenciar su efecto por el consumo continuo de estos compuestos en el alimento y por su exposición permanente en el sedimento y agua.

El incremento en la actividad de ALP en los catanes expuestos a 17 β -estradiol coincide con las funciones de la enzima para metabolizar compuestos fosforilados. Si tomamos en cuenta que el 17 β -estradiol ocasionó un incremento muy significativo en la concentración de vitelogenina en todos los tejidos, edades y métodos de exposición evaluados y considerando que la vitelogenina es un complejo lipoglicocarotenofosfoproteico y sus proteínas derivadas lipovitelina y fosfovítina

contienen cantidades importantes de fósforo (Covens *et al.*, 1987; Hoque *et al.*, 1998); el incremento de estos compuestos fosforilados en los catanes podría ocasionar un incremento en la actividad de ALP como respuesta de los organismos para metabolizar dichos compuestos.

SOD.- La superóxido dismutasa (SOD) protege a las células metabolizadoras de oxígeno contra los efectos dañinos de los radicales superóxido libres (Petkau *et al.*, 1975; Fridovich, 1972; Lavelle *et al.*, 1973; Paschen y Weser, 1973). La SOD está ampliamente distribuida en la naturaleza (Gregory *et al.*, 1974), incluso reportada en bacterias anaeróbicas (Hewitt y Morris 1975). La SOD ha sido utilizada como biomarcador de estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2003). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es inducida por xenobióticos particularmente metales pesados (Costa *et al.*, 2008; Lenártová *et al.*, 1997). La SOD es una de las enzimas principales para la eliminación de ROS durante la bioactivación de xenobióticos (Tocher *et al.*, 2002; Sk y Bhattacharya, 2006). No obstante si la producción de ROS rebasa el sistema antioxidante, un desbalance entre la formación y remoción de ROS puede producir estrés oxidativo (Girard y Boiteux, 1997). Todo esto puede conducir a que se agoten las defensas antioxidantes celulares al estar bajo exposición de contaminantes ambientales (Winston y Di Giulio, 1991). La actividad SOD solo fue ensayada en muestras de hígado y se observó un incremento de la actividad en los catanes de 6 y 12 meses cuando fueron expuestos de forma directa a estradiol y diazinon, sin embargo, no se observaron efectos significativos por los xenobióticos en los catanes de 24 meses ni los expuestos a través del alimento o a través del agua, lo cual puede ser indicativo que el estrés oxidativo producido por estos y bajo estas condiciones, fue controlado por el sistema antioxidante integral de los organismos utilizados.

GST.- La glutatión S-transferasa (GST) representa uno de los mayores grupos de enzimas detoxificantes presentes en la fase II de la biotransformación (Perera, 2000), protegiendo a las macromoléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos (Board *et al.*, 1994) contra los metabolitos reactivos de oxígeno (Perera, 2000). Esta enzima cataliza la conjugación del glutatión (GSH) a una variedad de sustratos y es capaz de convertir xenobióticos hidrofóbicos en compuestos hidrofílicos para ser excretados a través de la orina (Ketterer y Taylor, 1990; Armstrong, 1997). La enzima se encuentra en prácticamente todas las células eucariotas y pudo haber evolucionado para proveer protección al organismo contra las sustancias tóxicas presentes en el alimento y el ambiente (Nebert *et al.*, 1996). La actividad GST está involucrada en la detoxificación de xenobióticos y los productos de la peroxidación de lípidos, encontrándose la mayor actividad en hígado de diversas especies (Griffith, 1980; Basha y Rani, 2003; Hermes-Lima y Storey, 1998). Las transferasas son conocidas como buenos indicadores de toxicidad de metales (Wilczek *et al.*, 1997), y de exposición a xenobióticos orgánicos (Sayeed *et al.*, 2003; Sen y Kirikbakan, 2004).

Al igual que en la SOD esta actividad solo fue evaluada en muestras de hígado. Sin embargo, en este caso si fue posible detectar una reducción atribuible a los xenobióticos aplicados siendo más claro su efecto con el estradiol y la naftoflavona. Yousef (2004) observó que cuando conejos son expuestos a cloruro de aluminio hay una liberación de radicales libres y estos ocasionan una inhibición en la actividad de GST, por lo cual podemos suponer que los xenobióticos utilizados ocasionaron radicales libres en los ratones, lo cual viene a ser confirmado por el importante aumento de la SOD en estos tratamientos. Al mismo tiempo Otitoju y Onwurah (2007) reportan una reducción de la actividad GST en plasma y cerebro por efecto de

un pesticida piretroide en ratas, no obstante la actividad GST hepática se incrementó. Sin embargo, la mayoría de los reportes indican que la actividad GST se incrementa como respuesta a la presencia de xenobióticos. Hayes y Pulford (1995) sugieren que la actividad GST forma parte de la respuesta adaptativa a estrés químico, ya que esta actividad puede incrementarse significativamente por la exposición a compuestos externos, y por ello es utilizada como un biomarcador efectivo a contaminación acuática. Armknecht *et al.* (1998) reportaron una elevada actividad de GST ante la exposición a hidrocarburos aromáticos de creosota en el pez *Fundulus heteroclitus*. Igualmente, en los peces *Leuciscus cephalus* y *Liza saliens*, se registró una actividad total de GST significativamente mayor en un área contaminada en comparación con un sitio de referencia (Lenártová *et al.*, 1997; Sen y Kirikbakan, 2004). La actividad GST no ha sido relacionada únicamente a contaminación industrial, aunque sí con mayor frecuencia. Varios autores han ligado su actividad con exposición a plaguicidas, inclusive se ha mostrado ausencia de efectos en la actividad de GST por plaguicidas organofosforados en áfidos (*Rhopalosiphon padi*) y neurópteros (*Micromus tasmaniae*) (Booth *et al.*, 2007). Aunque en linfocitos humanos, el malati3n (OP) causa incremento en la actividad GST (Banerjee *et al.*, 1999). Por otra parte, Üner *et al.* (2007) encontraron un incremento significativo de actividad enzimática en tilapias (*Oreochromis niloticus*), expuestas a diferentes dosis de diazinon (OP). Igualmente, Hamed *et al.* (2003) reportan un incremento en la actividad de GST en tilapias (*Oreochromis niloticus*) colectadas en sitios contaminados. Los estudios realizados sobre actividad GST abarcan un amplio rango de especies, incluidos los invertebrados. Lukkari *et al.* (2004) encontraron en lombrices de tierra una relación entre el aumento de actividad GST con un incremento progresivo en la concentración de metales en suelo. Mientras que, en el

mosquito *Aedes aegypti*, los individuos resistentes a insecticidas presentan una alta actividad GST (Rodríguez *et al.*, 2001). Wilczek *et al.* (1997) en dos especies de arañas (*Metellina segmentata* y *Araneus diadematus*) en sitios contaminados por vertederos metalúrgicos y de carbón, mostraron actividad enzimática mayor.

Citocromo P450 (CYP).- En general, la mayoría de las enzimas involucradas en la biotransformación se encuentran en el hígado, sin embargo, las enzimas de CYPs pueden ser encontradas en órganos extrahepáticos (Andersson *et al.*, 1993; Buchmann *et al.*, 1993). Esta transformación está dada principalmente por el sistema enzimático CYP, donde se llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción (Fase I) incrementando la polaridad de los compuestos, lo que permite que sean conjugados con el glutatión, sulfato, aminoácidos ó ácido glucoronido (Fase II) y posteriormente ser excretados por la bilis, orina ó a través de las branquias de los peces (Clarke *et al.*, 1991; Nimno, 1987). Los CYP son una superfamilia de monooxigenasas que contienen un grupo heme y que utilizan el O₂ y electrones para oxidar substratos. La oxidación y las reacciones de conjugación producen metabolitos que, usualmente, son más hidrofílicos, y por lo tanto más fácilmente excretables (Williams *et al.*, 2004). Hay una gran variedad de compuestos químicos que son metabolizados por el CYP, el cual realiza reacciones importantes para los organismos, como oxigenaciones, reducciones y deshalogenaciones. Se han caracterizado más de 230 CYP's individuales tanto en mamíferos, aves, peces, reptiles, anfibios, insectos, plantas, bacterias y hongos.

Se propuso que el primer sistema enzimático del CYP estuvo involucrado en la síntesis de lípidos y esteroides esenciales, donde los primeros registros del CYP fueron encontrados en bacterias y en vertebrados ancestrales hace más de 550 millones de años (Nebert y González, 1987). Sin embargo, los CYP responsables de

la transformación de los xenobióticos pudieron haber aparecido en los peces primitivos hace 450 millones de años (Nebert *et al.*, 1991). La hipótesis planta-animal ha sido la teoría más aceptada para explicar la evolución de los CYPs, en la cual las plantas han creado la capacidad de sintetizar y acumular tóxicos como protección contra los animales, y en respuesta a estos compuestos, los animales desarrollaron este sistema de CYPs para degradar la mayoría de las toxinas ingeridas en las plantas (González y Nebert, 1990). Al CYP se le ha clasificado de acuerdo a su secuencia de aminoácidos; en general, las proteínas que forman una familia comparten una homología igual o mayor al 40 % y las subfamilias mayor al 55% (Nebert *et al.*, 1991). De un total de 74 familias de genes del CYP registradas, 14 han sido identificadas en mamíferos y sólo 4 están involucradas en la transformación de los xenobióticos (Nelson *et al.*, 1993).

Investigaciones extensivas han establecido que HAPs y BPCs son capaces de inducir estos sistemas de detoxificación particularmente a través del CYP1A mediante los receptores hidrocarburo aril y generando la síntesis de la enzima EROD que sería la encargada de las reacciones de la Fase I (Goksoyr, 1995; San Martín, 2006). El evento de la duplicación que originó la divergencia hacia CYP1A1 y CYP1A2 en los mamíferos de un solo gen CYP1A ancestral se sugiere que ocurrió hace menos de 250 millones de años (Nebert y González, 1987), posterior a la divergencia de los peces y mamíferos en la línea evolutiva. Cuál de los múltiples genes CYP1A ocurrió en peces ha sido materia de discusión desde que las primeras proteínas P450 fueron purificadas en los peces. Sin embargo, hasta el momento no existen antecedentes, ni evidencias de que la familia de CYP1A este presente en los lepisostéidos. De hecho, este sistema enzimático no ha sido posible detectarlo en los catanes utilizados en los experimentos de esta investigación, ya sea utilizando

técnicas moleculares mediante la expresión de mRNA del CYP1A con sondas probadas en peces tilapia (Zapata *et al.*, 2002), mediante técnicas inmunológicas con anticuerpos contra proteínas del CYP1A de un laboratorio comercial (Rabbit Anti-Fish CYP1A Peptide Polyclonal antibody, CP-226, BIOSENSE), o bien mediante la cuantificación de la actividad enzimática EROD por el método de Klotz *et al.* (1984). Un resultado similar fue reportado para otro pez primitivo, el pez espátula (*Polyodon spathula*), en el cual igualmente no fue posible detectar actividad EROD, ni proteínas del CYP1A1 utilizando técnicas inmunológicas con anti-trucha CYP1A1, y esto a pesar de que si fue encontrado el gen CYP1A1 en esta especie no fue posible detectar evidencia de su expresión (Fitzmorris, 2008). Contrariamente en los esturiones si existen reportes de actividad EROD y de la detección de proteínas del CYP1A1 aún en estados larvarios (Foster *et al.*, 2001; Sarasquete *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2003). La falta de expresión de actividad detoxificante del CYP1A podría implicar que no se generarían los productos de transformación de la Fase I mediante esta familia de enzimas, los cuales normalmente serían el sustrato para las enzimas de la Fase II como la GST. Sin embargo, lo anterior no implica que no exista en el catán un sistema de detoxificación contra estos u otros xenobióticos a partir del citocromo P450, sobre todo considerando que se han identificado más de 500 genes y pseudogenes que codifican para enzimas que catalizan la Fase I del metabolismo oxidativo de una gran variedad de compuestos (Goldstone y Stegeman, 2006), además de las posibles limitaciones en las metodologías utilizadas (*e.g.* diseño de sondas genéticas [primers], reactividad de los anticuerpos, especificidad del sustrato enzimático). Esto igualmente puede ser respaldado por los resultados obtenidos con la expresión diferencial de proteínas microsomales de hígado de catanes de los diferentes tratamientos observada en el gel de electroforesis. Por lo cual, es necesario

continuar investigando las respuestas y sistemas de detoxificación que están presentes en los catanes.

8.2 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes de diferentes edades

En general los patrones de respuesta de los bioindicadores por efecto de los xenobióticos fueron muy parecidos en los diferentes tejidos, siendo marcadas a continuación las excepciones. En primer término, se puede observar que en la concentración de VTG y en la actividad GST, no se encontraron variaciones entre las edades de los catanes evaluados. En los peces teleosteos la VTG está normalmente ausente en juveniles, machos y en hembras inmaduras y está presente en las hembras maduras (Craik y Harvey, 1984; Maitre *et al.*, 1985), sin embargo, es posible la inducción de la síntesis de VTG en machos o hembras inmaduras mediante la aplicación de 17β -estradiol, el cual induce un incremento sostenido de la VTG (Breton y Billard, 1982; Covens *et al.*, 1987; Ho, 1987; Mommsen y Walsh, 1988; Callard *et al.*, 1990), la ausencia de variación en la concentración de VTG entre las distintas edades evaluadas (6, 12 y 24 meses) podría deberse a que los organismos utilizados en la presente investigación fueron todos juveniles inmaduros, mientras que solo se han reportado variaciones en la concentración de VTG cuando se comparan organismos jóvenes con organismos adultos o maduros (Carrillo, 1987; Ho, 1987; Mommsen y Walsh, 1988; Kishida *et al.*, 1992) y se ha reportado que las hembras de los catanes alcanzan su madurez sexual alrededor de los seis años de edad (Morales, 1987). Con respecto a la actividad de GST tampoco se han registrado diferencias en las distintas edades en otros estudios relacionados, sin embargo, si se

han encontrado diferencias en la actividad GST entre sexos de una misma especie, y entre individuos que presentan deficiencias nutricionales (Noble *et al.*, 1998; Rie *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2002; Sidhu *et al.*, 2004). Adicionalmente, se han reportado variaciones en la actividad de GST a causa del pH y la temperatura (Sen y Kirikbakan, 2004). Hasta el momento no existen reportes de variaciones de la actividad de GST en los lepisosteidos.

Por otra parte los bioindicadores que muestran un incremento de actividad con la edad son las enzimas esterasas y la SOD. Al mismo tiempo en la actividad SOD fue posible encontrar un efecto significativo por algunos contaminantes, siendo el pesticida organofosforado en catanes de 6 meses y el estradiol en catanes de 6 y 12 meses los responsables de este incremento. En otras especies se han observado variaciones similares. La actividad de SOD se puede incrementar por efecto de diversos xenobióticos (Huang *et al.*, 2007; Basha y Rani, 2003), mientras que otros compuestos pueden causar su inhibición. (Lenártová *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2008). Se ha señalado que para utilizar la SOD como un bioindicador eficaz, es necesario considerar los cambios en la actividad de esta enzima dependiendo de las características y nivel de desarrollo ontogenético y filogenético de los organismos, estado funcional de sus órganos y tejidos, condiciones ambientales, además de los cambios dependientes de la edad (Zakaryan *et al.*, 2002).

En el caso de las esterasas, particularmente la BChE y la CaE presentaron menor actividad en catanes de 6 meses. Al mismo tiempo, en esta edad todos los compuestos evaluados produjeron una inhibición de las 3 esterasas. Mientras que en catanes de 12 y 24 meses solamente el organofosforado produjo inhibición de las esterasas, como en los ensayos con diferentes tejidos. La inhibición de colinesterasas ha sido un excelente biomarcador para la exposición a plaguicidas organofosforados

y/o carbamatos en aves, mamíferos, peces e invertebrados (Cobos *et al.*, 2006; Furlanello *et al.*, 2006; Chandrasekara y Pathiratne, 2007; Sánchez-Hernández, 2006). La inhibición de la actividad de AChE y BChE por exposición a plaguicidas organofosforados se ha observado en varias especies de peces tales como *Cyprinus carpio*, *Abramis brama*, *A. ballerus*, *Blicca bjoerkna*, *Rutilus rutilus*, *Alburnus alburnus*, *Leuciscus idu*, *Perca fluviatilis*, *Stizostedion lucioperca*, *Esox lucius* y *Coregonus albula* (Chuiko, 2000). Se sabe que factores como los hábitos alimenticios y el tamaño corporal pueden causar diferencias interespecíficas en la actividad de algunas esterasas tal como lo sugieren Thompson y Walker (1994), y Bartkowiak y Wilson (1995), esto explicaría las diferencias observadas al comparar la actividad de las esterasas evaluadas entre las distintas edades de catanes, dadas las diferencias de tamaño a causa de la edad y el diferente nivel de desarrollo fisiológico. Un ejemplo de actividad de esterasas e inhibición de las mismas por plaguicidas organofosforados en etapas tempranas del desarrollo es el reportado por Küster (2005) quien observó actividad de colinesterasas y carboxilesterasa en diferentes etapas embrionarias del pez cebra (*Danio rerio*), además de una inhibición de las mismas a causa de un plaguicida organofosforados, en este caso el paraoxon-metil.

En cuanto a los bioindicadores que mostraron variaciones con la edad, encontramos a las fosfatasas, siendo este efecto más marcado por alguno de los xenobióticos utilizados. En este sentido la actividad ALP varió respecto a la edad cuando es analizada para la naftoflavona, mientras que en la ACP el efecto fue asociado al estradiol. Al mismo tiempo, para el caso de la ALP se pudo seguir observando un incremento de actividad con el diazinon a todas las edades y en la ACP no hay un efecto marcado por algún compuesto. Mazorra *et al.* (2002)

observaron variaciones en la actividad de ALP y ACP en *Scrobicularia plana* por efecto de variables como la temperatura y pH y reportan una inhibición de la actividad de estas enzimas por efecto del mercurio. Igualmente, se observó una inhibición en la actividad de ALP y ACP en *Channa marulius* al ser expuestos a látex de plantas de la familia Euphorbiaceae (Singh y Singh, 2005), mientras que en otros resultados se observó un aumento de la actividad de ALP y ACP en *Notopterus notopterus* al ser expuesto a compuestos fenólicos, pero la variación fue más marcada en la ALP (Dalela *et al.*, 1980).

8.3 Expresión de indicadores bioquímicos de contaminación en catanes expuestos a xenobióticos mediante diferentes vías

De la misma forma que en el apartado anterior, al analizar la respuesta de los bioindicadores a los xenobióticos, los resultados generales son similares en estos experimentos. Mientras que al analizar los efectos de las vías de exposición se pueden apreciar diferencias entre los bioindicadores. Por una parte la actividad SOD no presentó cambios debido a la forma en que son expuestos los catanes a los diferentes xenobióticos. Las variaciones de la actividad de SOD dependen de muchos factores tales como la intensidad y la duración de la aplicación del estrés (Oruc y Usta, 2007), sin embargo, se pudo observar que en los catanes no hubo cambios por los diferentes tiempos y vías de exposición.

Igualmente en el caso de las esterasas no se presenta un efecto marcado por la forma de exponer a los organismos. Sin embargo, si se observa una reducción en la actividad enzimática de éstas, cuando los organismos son expuestos por aplicación directa con inyección intraperitoneal al estradiol y la naftoflavona. Efectos similares

se han observado en la actividad de AChE en *Oreochromis niloticus* al ser expuesta a sedimentos contaminados con hidrocarburos y plaguicidas (Rodríguez y Gold, 2000; Rodríguez y Gold, 2004). El efecto de la inhibición de la actividad de las esterasas en los peces se ha reportado en diferentes formas de exposición, ya sea a través de los sedimentos (Rodríguez y Gold, 2000) o disolviendo el contaminante directamente en el agua en *Oncorhynchus kisutch* (Sandahl *et al.*, 2005).

Un efecto también marcado por la aplicación de compuestos por inyección directa, se encontró para las enzimas ALP y GST, en las cuales se observa una mayor actividad enzimática en los catanes expuestos de forma directa en comparación con los catanes expuestos a través del alimento o a través del agua. No se encontraron estudios que evalúen los efectos de diferentes formas de exposición a xenobióticos en la actividad de ALP y ACP, por lo cual, solo se puede suponer que el efecto observado en estas enzimas por la aplicación directa mediante inyección, es debido al mayor impacto fisiológico que ocasiona el aplicar directamente un xenobiótico en el interior del cuerpo de los organismos, sin haber pérdida a través del medio o a través del proceso digestivo.

A diferencia de los casos anteriores, la concentración de VTG se vio considerablemente incrementada cuando la exposición a E2 fue a través del alimento. En menor cantidad se encontró la concentración de VTG cuando el E2 fue aplicado en el medio acuático. No obstante, esta concentración fue superior a la encontrada cuando el E2 se aplicó mediante inyección intraperitoneal. En este caso, esta respuesta pudo estar asociada a los tiempos de exposición aplicados en estos experimentos, siendo de 28 días por vía del alimento, 4 días por vía del medio acuático y 2 días por inyección directa, lo cual pudo dar el tiempo necesario para

incrementar la síntesis y acumulación de esta proteína tal como se ha observado en *Danio rerio* (Fenske *et al.*, 2005) y *Girardinichthys viviparus* (Vega *et al.*, 2007).

Los resultados observados en el gel de electroforesis a partir de las muestras de microsomas de hígado de los catanes de seis meses expuestos de forma directa a los xenobióticos, mostraron que la mayor concentración en las bandas de proteína en todos los tratamientos con xenobióticos fue en el rango de 25 kDa a 60 kDa, rango en el cual se encuentran enzimas de detoxificación de la fase I del citocromo P450 con un tamaño que oscila de 48 a 60 kDa (Nebert y González, 1987), y enzimas de detoxificación de la fase II como la GST con un tamaño que oscila entre 25 y 35 kDa (Gronwald y Plaisance, 1998; Hamed *et al.*, 2003; Donham *et al.*, 2005).

8.4 Relaciones entre el tipo de contaminante y la respuesta conjunta de los diferentes indicadores bioquímicos utilizados

Los cambios bioquímicos observados en los catanes al ser expuestos a diferentes xenobióticos nos permiten deducir no solamente la presencia del xenobiótico en sí, sino además percibir las alteraciones fisiológicas ocasionadas en los organismos que pudieran desembocar en la alteración de su desempeño biológico con la potencial afectación de la población o de la especie tal como sugieren Ankley *et al.* (1997); Guillette y Crain, (2000); McLachlan, (2001); Iguchi *et al.*, (2001).

Efectos de compuestos estrogénicos (Disruptores endócrinos).- En los experimentos realizados, utilizando 17 β -estradiol (E2) como compuesto estrogénico se pueden resaltar los siguientes resultados. En primer término, a partir de la exposición directa de catanes de 6 meses a E2 fue posible detectar un marcado incremento en la concentración de VTG en los diferentes tejidos analizados (plasma,

hígado, branquias y mucus). Esto resulta particularmente interesante, considerando que los catanes de esta edad no cuentan con la condición fisiológica para expresar los efectos de hormonas sexuales ya que se considera que la maduración de los machos inicia después del tercer año, mientras que en las hembras se da después del quinto año (Morales, 1987). Por otra parte, también se detectó un posible efecto neurotóxico del E2, al provocar inhibición de las esterasas (AChE, BChE, CaE), una inhibición de la actividad enzimática de la GST y un incremento de la SOD del sistema enzimático de estrés oxidativo (figura 22). Este patrón es similar al observado en catanes de 6 meses expuestos tanto al pesticida como al hidrocarburo, lo que puede confirmar que hasta esta edad los catanes no cuentan con un sistema de detoxificación maduro, particularmente considerando que en hembras adultas el estradiol sería un compuesto endógeno que cuenta con un sistema para metabolizarlo. En organismos de 12 y 24 meses expuestos directamente al E2 se siguió observando claramente un incremento en la concentración de VTG a causa de este compuesto. Por otra parte, se perdió el efecto neurotóxico putativo al no detectarse inhibición de las esterasas. No obstante se siguió observando cierta inhibición de la actividad GST, lo que podría indicar la existencia de deficiencias para metabolizar este compuesto (figuras 23 y 24).

Cuando el E2 fue administrado disuelto en el agua o a través del alimento, el efecto de un incremento en la concentración de VTG fue aun más marcado, llegando los niveles de VTG hepática a 2,000 y más de 4,000 ng/mg de proteína respectivamente, en catanes de 12 meses (figuras 25 y 26). Lo que indica que los compuestos estrogénicos incorporados particularmente a través de la cadena alimenticia, aún en bajas concentraciones, pueden ejercer alteraciones metabólicas importantes en los catanes, derivadas de su posición trófica, lo que conlleva mayores

riesgos de biomagnificación. Por otra parte, los efectos inhibitorios en las enzimas de detoxificación no fueron observados en estas dos formas de exposición, lo que pudo deberse a que la velocidad de incorporación del compuesto era más lenta, dando tiempo a que este fuera captado por los receptores estrogénicos de los hepatocitos y de esta manera no existieran excedentes libres que produjeran efectos tóxicos.

En cuanto a la producción de VTG generada por la exposición al E2 en juveniles de catán, los resultados muestran claramente que los organismos pueden ser fácilmente afectados por disruptores endócrinos de tipo estrogénico como ya se ha reportado en otras especies, particularmente si estos compuestos son persistentes y se biomagnifican a través de la red trófica, tal es el caso de plaguicidas como el DDT. Esto resulta sin duda alguna detrimental para las poblaciones silvestres de catán, sobre todo si se considera los reportes de este tipo de contaminantes en músculo de lepisosteidos (Niethammer *et al.*, 1984; Cooper y Knight, 1987; Ford y Hill, 1991; García *et al.*, 2009). No obstante, los efectos e implicaciones de la exposición a este tipo de contaminantes son muy difíciles de observar a nivel de poblaciones en el caso del catán debido a su largo ciclo de vida, lo mermado de las poblaciones y las dificultades técnicas que implica una investigación a este nivel. Sin embargo, esto no le resta importancia a los resultados reportados en este estudio, dada la extensa información y evidencia en otras especies de los efectos que tienen los disruptores endócrinos en los organismos (Fenske *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2007).

Efectos de hidrocarburos.- Al exponer directamente juveniles de catán de 6 meses a un hidrocarburo (β -naftoflavona), se pudo observar un posible efecto neurotóxico a través de la inhibición de 2 de las 3 esterasas analizadas (AChE y CaE). Igualmente, se registró una inhibición de la enzima GST del sistema de detoxificación y una respuesta del sistema enzimático contra el estrés oxidativo

representado por un incremento de la actividad enzimática de la SOD (figura 27). Se conoce que la liberación de radicales libres ocasiona una inhibición en la actividad de GST, por lo cual, estos resultados sugerirían la posible presencia de radicales libres en los catanes, y como ya se mencionó anteriormente tal observación coincide con el hecho de que la actividad de SOD se haya incrementado ligeramente cuando los catanes fueron expuestos a la β -naftoflavona y la SOD es una enzima cuya función es transmutar los radicales superóxido que son un tipo de radical libre en oxígeno molecular.

En organismos de 12 y 24 meses expuestos al hidrocarburo directamente o a través del agua ya no se observa variación de las esterasas, esto pudo ser debido a una mayor resistencia a estos contaminantes adquirida con la edad. Sin embargo, perdura el efecto inhibitorio en la GST, el cual se extiende a otra enzima de detoxificación la fosfatasa alcalina (ALP), así como a la SOD del sistema enzimático contra estrés oxidativo (figuras 28, 29 y 30). Esto hace suponer que este contaminante tal vez no sea metabolizado adecuadamente por este tipo de enzimas en el catán y por lo tanto podría tener efectos más severos en los tejidos y órganos donde son procesados y/o almacenados estos compuestos (e.g. hígado).

En el caso de los efectos producidos por la β -naftoflavona es importante resaltar la respuesta de algunos bioindicadores, particularmente la inhibición observada en la actividad de la GST, aunque en otras especies algunos autores han reportado una inhibición de la GST por exposición a metales o pesticidas (Yousef, 2004; Sidhu *et al.*, 2004; Otitoju y Onwurah, 2007). Cabe señalar que en otros peces expuestos a hidrocarburos, generalmente la actividad de esta enzima se incrementa (Hayes y Pulford, 1995; Sen y Kirikbakan, 2004; Booth *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 1999; Üner *et al.*, 2007; Hamed *et al.*, 2003; Lukkari *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2001;

Wilczek *et al.*, 1997), lo cual es explicado dado que la mayoría de los compuestos que ingresan a los organismos sufren procesos de transformación para ser eliminados en un período de tiempo corto. Esta transformación está dada principalmente por el sistema enzimático del citocromo P450 lo que permite que éstos sean conjugados con el glutatión por acción de la GST y posteriormente excretados (Clarke *et al.*, 1991; Nimno, 1987; San Martín, 2006). Diversas investigaciones han mostrado que el CYP1A es el principal sistema de detoxificación de HAPs en peces (Goksoyr, 1995; San Martín, 2006). Sin embargo, no fue posible detectarlo en los catanes de esta investigación por ninguna de las técnicas utilizadas. Esto podría implicar que existe un mecanismo diferente de respuesta y de detoxificación de los hidrocarburos en lepisosteidos. No obstante, este puede ser algún mecanismo alternativo del mismo citocromo P450 considerando la cantidad de genes que codifican para este tipo de enzimas (Goldstone *et al.*, 2006). Por lo cual, es necesario continuar investigando los sistemas de detoxificación que están presentes en los catanes.

Por otra parte, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, así como la GST están involucradas en el ciclo redox del glutatión, estableciendo el balance de radicales glutatión oxidados y reducidos, el cual es utilizado como parte del sistema de defensa contra radicales libres (Townsend y Tapiero, 2003). Por lo cual una posible explicación al resultado observado en la GST podría estar más relacionada con una respuesta del sistema de defensa antioxidante en lugar de un sistema de detoxificación como el descrito para otros peces. De hecho, en varios de los casos en los que se observó una reducción de actividad enzimática de la GST, al mismo tiempo se presentó un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual es reconocida como una de las más importantes del sistema para eliminación de radicales libres en el sistema enzimático de defensa primaria contra

daño oxidativo (Petkau *et al.*, 1975; Fridovich, 1972; Lavelle *et al.*, 1973; Paschen y Weser, 1973; Tocher *et al.*, 2002; Sk y Bhattacharya, 2006). Por lo cual, tal vez sea posible, que en el caso del catán la respuesta primaria contra contaminantes de tipo HAPs, estuviera basada en los sistemas de defensa antioxidante. En este sentido, es importante resaltar que los lepisosteidos conservan la capacidad de sintetizar vitamina C (Dabrowski y Moreau, 2005), la cual también es una molécula importante dentro del mecanismo no enzimático de protección de daño oxidativo.

Efectos de plaguicidas.- En cuanto a los efectos fisiológicos del diazinon en el catán, se observó que la exposición directa en organismos de 6 meses produce un claro efecto neurotóxico al inhibir la actividad de enzimas esterasas (AChE, BChE, CaE). No obstante, se observó un incremento de actividad de fosfatasas alcalinas que podría atribuirse a síntesis de fosfatasas en respuesta a la alta concentración de fosfatos producto del pesticida organofosforado, como el mecanismo principal de detoxificación. Igualmente, se observó un efecto inhibitorio de la GST especialmente en los catanes más jóvenes (6 meses). Se conoce que la liberación de radicales libres ocasiona una inhibición en la actividad de GST por lo cual se puede suponer que el diazinon también produce estrés oxidativo en los catanes, tal observación coincide con el hecho de que la actividad de SOD se incrementó cuando los catanes fueron expuestos al diazinon (figura 31).

Cuando el diazinon fue aplicado en catanes de 6 y 24 meses de forma directa o a través del alimento, se siguió observando claramente el posible efecto neurotóxico del plaguicida debido a la inhibición de las esterasas (AChE, BChE, CaE). Sin embargo, en organismos de esta edad ya no se observa el efecto inhibitorio en la GST, y se observa una mayor actividad de fosfatasas alcalinas, lo que sugiere la presencia de un sistema de detoxificación basado en estas enzimas. Igualmente,

disminuye la respuesta de la SOD, indicando un menor riesgo de estrés oxidativo del plaguicida organofosforado en catanes de 24 meses (figura 32). Estos resultados evidencian que los plaguicidas provocan alteraciones metabólicas importantes en los catanes independientemente de la edad de los organismos, aunque las consecuencias parecen ser más importantes en catanes juveniles. Por otra parte, queda de manifiesto que estos pueden ser incorporados en el organismo al concentrarse a través de la red trófica por biomagnificación. Lo anterior implica que las fuentes de exposición son múltiples y que las poblaciones de catán afectadas por estos contaminantes podrían sufrir una mayor mortalidad no solo por la toxicidad de estos compuestos, sino también al verse afectada su capacidad de respuesta para capturar sus presas o para huir de sus depredadores.

El incremento en la actividad de fosfatasas alcalinas (ALP) en catanes expuestos a diazinon, puede ser atribuido a un incremento en la síntesis de este tipo de enzimas con la finalidad de metabolizar este compuesto y reducir el daño celular y fisiológico en el organismo. Mecanismos como este han sido descritos en insectos y han sido asociados al incremento en la resistencia a estos plaguicidas organofosforados (Scott, 1999; Srinivas *et al.*, 2006). De aquí, es posible inferir daños en las poblaciones de catán de cuencas cercanas a zonas agrícolas que utilizan plaguicidas en grandes cantidades, los cuales pueden ser acarreados por lixiviación y acumulados a través de la red trófica hasta consumidores finales como los catanes, en los cuales se puede potenciar su efecto por el consumo continuo de estos compuestos en el alimento y por su exposición permanente en el sedimento y agua (Aguilera *et al.*, 2010).

A partir de esto se puede considerar en general que los contaminantes (plaguicidas, hidrocarburos y estrogénicos) pueden producir efectos inhibitorios en las esterasas, lo que posiblemente pudiera estar relacionado con afectaciones en el

sistema nervioso de los organismos, principalmente en las etapas iniciales del desarrollo, al menos hasta los primeros seis meses de vida. Como referencia las esterasas evaluadas, han sido ampliamente utilizadas por más de 30 años como indicadores de exposición a compuestos neurotóxicos (Thompson, 1999; Küster, 2005; Whitehead *et al.*, 2005; Wheelock *et al.*, 2008). Esto podría explicar los nados erráticos y mortalidad observados en los catanes de seis meses expuestos directamente, así como en los catanes expuestos al plaguicida a través del alimento.

Finalmente, tomando en cuenta la sensibilidad de los bioindicadores bioquímicos en el catán se podría considerar que esta especie puede ser utilizada como centinela de contaminación utilizando juveniles producidos por acuicultura. Un atributo adicional es su posición en la red trófica, lo que permitiría llevar a cabo ensayos en los cuales se pudieran utilizar organismos silvestres de otras especies abundantes como alimento. Mediante esta aproximación, sería posible determinar no solo la presencia de los contaminantes en el medio, sino su incorporación en los organismos, permitiendo evaluar la eventual existencia de riesgos toxicológicos mayores para otros organismos de interés, incluido el hombre.

9 CONCLUSIONES

El tejido que presentó mayor sensibilidad para detectar los bioindicadores analizados fue el hígado.

Los catanes de seis meses resultaron más susceptibles a los contaminantes.

En catanes juveniles la actividad de esterasas (AChE, BChE y CaE) es inhibida cuando son expuestos a plaguicidas organofosforados como el diazinon. El efecto inhibitorio se puede observar en hígado y en el caso de la CaE también puede observarse en branquias. Además el efecto inhibitorio puede observarse en catanes de diversas edades al ser expuestos de forma directa, cuando el compuesto es disuelto directamente en el agua o cuando es suministrado a través del alimento.

En los catanes muy jóvenes (6 meses) la actividad de las esterasas (AChE, BChE y CaE) puede ser inhibida por compuestos como el 17 β -estradiol y la β -naftoflavona, lo cual indica que diferentes contaminantes pueden afectar estas enzimas en las etapas tempranas del desarrollo de los catanes.

Los catanes al ser expuestos a un plaguicida organofosforado incrementan la actividad de fosfatasas alcalinas, lo que puede atribuirse a un mecanismo directo de detoxificación.

El sistema de defensa contra radicales libres representa un mecanismo primario contra contaminantes en los catanes, como lo sugiere el incremento de la SOD y la reducción simultánea de la GST ante hidrocarburos, organofosforados y estrogénicos.

Los compuestos estrogénicos provocan la síntesis de VTG en catanes jóvenes, particularmente cuando son expuestos a través del alimento por efecto de biomagnificación.

Los compuestos estrogénicos pueden ser detectados mediante ELISA-VTG en diversos tejidos del catán, tales como hígado, branquias, plasma o mucus.

La edad de los catanes no causa alteraciones en la síntesis de VTG, mientras que la actividad de esterasas, fosfatasas y SOD es influenciada por la edad.

La actividad de ALP y GST es mayor cuando la exposición a los xenobióticos es de forma directa.

El comportamiento y los valores de actividad de SOD no varían al comparar las diferentes formas de exposición a xenobióticos.

No fue posible detectar actividad del sistema de detoxificación CYP1A en juveniles de catán, tanto a nivel genético como bioquímico.

Los mecanismos de detoxificación de HAPs en catanes necesitan mayor investigación.

Los indicadores bioquímicos evaluados en el presente estudio tienen el potencial de ser utilizados en investigación ecotoxicológica.

Los catanes juveniles cultivados pueden ser utilizados en programas de monitoreo ambiental.

10 LITERATURA CITADA

- Aguilera, C., Cruz, J. and Mendoza, R. 2010. Physiological Response of Alligator Gar (*Atractosteus spatula*) to Pollution. Joint Meeting of the International Network for Lepisosteid Fish Research and Management and the Southern Division of the American Fisheries Society Alligator Gar Technical Committee 25 – 28 May 2010 NICHOLLS STATE UNIVERSITY THIBODAUX, LOUISIANA 70310, USA.
- Andersson, T., Förlin, L., Olsen, S., Fostier, A., Breton, B. 1993. Pituitary as a target organ for toxic effect of P4501A1 inducing chemicals. *Mol. Cell. Endoc.* 91: 99-105.
- Ankley, G. T.; Johnson, R. D.; Detenbeck, N. E.; Bradbury, S. P.; Toth, G. and Folmar, L. 1997. Development of a research strategy for assessing the ecological risk of endocrine disruptors. *Reviews in Toxicology.* 1:71-106.
- Armknrecht, S. L., Kaattari, S. L. and Vanveld, P. A. 1998. An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology.* 41: 1-16.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferase. *Chemical Research in Toxicology.* 10: 2-18.
- Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S. T. and Chakraborty, A. K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters.* 107: 33-47.
- Barr, W. A. 1968. Patterns of Ovarian Activity. In: *Perspectives in Endocrinology: Hormones in the Lives of Lower Vertebrates.* Barrington, E. and Barker, J. C. Eds. Academic Press N.Y.163-237.
- Bartkowiak, D. J. and Wilson, B. W. 1995. Avian plasma carboxylesterase activity as a potential biomarker of organophosphate pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 14: 2149-2153.
- Basha, P. S. and Rani, A. U. 2003. Cadmium-induced antioxidante defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 56(2):218-221.
- Board, P., Russell, R. J., Marano, R. J., and Oakeshott, J. G. 1994. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione s-transferase from Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). *Biochemical Journal.* 299: 425-430.

- Booth, L. H., Wratten, S. D. and Kehrl, P. 2007. Effects of Reduced Rates of Two Insecticides on Enzyme Activity and Mortality of an aphid and its lacewing predator. *Journal of Economic Entomology* . 100(1): 11-19.
- 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.
- Breton, B. y Billard, R. 1982. The Endocrinology of Teleosts Reproduction: an Approach to the Control of Fish Reproduction. Proceedings of the: *Fourth Congress of European Ichthyologists, Hamburg, September 1982*. pp. 55-74.
- Buchmann, A., Wannemacher, R., Kulzer, E., Buhler, D.R., Bock, K.W. 1993. Immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isozymes LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicol Appl. Pharmacol* 123: 160-169.
- Callard, I. P., Riley, D. and Perez, L. 1990. Vertebrate Vitellogenesis: Molecular Model for Multihormonal Control of Gene Regulation. *Progress in Comparative Endocrinology*, 343-348.
- Carrillo, M. 1987. Reproductive Physiology of Fish and its Relationship with Aquaculture. In: *Aquaculture Research in Latin America. The Latin American Seminar on Aquaculture, International Foundation for Science*. J. A. J. Verreth, M. Carrillo, S. Zanuy and E.A. Huisman, Eds. Stockholm, Sweden, in Lima, Peru. 45-57.
- Chandrasekara, L. W. H. U. and Pathiratne, A. 2007. Bony size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67(1): 109-119.
- Chuiko, G. M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 127 (2000) 233-242 pp.
- Chuiko, G. M., Podgornaya, V. and Zhelnin, Y. Y. 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species differences, *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 135 (1): 55-61.
- Clarke, D.J., George, S.G., Burchell, B. 1991. Glucuronidation in fish. *Aquat. Toxicol* 20: 35-56.
- Cobos, V. M., Mora, M. A. y Escalona, G. 2006. Inhibición de colinesterasa plasmática en el zorzal pardo (*Turdus grayi*), expuesto a diazinon en cultivos de papaya maradol en Yucatán, México. *Reviews in Toxicology*. 23: 17-21.

- Cooper, C. M. y Knight, S. S. 1987. Residual pesticides in fishes from Lake Chicot, Arkansas, Proc. Arkansas Acad. Sci. (1987) 41 26-8.
- Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T. and Kalinin, A. L.: 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicology*. 17: 153-163.
- Covens, M., Covens, L., Ollevier, F. Y De Loof, A. 1987. A Comparative Study of Some Properties of Vitellogenin (Vg) and Yolk Proteins in a Number of Freshwater and Marine Teleost Fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B(1):75-80.
- Craik, J. C. A. y Harvey, S. M. 1984. A Biochemical Method for Distinguishing Between Sexes of Fishes by Presence of Yolk Protein in the Blood. *Journal of Fish Biology* 25: 293-303.
- Cuisset, B., Pelissero, C., Le Menn, F. and Núñez Rodríguez, J. 1991. ELISA for Siberian Sturgeon (*Acipenser Baeri* Brandt) Vitellogenin. In: *Acipenser*. P. Williot Ed. Cemagref Publ. pp. 107-111.
- Cvancara, V. A. and Huang, W. M. 1978. Tissue alkaline phosphatase activity in selected freshwater teleosts, *Comp Biochem Physiol B*. 1978;60(3):221-224.
- Dabrowski, K. and Moreau, R. (2005). Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians, *Journal of Fish Biology*, Volume 57, Issue 3, 733-745.
- Dalela, R. C., Rani, S. and Verma, S. R. 1980. In vivo subacute physiological stress induced by phenolic compounds on acid and alkaline phosphatases in serum of a fish, *Notopterus notopterus*, *Toxicol. Lett.* 1980 Dec; 7(2): 181-186.
- Donham, R. T., Morin, D., Jewell, W. T., Burns, S. A., Mitchell, A. E., Lamé, M. W., Segall, H. J. and Tjeerdema, R. S. 2005. Characterization of glutathione S-transferases in juvenile white sturgeon, *Aquatic Toxicology* 71 (2005) 203–214.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- Fenske, M.; Maack, G.; Schafers, Ch. and Segner, H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*, *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 24. No. 5. pp. 1088-1098.
- Fernley, H. 1971. Mammalian Alkaline Phosphatases, *The Enzymes*, 3rd Ed. Vol. 4, P. Boyer, Academic Press, NY, 417.
- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., Tyler, C. R. and Palazzi, X. 2000. Induction of Fish Vitellogenin and Alterations in Testicular Structure: Preliminary Results of Estrogenic Effects in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology* 9: 127-135.

- Ford, W. M. y Hill, E. P. 1991. Organochlorine pesticides in soil sediments and aquatic animals in the Upper Steele Bayou Watershed of Mississippi. *Environ. Contam. Toxicol.* (1991), 20(2), 161-7.
- Foster, E. P., Fitzpatrick, M. S., Feist, G. W., Schreck, C. B., Yates, J., Spitsbergen, J. M., Heidel, J. R. 2001. Plasma Androgen Correlation, EROD Induction, Reduced Condition Factor, and the Occurrence of Organochlorine Pollutants in Reproductively Immature White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the Columbia River, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 182–191 (2001).
- Frankel, J. S. 1982. Serum esterase variation and characterization in populations of the longnose garpike, *Lepisosteus osseus*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 73B, No. 2, 347-349 pp.
- Fridovich, I. 1972. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Accounts of Chemical Research.* 5, 321.
- Friedenberg, R., and Seligman, A. 1972. Acetylcholinesterase at the Myoneural Junction: Cytochemical Ultrastructure and Some Biochemical Considerations, *J. Histochem Cytochem*, 20, 771.
- Furlanello, T., Simonato, G., Caldin, M., De Lorenzi, D., Lubas, G., Bernardini, D. and Solano-Gallego, L. 2006. Validation of an Automated Spectrophotometric Assay for the Determination of Cholinesterase Activity in Canine Serum: *Veterinary Research Communications.* 30(7): 723-733.
- García, G., Aguilera, C., Mendoza, R. & Nuñez, A. 2009. Determinación de contaminantes en carne de catán de Nuevo León y Tamaulipas. 44° Congreso Mexicano de Química y 28° Congreso Nacional de Educación Química. Puebla, México, 26 – 30 de Septiembre 2009.
- Girard, P. M. and Boiteux, S. 1997. Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie.* 79: 559-566.
- Goksoyr, A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch. Toxicol. Suppl.* 17: 80-85.
- Goldstone, H. M. H. and Stegeman, J. J. 2006. A Revised Evolutionary History of the CYP1A Subfamily: Gene Duplication, Gene Conversion, and Positive Selection, *J. Mol. Evol.* (2006) 62: 708-717.
- González del Pliego, P. 2009. Evaluación de bioindicadores enzimáticos de estrés y contaminación en especies del género *Sceloporus* (Familia: Phrynosomatidae), en sitios con distintos impactos antropogénicos, Tesis de licenciatura, Centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México, 8 p.

- Gonzalez, F.J., and Nebert, D.W. 1990. Evolution of the P450 superfamily: animal-plant "warfare" molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *TIG* 6 182-186.
- Gregory, E., Goscin, S., and Fridovich, I. 1974. Superoxide Dismutase and Oxygen Toxicity in a Eukaryote. *Journal of Applied Bacteriology*. 117: 456.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*. 106:207-212.
- Gronwald, J. W. and Plaisance, K. L. 1998. Isolation and Characterization of Glutathione S-Transferase Isozymes from Sorghum, *Plant Physiol.* (1998) 117: 877-892.
- Guillete, L. J. Jr. and Crain, D. A. (Eds.). 2000. *Endocrine Disrupting Contaminants: An Evolutionary Perspective*, Francis and Taylor Inc., Philadelphia. pp. 355.
- Habig, C., Di Giulio, R. T. 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: Mineau P (ed) *Cholinesterase-inhibiting insecticides*, Elsevier, Amsterdam, p 20-33.
- Hamed, R. R., Farid, N. M., Elowa, SH. E. and Abdalla, A. M. 2003. Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution, *The Environmentalist*, 23, 313-322.
- Hamilton, R. L., Moorehouse, A., Lear, S. R., Wong, J. S. and Erickson, S. K. 1999. A rapid calcium precipitation method of recovering large amounts of highly pure hepatocytes rough endoplasmic reticulum, *Journal of Lipid Research*, Volume 40, 1140-1147.
- Hayes, J. D. and Pulford, D. 1995. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I and II. 30(6): 445-600.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K. B. 1998. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 189:79-89.
- Hewitt, J., and Morris, J. 1975. Superoxide Dismutase in Some Obligately Anaerobic Bacteria. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 50: 315.
- Holbech, H., Aandersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. and Bjerregaard, P. 2001. Development of an ELISA for Vitellogenin in Whole Body Homogenate of Zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 130: 119-131.
- Hollander, V., and Boyer, P. 1971. *The Enzymes Vol. IV* Academic Press, NY, pp. 450.

- Hoque, M., Takemura, A. y Takano, K. 1998. Annual Changes in Oocyte Development and Serum Vitellogenin Level in the Rabbitfish *Siganus canaliculatus* (Park) in Okinawa, Southern Japan. *Fisheries Science* 64(1):44-51.
- Ho, S. M. 1987. Endocrinology of Vitellogenesis. *In: Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. Norris, D. O. and Jones, R. E. (eds.) Plenum Press, N. Y., 145-169 pp.
- Huang, T. L., Obih P. O., Jaiswal R., Hartley W. R. y Thiyagarajah A. 1997. Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 :688-695.
- Iguchi, T.; Watanabe, H. and Katsu, Y. 2001. Development Effects of Estrogenic Agents on Mice, Fish and Frogs: A Mini-Review. *Hormones and Behavior*:40,248-251.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews.* 15: 29-63.
- Jönsson, M. 2003. A Gill Filament EROD Assay Development and Application in Environmental Monitoring, *Acta Universitatis Upsaliensis, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 920, Uppsala, Sweden, 45 pp.
- Katsu, Y., Kohno, S., Hyodo, S., Ijiri S., Adachi S., Hara A., Guillette, L.J. & Iguchi, T. (2008) Molecular cloning, characterization, and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology* 149(12):6300–6310.
- Kennedy, Ch. J. 1994. Xenobiotics: designing an *in vitro* system to study enzymes and metabolism, Hochachka and Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 3, 426-427.
- Ketterer, B. and Taylor, J. B. 1990. Glutathione transferases. *In: Ruckpaul, K. and Rein, H. (eds). Principles, mechanisms and biological consequences of induction.* Akademie Verlag, Berlin, pp 244-277.
- Kishida, M., Anderson, T. R. and Specker, J. L. 1992. Induction by β -Estradiol of Vitellogenin in Striped Bass (*Morone saxatilis*): Characterization and Quantification in Plasma and Mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 29-39.
- Kishida, M. and Specker, J. L. 1994. Vitellogenin in the Surface Mucus of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*); Possibility for Uptake by the Free-Swimming Embryos. *The Journal of Experimental Zoology* 268: 259-268.
- Klotz, A. V., Stegeman, J. J., and Walsh, C. 1984. An alternative 7-ethoxyrosorufin o-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity.

- Küster, E. 2005. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment, *Aquatic Toxicology*, Volume 75, Issue 1, 5 October 2005, 76-85 pp.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lavelle, F., Michelson, A., and Dimitrijevic, L. 1973. Biological Protection by Superoxide Dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 55: 350.
- Lenártová, V., Holovská, K., Pedrajas, J. R., Martínez-Lara, E., Peinado, J., López-Barea, J., Rosival, I., and Košuth, P. 1997. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*. 2:247-252.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A. and Haimi, J. 2004. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 59(3): 340-348.
- Maitre, J. L., Le Guellec, C., Derrien, S., Tenniswood, M. and Valotaire, Y. 1985. Measurement of Vitellogenin from Rainbow Trout by Rocket Immuno-electrophoresis: Application to the kinetic Analysis of Estrogen Stimulation in the Male. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 63: 982-987.
- Mannervik, B. and Danielson, U. H. 1988. Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337.
- Maxwell, D. M. and Brecht, K. M. 2001. Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds. *Journal of Applied Toxicology*. 21(suppl 1): S103-S107.
- Mazorra, M. T.; Rubio, J. A. and Blasco, J. 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. Biochemistry and Molecular Biology* 131(2):241-249.
- McLachlan, J. A. 2001. Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach US About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*:22, 319-341.
- Mendoza, R., Santillán, O., Revol, A., Aguilera, C., Cruz, J. 2011. Alligator gar (*Atractosteus spatula*) vitellogenin: Purification, characterization and establishment of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Aquaculture Research*, en prensa.
- Mommsen, T. P. y Walsh, P. J. 1988. Vitellogenesis and Oocyte Assembly. *In: Fish Physiology*. Hoar, W. S. and D. J. Randall Eds. Academic Press, London. XIA: 348-406.

- Moncaut, N., Lo Nostro, F. & Maggese, M.C. (2003) Vitellogenin Detection in Surface Mucus of the South American Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) Induced by Estradiol-17beta. Effects on Liver and Gonads. *Aquat Toxicol.* 63(2): 127-137.
- Moore, M. J., Mitrofanov, I. V., Valentini, S. S., Volkov, V. V., Kurbskiy, A. V., Zhimbey, E. N., Eglinton, L. B., Stegeman, J. J. 2003. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. *Marine Pollution Bulletin* 46 (2003) 107–119.
- Morales, G. 1987. Reproducción y desarrollo embriológico del catán (*Lepisosteus spatula* Lacepede): Primeros resultados. *SEPES. Dirección General de Acuicultura.*
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcon, F. J. and Sarasquete, M. C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry.* 15(2): 121-130.
- Nachmansohn, D. 1970. Proteins in Excitable Membranes: Their Properties and Function in Bioelectricity are Discussed, *Science*, 168, 1059.
- Nagler, J. J., Tyler, C. R. y Sumpter, J. P. 1994. Ovarian Follicles of Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Cultured Within Lamellae Survive Well, and Sequester and Process Vitellogenin. *The Journal of Experimental Zoology* 269: 45-52.
- Nebert, D.W., and Gonzalez, F.J. 1987. P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann Rev. Biochem.* 56: 945-993.
- Nebert, D. W., McKinnon, R. A., and Puga, A. 1996. Human drug metabolizing enzyme polymorphisms effects on risk of toxicity and cancer DNA. *The Journal of Cell Biology.* 15: 273-280.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyeirsen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Jonson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10: 1-14.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.W. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number early names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51
- Ng, T. B. y Idler, D. R. 1983. Yolk Formation and Differentiation in Teleost Fishes. *In: Fish Physiology IXA. Reproduction Part. A: Endocrine Tissues and Hormones.* W.S. Hoar; D.J. Randall & E.M. Donaldson (Eds.). Academic Press Inc., London. p. 373-404.

- Niethammer, K. R., White, D. H., Baskett, T. S. y Sayre, M. W. 1984. Presence and biomagnification of organochlorine chemical residues in Oxbow Lakes of northeastern Louisiana, Environ. Contam. Toxicol. (1984), 13(1), 63-74.
- Nimno, I.A. 1987. The glutathione S-transferases of fish. Fish Physiol. Biochem. 3: 163-172.
- Noble, E., Barré, H. and Dierickx, P. J. 1998. Effect of diet and β -naphthoflavone on hepatic and renal glutathione S-transferase isoenzymes in carp (*Cyprinus carpio*), Fish Physiology and Biochemistry 18: 203-212.
- Norberg, B. y Haux, C. 1985. Induction, Isolation and a Characterization of the Lipid Content of Plasma Vitellogenin from Two *Salmo* Species: Rainbow Trout, (*Salmo gairdneri*) and Sea Trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B(4): 869-876.
- Orlando, E., Binczik G., Denslow N. & Gillette L. (2007) Reproductive seasonality of the female Florida gar, *Lepisosteus platyrhincus*. *General and Comparative Endocrinology* 151 318-324 pp.
- Oruç, E. Ö. and Usta, D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 48-55.
- Otitoju, O. and Onwurah, I. N. E. 2007. Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment, *African Journal of Biotechnology* Vol. 6(12):1455-1459.
- Pandey, S.; Parvez, S; Sayeed, I; Haque, R.; Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yumuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science of the Total Environment*. 309:105-115.
- Paschen, W., and Weser, U. 1973. Singlet Oxygen Decontaminating Activity of Erythrocytorein (Superoxide Dismutase). *Biochimica et Biophysica Acta*. 327:217.
- Perera, F. P. 2000. Molecular epidemiology: on the path to prevention. *Journal of the Natural Cancer Institute*. 92: 602-612.
- Petkau, A., Chelack, W., Pleskach, S., Meeker, B., and Brady, C. 1975. Radioprotection of Mice by Superoxide Dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 65: 886.
- Politoff, A., Blitz, A., and Rose, S. 1975. Incorporation of Acetylcholinesterase Into Synaptic Vesicles is Associated with Blockade of Synaptic Transmission. *Nature*. 256: 324.
- Rie, M. T., Lendas, K. A., Woodin, B. R., Stegeman, J. J. and Callardl, P. 2000. Hepatic biotransformation enzymes in a sentinel species, the painted turtle

- (*Chrysemys picta*), from Cape Cod, Massachusetts: seasonal, sex and location related differences. *Biomarkers*. 5(5): 382-394.
- Rodríguez, F. G. y Gold, B. G. 2004. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Marine Environmental Research*, 58 (2004) 505-509.
- Rodríguez, F. G. y Gold, B. G. 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons, *Marine Environmental Research*, 50(1-5) 359-360.
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., Molina, D., Díaz, C. y Soca, L. A. 2001. Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutatión-s-transferasa en *Aedes aegypti*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 53(1): 32-36.
- Sánchez-Hernández, J. C. 2006. Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 188: 85-126.
- Sandahl, J. F., Baldwin, D. H., Jenkins, J. J., Scholz, N. L. 2005. Comparative Thresholds for Acetylcholinesterase Inhibition and Behavioral Impairment in Coho Salmon Exposed to Chlorpyrifos, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 24, No. 1, 136-145 pp.
- San Martín, P. 2006. Ocurrencia de hidrocarburos en 2 lagunas costeras norveracruzanas y expresión del gen CYP1A1 hepático de tilapia (*Oreochromis niloticus*) como bioindicador de contaminación acuática. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 1-85 pp
- Santillán, A. 2005. Establecimiento de un ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para cuantificar la vitelogenina del catán (*Atractosteus spatula*), tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. 66p.
- Sarasquete, C., Ortiz, J. B. & Gisbert, E. 2001. Immunohistochemical distribution of cytochrome P4501A in larvae and fingerlings of the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *The Histochemical Journal* 33: 101–110, 2001.
- Sayeed, I.; Parvez, S.; Pandey, S.; Hafeez, B. B.; Haque, R. and Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Bloch. Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56: 295-301.
- Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (1999): 757-777.
- Sen, A. and Kirikbakan, A. 2004. Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S-Transferase in Leaping Mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry*. 69(9): 993-1000. Translated from *Biokhimiya*. 69(9): 1223-1232.

- Sidhu, P., Garg, M. L. and Dhawan, D. K. 2004. Protective effects of zinc on oxidative stress enzymes in liver of protein deficient rats. *Nutrición Hospitalaria*. XIX(6): 341-347.
- Silva, L. P.; Miyasaka, C. K.; Martins, E. F.; Leite, J. R.; Lacava, Z. G.; Curi, R. and Azebedo, R. B. 2004. Effect of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil administered by gavage on the fatty acid composition and oxidative stress of mouse liver. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31(10):1491-1496.
- Singh, D. and Singh, A. 2005. The toxicity of four native indian plants: effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. *Chemosphere*. 60(1):135-140.
- Singh, B.; Dhawan, D.; Nehru, B.; Garg, M. L.; Mangal, P. C.; Chand, B. And Trehan, P. N. 2008. Impact of lead pollution on the status of other trace metals in blood and alterations in hepatic functions. *Biological Trace Element Research*. 40(1):21-29.
- Sk, U. H. and Bhattacharya, S. 2006. Preventium of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel organoselenocyanates. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 22: 298-308.
- Specker, J. y Anderson, T. R. 1994. Developing an ELISA for a Model Protein-Vitellogenin. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol.3. Chapter 48*. Hochachka and Mommsen Eds. 567-578 pp.
- Srinivas, R., Jayalakshmi, S. K., Sreeramulu, K., Sherman, N. E. y Jayasimha, R. 2006. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Volume 1760, Issue 3, March 2006, Pages 310-317.
- Stone, D., Jepson, P. and Laskowski, R. 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 132(1): 105-112.
- Swarup, D.; Dwivedi, S. K.; Dey, S. and Ray, S. K. 1998. Fluoride intoxication in bovines due to industrial pollution. *Indian Journal of Animal Sciences*. 68(7):605-608.
- Thompson, H. M. and Walker, C. H. 1994. Blood esterases as indicators of exposure to organophosphorus and carbamate insecticides. In: Fossi, M. C., Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publisher, Chelsea, MI, U.S.A., pp. 37-62.

- Thompson, H. M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates, *Ecotoxicology* 8, 369-384.
- Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Díaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defense mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*. 8: 195-203.
- Townsend, D. T. K. and Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 145-155.
- Trivedi, S. P.; Kumar, M.; Mishra, A.; Banerjee, I and Soni, A. 2001. Impact of linear alkyl benzene sulphonate (LAS) on phosphatase activity in testis of the teleostean fish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Environmental Biology*. 22(4)263-266.
- Trof, R. J., DiMaggio, F., Leemreis, J. and Groeneveld, A. B. 2006. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock*. 26(3): 245-253.
- Tyler, C. R., Sumpter, J. P. y Bromage, N. R. 1988. *In Vivo* Ovarian Uptake and Processing of Vitellogenin in the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *The Journal of Experimental Zoology* 246: 171-179.
- Üner, N., Sevgiler, Y., Durmaz, H. and Piner, P. 2007. *In vivo* Alterations in Glutathione-Related Processes, Lipid Peroxidation and Cholinesterase Enzyme Activities in the Liver of Diazinon-Exposed *Oreochromis niloticus*. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 17: 317-324.
- Van Veld, P.; Rutan, B.; Sullivan, C.; Johnston, L.; Rice, Ch.; Fisher, D. and Yonkos, L. 2005. A Universal Assay For Vitellogenin In Fish Mucus and Plasma. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 24, No. 12, pp 3048-3052.
- Vega, L. A., Ramón, G. E., Galar, M. M., Jiménez, O. F. A., García, L. E. and Domínguez, L. M. L. 2007. Estrogenic, anti-estrogenic and cytotoxic effects elicited by water from the type localities of the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* Volume 145, Issue 3, April 2007, 394-403 pp.
- Vijayavel, K. and Balasubramanian, M. P. 2006. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in the edible estuarine crab *Scylla serrata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63(1):141-147.
- Vioque, F. A. 2008. Biomarcadores en cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) para evaluar la contaminación del Parque Doñana y el Estuario del Guadalquivir por metales y plaguicidas, Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, España. 158 p.

- Weber, K. and Osborn, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 244, 4405-4412.
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., and Hammock, B. D. 2008. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs), D. M. Whitacre (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008, 117-160 pp.
- Whitehead, A., Anderson, S. L., Ramirez, A, Wilson, B. W. 2005. Cholinesterases in aquatic biomonitoring: assay optimization and species-specific characterization for a California native fish, *Ecotoxicology*. 2005 Aug.; 14(6):597-606.
- Wilce, M. C. J. and Parker, M. W. 1994. Structure and function of Glutathione S-Transferases. *Biochem. Biophys. Acta*, 1205, 1-18.
- Wilczek, G.; Majkus, Z; Migula, P.; Bednarska, K. and Swierczek, E. 1997. Heavy metals and detoxifying enzymes in spiders from coal and metallurgic dumps near Ostrava (Czech Republic). *Proceedings of the 16th European Colloquium of Arachnology (Siedlce)*. pp. 317-328.
- Williams, A.P., Cosme, J., Matak, V.D., Ward, A., Angove, H.C., Day, P.J., Clemens Vonrhein, C., Tickle, I.J., Jhoti, H. 2004. Crystal structure of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* Vol. 305: 683-686.
- Winston, G. W. and Di Giulio, R. T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism. *Aquatic Toxicology*. 24: 143-152.
- Wolfe, M. F. and Kendall, R. J. 1998. Age-dependent toxicity of Diazinon and Terbufos in European starlings (*Sturnus vulgaris*) and red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(7): 1300-1312.
- Yousef, M. I. 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199(1):47-57.
- Zakaryan, A. E., Aivazyan, N. M. and Karagezyan, K. G. 2002. Comparative Analysis of the Superoxide Dismutase Activity in Tissues of Higher Vertebrates. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 382: 13-15. Translated from *Doklady Akademii Nauk*. 382(2): 264-266.
- Zapata-Pérez, O. 2002. CYP1A en tilapia (*Oreochromis niloticus*): caracterización y regulación por xenobióticos. Tesis (Dr). Cinvestav-Zacatenco, 114 pp.
- Zhang, X.; Yang, F.; Zhang, X.; Xu, Y.; Liao, T.; Song, S. and Wang, J. 2008. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow

(*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*. 86:4-11.

APÉNDICES

Publicaciones originadas de la tesis

Mendoza, R., Santillán, O., Revol, A., Aguilera, C. and **Cruz, J.** 2011. “Alligator gar (*Atractosteus spatula*, Lacépède 1803) vitellogenin: purification, characterization and establishment of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)”, International Journal -Aquaculture Research-, publicación aceptada.

Cruz, J., Aguilera, C. y Mendoza, R. 2010. Capítulo 6. “Efectos de la contaminación en la fisiología del catán” 163-187 p., en Mendoza, R., Aguilera, C. y Montemayor, J. “Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán *Atractosteus spatula*”, Universidad Autónoma de Nuevo León, ISBN: 978-607-433-359-6, Impreso en Monterrey, México, 2010.

Congresos Internacionales

Aguilera, C., **Cruz, J.** and Mendoza, R. “Physiological response of alligator gar (*Atractosteus spatula*) to pollution”, JOINT MEETING OF THE INTERNATIONAL NETWORK FOR LEPISOSTEID FISH RESEARCH AND MANAGEMENT AND THE SOUTHERN DIVISION OF THE AMERICAN FISHERIES SOCIETY ALLIGATOR GAR TECHNICAL COMMITTEE, 25 al 28 de mayo de 2010, Nicholls State University Thibodaux, LOU, USA.

Aguilera, C., **Cruz, J.** and Mendoza, R. “Sensitivity of pollution biomarkers in cultured alligator gar (*Atractosteus spatula*) juveniles”, Congreso Internacional WORLD AQUACULTURE 2009 del 25 al 29 de septiembre de 2009 en la ciudad de Veracruz, México.

Cruz, J., Aguilera, C., Mendoza, R. and Montemayor, J. “Evaluación del catán (*Atractosteus spatula*) como especie centinela de contaminación”, 56th ANNUAL MEETING OF THE SOUTHWESTERN ASSOCIATION OF NATURALISTS, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL del 23 al 25 de Abril de 2009.

Aguilera, C., **Cruz, J.** and Mendoza, R. “Biomarkers screening in alligator gar to assess the impact of pollution”, Congreso Internacional: Alligator Gar Working Group Meeting. Thibodaux, Louisiana, USA. 21-22 Febrero 2008.

----- Forwarded message -----

From: **Roberto Mendoza** <roberto.mendoza@yahoo.com>

Date: 2011/3/7

Subject: Fw: Aquaculture Research - Decision on Manuscript ID ARE-OA-10-
Dec-829.R1

To: CARLOS AGUILERA <caguigon16@gmail.com>

----- Forwarded Message -----

From: "ghaslam@wiley.com" <ghaslam@wiley.com>

To: roberto.mendoza@yahoo.com

Sent: Mon, March 7, 2011 10:21:28 AM

Subject: Aquaculture Research - Decision on Manuscript ID ARE-OA-10-
Dec-829.R1

07-Mar-2011

Dear Dr. Mendoza:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Alligator gar (Atractosteus spatula) vitellogenin: Purification, characterization and establishment of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" in its current form for publication in Aquaculture Research.

A completed Copyright Transfer Agreement form must be sent to the Production Department before your manuscript can be published. To access the form please follow the link -

<http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>

Please send the completed original CTA form to Juan Low by regular mail to the address below:

Juan Low

Production Editor

Wiley-Blackwell

Wiley Services Singapore Pte Ltd.

600 North Bridge Road

#05-01 Parkview Square

Singapore 188778
Tel: (+65) 6511 8236
Fax: (+65) 6295 6202 / 6511 8288
Email: are@wiley.com

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Aquaculture Research, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Yours Sincerely,
Dr. RW Hardy
Editor, Aquaculture Research
rhardy@uidaho.edu

Alligator gar (*Atractosteus spatula*, Lacépède 1803)
vitellogenin: purification, characterization and establishment of
an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Roberto Mendoza¹, Olga Santillán¹, Agnés Revol², Carlos Aguilera¹ and
Julio Cruz¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Apartado
Postal F -96, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, C.P. 66450, Nuevo León,
México.

²Institut Universitaire de Technologie de Brest - Rue de Kergoat - CS 93837 - 29238
Brest Cedex 3, France.

Phone/Fax: (8) 352 9772

e-mail: roberto.mendoza@yahoo.com

Running title: Alligator gar vitellogenin ELISA

keywords: alligator gar, *Atractosteus spatula*, vitellogenin, reproduction, ELISA

ABSTRACT

Alligator gar (*Atractosteus spatula*) is a non-teleost bony fish distributed in North America. Gar populations have drastically declined as a consequence of habitat deterioration and the lack of regulation for their capture. Control of reproduction is critical for recovering their natural populations. The impossibility to distinguish genders and the determination of sexual maturity has hindered their successful reproduction. This research was aimed at developing an immunoassay (ELISA) for the quantitative estimation of vitellogenin (VTG), a female specific protein. Plasmatic VTG from 17 β -Estradiol (E2)-induced juveniles and ovary vitellin (VTL) from adult females, were purified and characterized. Polyclonal antibodies against both proteins were produced to develop an ELISA. The immunoassay was validated by quality tests such as sensitivity, parallelism, recovery, reproducibility and specificity. VTG was determined in different tissues (plasma, mucus, liver, gills) of alligator gar. VTG and E2 concentrations in female breeders were found to be higher in November, before the spring spawning season. This approach represents a quick, reliable and non-invasive practical alternative to distinguish genders and evaluate gonad maturation.

BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y AVANCES
EN EL CULTIVO DE CATÁN *ATRACTOSTEUS SPATULA*

Roberto Eduardo Mendoza Alfaro
Carlos Javier Aguilera González
Jesús Montemayor Leal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Jesús Áncer Rodríguez
Rector

Rogelio Garza Rivera
Secretario General

Rogelio Villarreal Elizondo
Secretario de Extensión y Cultura

Celso José Garza Acuña
Director de Publicaciones

Biblioteca Universitaria Raúl Rangel Frías
Alfonso Reyes 4000 norte, Planta principal
Monterrey, Nuevo León, México, C.P. 64440
Teléfono: (5281) 8329 4111 / Fax: (5281) 8329 4095
e-mail: publicaciones@seyc.uanl.mx
Página web: www.uanl.mx/publicaciones

© Universidad Autónoma de Nuevo León
© Roberto Eduardo Mendoza Alfaro, Carlos Javier Aguilera González y Jesús Montemayor Leal

ISBN: 978-607-433-359-6

Impreso en Monterrey, México
Printed in Monterrey, Mexico

CAPÍTULO 6

EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN EN LA FISIOLOGÍA DEL CATÁN

JULIO CRUZ¹, CARLOS AGUILERA¹ Y ROBERTO MENDOZA¹,

¹. Grupo Ecofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

161

Introducción

La República Mexicana cuenta con aproximadamente 11,592.77 km de litoral, y 1,567,300 hectáreas están cubiertas por estuarios, correspondiendo 892,800 ha en el Pacífico y 674,500 ha en el Golfo de México (INEGI, 1984; Contreras, 1993). Dentro de los océanos y mares del país, el Golfo de México destaca por su gran productividad (Gore, 1992). Datos recientes muestran que las

escorrentías de los ríos y la mezcla de agua provocada por el viento son dos de los principales factores ambientales que afectan la productividad de las poblaciones de peces en las áreas tropicales y subtropicales tales como el Golfo de México (Lloret *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, el Golfo de México es una de las principales regiones productoras de petróleo del mundo, lo que en repetidas ocasiones ha generado consecuencias am-

RESUMEN CURRICULAR

Julio César Cruz Valdez

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, con Acentuación en Manejo de Vida Silvestre y Desarrollo Sustentable

Tesis: **EVALUACIÓN DEL CATÁN (*Atractosteus spatula*) COMO ESPECIE MONITORA DE CONTAMINACIÓN UTILIZANDO BIOINDICADORES BIOQUÍMICOS**

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 17 de marzo de 1975, hijo del Sr. Juan Manuel Cruz Villarreal y de la Sra. María Elva Valdez Hernández.

Educación: Biólogo en septiembre 2001, Maestro en Ciencias con especialidad en Recursos Alimenticios y Producción Acuícola en diciembre 2005.

Experiencia Profesional: Catedrático de la Universidad Alfonso Reyes en septiembre 2002 hasta agosto 2003 y en septiembre 2006 hasta mayo 2007.