



Biología de Huelva

Naturaleza, Biodiversidad,
Bioindicadores y Biomarcadores

Rafael Torronteras Santiago
[Ed.]

 DIPUTACIÓN
DE HUELVA

 uhu.es
PUBLICACIONES

 CÁTEDRA
DE LA PROVINCIA



Biología de Huelva

Naturaleza, Biodiversidad,
Bioindicadores y Biomarcadores





Biología de Huelva

Naturaleza, Biodiversidad,
Bioindicadores y Biomarcadores



Rafael Torronteras Santiago [Ed.]

DATOS EDICIÓN

PRIMERA EDICIÓN EN FORMATO EBOOK: ENERO 2021

I.S.B.N. (ebook): 978-84-18984-95-2

© Servicio de Publicaciones
Universidad de Huelva

Maquetación y Ebook

© Rafael Torronteras Santiago [Ed.]

Art&maña Publicitaria (artimana.com)

Esta obra se publica bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-
NoComercial-SinObraDerivada 3.0 España



Obra sometida al proceso de evaluación de calidad editorial por el sistema de revisión por pares.

Publicaciones de la Universidad de Huelva es miembro de UNE

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del editor. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutivo de delito contra la propiedad intelectual.

EL EBOOK LE PERMITE



Citar
el libro



Navegar por
marcadores e
hipervínculos



Realizar notas
y búsquedas
internas



Volver al índice
pulsando el pie de
la página



Comparte
#LibrosUHU



Únete y
comenta



Novedades
a golpe
de clic



Nuestras
publicaciones
en movimiento



Suscríbete
a nuestras
novedades

Índice

00. Prólogo	
Rafael Torronteras Santiago.....	9
01. Las bacterias extremófilas de los ríos ácidos de Huelva	
Francisco Córdoba García	17
02. Una microalga del río Tinto que aporta beneficios para la salud	
Francisco J. Navarro Roldán.....	51
03. Síntesis de la flora de la provincia de Huelva	
Adolfo F. Muñoz Rodríguez María Dolores Infante Izquierdo Enrique Sánchez Gullón	77
04. Vegetación general de Huelva	
Pablo J. Hidalgo Fernández	115
05. Hongos: ecología y biodiversidad en ecosistemas litorales de Huelva	
Francisco Javier Jiménez Nieva Francisco de Asís Sánchez González Cristina Caetano Sánchez	145
06. Monitorización del estrés ambiental en el medio acuático mediante la evaluación de biomarcadores inducidos por cadmio en <i>Carassius auratus</i> (Linneo, 1758)	
Yoselin Roa Aravena Antonio L. Canalejo Raya Rafael Torronteras Santiago	187
07. Moluscos dulceacuícolas de Huelva	
Juan Carlos Pérez Quintero	235
08. Anfibios y reptiles de la provincia de Huelva	
Juan Pablo González de la Vega Juan Carlos Pérez-Quintero	259
09. Ictiofauna continental onubense	
José Prenda Marín	295
10. Los mamíferos en Huelva	
Javier Calzada Carlos Gutiérrez-Expósito Jacinto Román Juan Quetglas	335
11. Ecología del litoral onubense (I): marismas mareales	
Eloy M. Castellanos Verdugo Carlos J. Luque Palomo	379
12. Ecología del litoral onubense (II): sistemas dunares	
Carlos J. Luque Palomo Eloy M. Castellanos Verdugo	417



Prólogo

Rafael Torronteras Santiago

Grupo Investigación de Respuestas Celulares al Estrés Ambiental (BIO-282). Área de Biología Celular. Departamento de Ciencias Integradas. Facultad de Ciencias Experimentales-Centro de Investigación RENSMA. Campus de Excelencia Ceimar. Universidad de Huelva. Campus de El Carmen. Bulevar de las Artes y las Ciencias, s/n. E-21071-Huelva. España.

Dr. Rafael Torronteras Santiago || torronte@uhu.es

Tel.: +34 959 21 98 91 || Fax: +34 959 21 94 67







Prólogo

Rafael Torronteras Santiago



Este libro surge como reconocimiento y modesto homenaje a la Biología en Huelva. A esa Biología con mayúsculas que los miembros, en su mayoría biólogos, del **Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública de la Universidad de Huelva**, quisieron *cultivar*, poner en valor y desarrollar con la constitución de dicho departamento y desde él. En este curso 2020/21 se han cumplido 20 años de la creación de ese querido departamento y que, desgraciadamente, fue eliminado en 2016 con motivo de las restricciones económicas impuestas por el Plan de Refinanciación de la Universidad. Dicho Plan supuso la fusión y desaparición de muchos departamentos, entre ellos el nuestro.

Para los biólogos de aquel Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública de Huelva era importante visibilizar, de manera institucional, la importancia y el gran valor de los estudios de Biología en la provincia de Huelva y, además, hechos desde su Universidad.

La configuración del **Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública** se fue fraguando desde que en 1997 (hace 25 años) empezaron a llegar a la Universidad de Huelva un grupo importante de nuevos profesores de Biología. Y ello fue posible gracias a la implantación de nuevos estudios en nuestra Universidad, como los de Ciencias Ambientales (curso 1996/97). Así se fueron contratando y se fueron formalizando plazas de profesorado universitario en 4 grandes áreas de conocimiento: en Biología Animal (Zoología), Biología Celular, Biología Vegetal (Botánica), y Ecología.

No obstante, y en honor a la verdad, hay que decir que la presencia de los estudios de Biología y de profesionales de la Biología (biólogos y biólogas) en la institución universitaria de Huelva no era nueva con la creación de este departamento, aunque sí era la primera vez que su presencia se consolidaba de manera institucional con departamento de biología, a la vez que se hacía más numerosa.

Los primeros biólogos y biólogas en los centros universitarios de Huelva estuvieron impartiendo sus conocimientos en la Escuela del Profesorado de E.G.B. de Huelva (antigua “Escuela Normal”), al principio dependiente de la Universidad de Sevilla y que se alojó en las instalaciones de lo que hoy conocemos como Campus de Cantero Cuadrado, y que son las dependencias actuales del Rectorado de la UHU. En esa Escuela Universitaria de Profesorado de E.G.B. se impartían especialidades de Ciencias Humanas, Literatura, Preescolar, Idiomas y Ciencias. Esta última especialidad incluía tres



grandes disciplinas, cada una integrada en un “Seminario” propio: “Seminario de Física y Química”, “Seminario de Matemáticas” y “Seminario de Ciencias Naturales”.

El Seminario de Seminario de Ciencias Naturales estuvo integrado originalmente por D^a Librada Vázquez Domínguez (licenciada en Ciencias Naturales y Catedrática de Escuela Universitaria), D^a Francisca Fernanda Fernández Illescas (licenciada en Ciencias Biológicas y Titular de Escuela Universitaria) y D^a Ana María Wamba Aguado (licenciada en Ciencias Biológicas y Titular de Escuela Universitaria), a los que se unieron D. Carlos González y Díaz de la Cortina (licenciado en Geología y Titular de Escuela Universitaria) y D. Miguel Ángel López Peña (licenciado en Ciencias Biológicas y Titular de Escuela Universitaria, que tras varios años en Huelva obtuvo una plaza en la Universidad de Sevilla). Tras la marcha de D. Miguel Ángel López Peña, se incorporó el profesor D. Francisco Córdoba García, como Catedrático de Escuela Universitaria, y al año siguiente se incorporó el también profesor D. Juan Carlos Pérez Quintero, como Titular de Escuela Universitaria.

Desde aquí también nuestro más profundo y eterno reconocimiento, admiración y agradecimiento a todos ellos por promover la enseñanza y el conocimiento de la Biología, y especialmente por hacerlo en tiempos difíciles donde la escasez de recursos y medios era habitual.

Con la creación de la Universidad de Huelva en 1993 y la adscripción de la Escuela de Magisterio a la UHU, los miembros (biólogos y biólogas) del “*Seminario de Ciencias Naturales*” de dicha Escuela se incorporaron a distintos departamentos de la nueva universidad. La profesora D^a Ana Wamba Aguado y el profesor D. Carlos González y Díaz de la Cortina se adscribieron al “Departamento de Didácticas Especiales”, mientras que los profesores, D^a Francisca Fernanda Fernández Illescas (Botánica), D. Francisco Córdoba García (Biología Celular), y D. Juan Carlos Pérez Quintero (Zoología) se integraron en la plantilla del Departamento de Ciencias Agroforestales, difuminándose así su presencia entre una inmensa mayoría de profesionales y áreas de la ingeniería, adscritas a ese mismo departamento.

En 1997 con la implantación de nuevas titulaciones, como la de Ciencias Ambientales, comienzan a incorporarse un mayor número de biólogos en el departamento de Ciencias Agroforestales, a distintas áreas de conocimiento.

Así, al **área de Ecología** se incorporan los profesores Eloy M. Castellanos Verdugo, Francisco Javier Jiménez Nieva y Carlos Javier Luque Palomo. En el **área de Biología Celular** se incorporan, además del mencionado profesor Francisco Córdoba García, los profesores Rafael Torronteras Santiago, Francisco J. Navarro Roldán y Antonio L. Canalejo Raya. En el **área de Botánica**, además de la mencionada profesora Francisca F. Fernández Illescas se incorporan los profesores Adolfo F. Muñoz Rodríguez y Pablo Hidalgo Fernández. Y, finalmente, en el **área de Zoología** se incorporan además del profesor Juan Carlos Pérez Quintero, los profesores José Prenda Marín y Javier Calzada Samperio.

Este grupo de biólogos y biólogas no solo se fueron incorporando a las distintas áreas de conocimiento que luego dieron origen a la creación del Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública, junto al área de Medicina Preventiva y Salud Pública, sino que también fueron creando y/o incorporándose a distintos grupos de investigación de la Universidad de Huelva, y adscritos al Plan de Investigación, Desarrollo e Innovación de la Junta de Andalucía (PAIDI). Así nos encontramos con la participación de estos biólogos y biólogas en los siguientes grupos de investigación:

**GRUPO BIO-282: Respuestas y Adaptaciones Celulares Frente al Estrés Ambiental.**

Dirigido por Francisco Córdoba García y con la participación entre otros miembros de Rafael Torronteras Santiago, Antonio L. Canalejo Raya y Pablo Hidalgo Fernández.

Grupo RNM-324: Biología de las Aguas Epicontinentales.

Dirigido por José Prenda Marín, y con la participación entre otros miembros de Juan Carlos Pérez Quintero.

GRUPO RNM-311: Ecología y Medio Ambiente.

Dirigido por Eloy M. Castellanos Verdugo, y con la participación entre otros miembros de Carlos J. Luque Palomo.

GRUPO RNM-358: Marismas y Playas.

Dirigido por Adolfo F. Muñoz Rodríguez, y con la participación entre otros miembros de F. Javier Jiménez Nieva y Javier Calzada Samperio.

GRUPO SEJ-523: Prevención de Riesgos Laborales.

Con la participación entre otros miembros de Francisco J. Navarro Roldán.

Muchas han sido las investigaciones que estos profesores y profesoras han realizado desde que empezaron a incorporarse a la Universidad de Huelva, y terminaron por constituir hace 20 años el **Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública**. De ello, da buena cuenta las numerosas y prestigiosas publicaciones y artículos científicos de sus *curricula*. Este libro sobre la Biología de Huelva supone todo un esfuerzo por mostrar parte de esos estudios biológicos en esta provincia. Cada uno de los distintos profesores de biología, y atendiendo a sus áreas de conocimiento, han dedicado uno de los capítulos de este libro a temas como la flora, la fauna, la vegetación, la ecología, los espacios naturales, la microbiología y las características ambientales de Huelva.

Así, en el **Capítulo 1**, se presentan “**las bacterias extremófilas de los ríos ácidos de Huelva**”. Estas bacterias son responsables en gran parte del denominado Drenaje Ácido de Rocas –cuando no se considera el efecto antropogénico- o del Drenaje Ácido de Minas –cuando su intensidad depende de las explotaciones mineras-, fenómeno por el cual se originan estas corrientes de agua caracterizadas por su acidez, color, y transporte de una variedad de metales. Estas bacterias tienen cada día mayor interés en la industria biometalúrgica. En otro sentido, la eliminación de metales de diversos residuos tiene también el interés cada vez mayor de mejorar la calidad ambiental y favorecer un desarrollo sostenible.



En el **Capítulo 2** se nos habla de “una microalga del río Tinto que aporta beneficios para la salud”, y donde se evalúa la capacidad antimicrobiana de algunos extractos obtenidos a partir de la microalga *Coccomyxa onubensis* (*C. onubensis*), un microorganismo extremófilo aislado de drenajes ácidos de la zona minera del río Tinto (Huelva, España). Así mismo la biomasa de esta microalga es rica en proteínas, lípidos, hidratos de carbono, antioxidantes y vitaminas, y, por lo tanto, su posibilidad de servir como alimento para animales también ha sido estudiada.

El **Capítulo 3** nos aporta una **síntesis de la flora de la provincia de Huelva** que posee una flora de plantas vasculares que reúne unos 1700 taxones, lo que supone una riqueza alta por su posición en un importante punto caliente de biodiversidad mundial. La singularidad de su flora es muy alta debido al gran número de endemismos que contiene, lo que determina que posea un número muy elevado de especies protegidas incluidas en el Catálogo de Especies Amenazadas de Andalucía. En Huelva habitan 10 taxones en peligro de extinción y 27 vulnerables, a los que hay que añadir 21 incluidos en el régimen de protección especial.

El **Capítulo 4** se dedica a la **vegetación general de Huelva** porque esta provincia es la de mayor superficie arbolada de Andalucía, aunque la mayoría de estos bosques proceden de plantaciones forestales, algunas muy antiguas. No obstante, aún conserva grandes extensiones de vegetación natural derivada de los enormes bosques mediterráneos de encina y alcornoque que poblaban la Península Ibérica. Se pueden identificar distintos tipos de encinares y alcornocales dependiendo de la litología y el bioclima. Con respecto a las plantaciones forestales, son muy frecuentes las de pinares y eucaliptares. Finalmente, en el corazón de la sierra, existen abundantes castañares, introducidos desde hace siglos para la explotación de su fruto y la madera.

El **Capítulo 5** nos habla de los **hongos: ecología y biodiversidad en ecosistemas litorales de Huelva**. En este capítulo nos centramos en la biodiversidad fúngica y su importancia en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres onubenses, aspecto que ha permanecido hasta la fecha sumido en una importante laguna de conocimiento, usando como ejemplo 70 especies diferentes de hongos (aunque se citan un total de 292 especies distribuidas por los diferentes órdenes y las principales familias de este reino), seleccionadas entre las más representativas y/o singulares de la comarca del litoral onubense.

En el **Capítulo 6** se presenta un ejemplo de las muchas investigaciones ambientales realizadas en Huelva y dedicada a la **monitorización del estrés ambiental en el medio acuático mediante la evaluación de biomarcadores inducidos por cadmio en *Carassius auratus* (Linneo, 1758)**. La contaminación en el medio acuático es un problema cada vez más serio y que va en aumento. Los organismos acuáticos, pueden acumular los xenobióticos del agua contaminada o de la cadena trófica. En peces expuestos a bajas concentraciones de un metal como el cadmio, muy presente en los drenajes en Huelva, se produce una bioacumulación en los tejidos asociada a la inducción de estrés oxidativo y el desarrollo de daño genotóxico. Los biomarcadores tempranos de exposición y efecto utilizados en este estudio aparecen como herramientas útiles para la biomonitorización de la contaminación ambiental en el medio acuático.

El **Capítulo 7** nos habla de los **moluscos dulceacuícolas de Huelva**. La fauna de invertebrados de Huelva ha sido, en general, poco estudiada. Existe gran cantidad de información acerca de la estructura de las comunidades en entornos emblemáticos como el Parque Nacional de Doñana o el



Paraje Natural Marismas del Odiel, pero del resto de la provincia de Huelva sólo se conocen mosaicos aislados. En este capítulo se recapitula información sobre 12 familias, 30 géneros y 32 especies (26 autóctonas y 6 introducidas).

El **Capítulo 8** nos descubre los **anfibios y reptiles de la provincia de Huelva**. En él se presentan las especies estudiadas a lo largo 36 años de salidas al campo para la confección del Atlas Herpetológico de la Provincia de Huelva, y paralelamente, el Atlas Herpetológico de Andalucía. Se hace una breve reseña de cada una de las especies y se aportan fotografías de las mismas. En total son 43 las especies presentes en la geografía onubense, de ellas 13 son anfibios, 9 son quelonios, cinco de las mismas son tortugas marinas que deben ser tratadas como especies divagantes, y un galápagos americano introducido, pero con poblaciones estables y perfectamente aclimatada, 12 saurios, 1 anfisbénido y 8 ofidios.

El **Capítulo 9** se centra en la **ictiofauna continental onubense**. Los peces continentales son los vertebrados más diversos y los más amenazados. En total se aporta información sobre 96 localidades continentales, la mayoría fluviales, en las que se han registrado 38 especies de peces, de las que 18 son de distribución primaria, es decir, estrictamente continentales. Esta extraordinaria ictiofauna está expuesta a un grave riesgo de extinción, como se puede comprobar a partir de las extinciones locales registradas en este trabajo. De aquí se deduce que se deben redoblar los esfuerzos de protección de los hábitats acuáticos.

El **Capítulo 10** nos descubre **los mamíferos en Huelva**. Esta provincia posee 23 espacios protegidos, entre ellos un Parque Nacional, dos Parques Naturales, ocho Parajes Naturales, un Paisaje Protegido, tres Reservas Naturales y una Reserva Natural Concertada. Entre todos los espacios protegen el 30% del territorio de la provincia de Huelva. Pero lo que es menos conocido es que Huelva es también rica y diversa en mamíferos. Como relata este capítulo, se han citado en la provincia hasta 72 especies distintas de mamíferos y 51 son comunes: seis especies de insectívoros, ocho especies de roedores, dos de lagomorfos, 19 especies de murciélagos, tres especies de ungulados, 10 de carnívoros y tres cetáceos. No en vano la provincia cuenta con seis áreas ZIM, Zonas Importantes para los Mamíferos de España.

El **Capítulo 11** está dedicado a la **ecología del litoral onubense (1): marismas mareales**. Las marismas mareales son ecosistemas únicos, de alto valor ecológico, que ofrecen bienes y servicios que trascienden del ámbito geográfico local y repercuten tanto a escala regional como global. Huelva es rica en estos ecosistemas. Los organismos son mayoritariamente halófilos y sus productores primarios exclusivamente especies halófitas, con adaptaciones que les permiten vivir en estos ambientes. A escala regional, las marismas, son zona de cría, guardería y alimentación de numerosas especies animales en el Golfo de Cádiz, algunas de interés comercial. A escala global, las marismas onubenses estén mundialmente reconocidas por su importancia ornitológica, fundamentales para las aves de humedales que, en sus rutas migratorias, encuentra en las marismas de Huelva puntos de alimentación, descanso y reproducción.

Y el **Capítulo 12** nos habla de la **ecología del litoral onubense (2): sistemas dunares**. Los sistemas dunares costeros son ecosistemas de transición de distribución mundial. Si bien están ceñidos a una pequeña franja del litoral, aportan importantes bienes y servicios ecosistémicos. Sin embargo, son espacios sometidos a una enorme tensión ambiental debido a la gran demanda por parte del



hombre para establecer instalaciones y realizar otros usos y actividades en su territorio (viviendas, paseos marítimos, vías de comunicación, agricultura, balnearios, etc.). Se consideran espacios amenazados y llegando incluso a su eliminación. La mayor parte de la costa de la provincia de Huelva dispone de una inmensa riqueza de sistemas dunares, con diferentes formaciones geomorfológicas. Dunas blancas, bosques litorales y dunas móviles forman parte de los sistemas dunares de un enorme valor natural.

Esperamos que el lector disfrute con esta Biología de Huelva que aquí le hemos querido mostrar y, sobre todo, poniendo de relieve el altísimo valor biológico, ecológico y medioambiental de la provincia de Huelva, así como visibilizar y reconocer el trabajo que los biólogos y biólogas de la Universidad de Huelva realizan desde que empezamos a incorporarnos a ella.

Finalmente, queremos agradecer a la Universidad de Huelva, al Vicerrectorado de Extensión Cultural y al Servicio de Publicaciones de la Universidad que hayan facilitado y posibilitado que este libro pueda ver la luz para conocimiento por parte de todos los onubenses de la riqueza de su tierra, de su naturaleza. Nos mueve también a ello el favorecer su protección, defensa y conservación. Y, al mismo tiempo, que este libro sirva también de estímulo a todos aquellos apasionados por la Biología y no duden en lanzarse a su estudio y conocimiento.



06



Monitorización del estrés ambiental en el medio acuático mediante la evaluación de biomarcadores inducidos por cadmio en *Carassius auratus* (Linneo, 1758)

Yoselin Roa Aravena || Antonio L. Canalejo Raya* || Rafael Torronteras Santiago*

Grupo Investigación de Respuestas Celulares al Estrés Ambiental (BIO-282). Área de Biología Celular. Departamento de Ciencias Integradas. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Campus de El Carmen. Bulevar de las Artes y las Ciencias, s/n. E-21071-Huelva. España.

* Corresponding author

Dr. Rafael Torronteras Santiago || torronte@uhu.es


Dr. Antonio Canalejo Raya

|| antonio.canalejo@dbasp.uhu.es

Tel.: +34 959 21 98 91 || Fax: +34 959 21 94 67







Monitorización del estrés ambiental en el medio acuático mediante la evaluación de biomarcadores inducidos por cadmio en *Carassius auratus* (Linneo, 1758)

Yoselin Roa Aravena || Antonio L. Canalejo Raya || Rafael Torronteras Santiago



RESUMEN

La contaminación en el medio acuático es un problema cada vez más serio y que va en aumento. Los organismos acuáticos, pueden acumular los xenobióticos del agua contaminada o de la cadena trófica. El cadmio es un metal que puede alcanzar el medio acuático y producir efectos adversos en los organismos debido a su alta toxicidad, incluso en baja concentración. Es por este motivo que es de gran importancia la monitorización ambiental de este metal por medio de bioensayos. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos tóxicos tempranos del cadmio sobre peces de la especie *Carassius auratus* (*L.*), mediante el desarrollo de bioensayos de laboratorio con diferentes concentraciones (0,01; 0,1 y 1 mg/L) y analizando biomarcadores de exposición y efecto como, la detección histológica de la bioacumulación de Cd en los órganos branquias e hígado mediante la tinción de Ditizona, el daño genotóxico mediante el test de micronúcleos y la inducción de estrés oxidativo mediante la cuantificación de daño oxidativo (peroxidación lipídica) y de la respuesta antioxidante [enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)]. Los resultados obtenidos mostraron que las tres concentraciones de cadmio provocaron la acumulación del metal en los dos órganos estudiados. Así mismo, se observó un aumento en la cantidad de micronúcleos en los eritrocitos de los peces expuestos a la mayor concentración de cadmio (700%, respecto al control). Además, se pudo identificar daño oxidativo con la medida de la peroxidación lipídica, un aumento del 72% (branquias) y del 90% (hígado) en los niveles de hidroperóxidos frente al control en los peces expuestos a 1 mg/L de cadmio. En relación con la respuesta antioxidante, la actividad SOD presentó un aumento del 67% (branquias) y 98% (hígado) frente al control en los peces expuestos a 1 mg/L. En el caso de la CAT, el aumento fue significativo desde la menor concentración en branquias, aumentando un 32% frente al control, y en la mayor concentración en hígado (en un 68%).

En conclusión, este estudio muestra que en peces expuestos a bajas concentraciones de cadmio se produce una bioacumulación del mismo en los tejidos que se asocia con la inducción de estrés oxidativo y el desarrollo de daño genotóxico. Además, estos efectos ocurren de manera muy rápida, detectándose a las 96 horas de exposición. Por ello, los biomarcadores tempranos de exposición y efecto utilizados en este estudio aparecen como herramientas útiles para la biomonitorización de la contaminación ambiental por este metal en el medio acuático.

PALABRAS CLAVE

Peces, biomonitorización ambiental, biomarcadores, ecosistemas de agua dulce, *Carassius auratus*, metales pesados, estrés oxidativo, cadmio, alteraciones histopatológicas, histoquímica.



| Prólogo

El grupo de investigación de “Respuestas y Adaptaciones Celulares frente al Estrés Ambiental” (Grupo BIO-282 de la Junta de Andalucía) que constituimos entre otros miembros, biólogos del área de Biología Celular de la Universidad de Huelva, lleva trabajando desde sus inicios en la activación y efectos del estrés oxidativo, el cual puede ser producido en condiciones de estrés ambiental. Los seres vivos (tanto vegetales como animales) tienen diversos mecanismos de defensa para hacer frente al estrés oxidativo.

Los mecanismos celulares antioxidantes son un eficaz sistema de defensa frente a distintos tipos de contaminantes (incluidos los metales pesados) y también son una excelente herramienta como biomarcadores de alerta temprana. Por tanto, el gran interés que tiene el estudio de la influencia de los metales pesados en los ecosistemas terrestres y acuáticos no se limita solo a la calidad ambiental, es decir, a conocer los niveles de contaminantes en suelos, aguas y/o sedimentos, sino además esos estudios se pueden aplicar a conocer el impacto que producen dichos xenobióticos (metales incluidos) sobre los organismos vivos. Nuestro grupo ha realizado estudios tanto en modelos vegetales y animales.

Inicialmente, nuestro grupo de investigación se centró en los estudios en especies vegetales, concretamente en *Spartina densiflora* (Brong) y en *Erica andevalensis* (Cabezudo & Rivera). Y últimamente, en dos especies animales de gran interés comercial como son la lubina y la dorada, con el objetivo general de conocer y desarrollar en ellos bioindicadores de contaminación metálica. Así, nuestra finalidad radica en el conocimiento sobre la capacidad que los metales pesados pueden tener de alterar o producir lesiones en diferentes células, tejidos u órganos y en el conocimiento de los mecanismos antioxidantes que poseen y que puedan establecerse como útiles biomarcadores tempranos del daño oxidativo causado por xenobióticos ambientales. Estos procesos están influidos por la biodisponibilidad metálica, por lo que también es importante el conocimiento geoquímico de estas sustancias tóxicas en los ecosistemas, incluyendo la especiación metálica.

Spartina densiflora (Brong) es una planta halófila que ha colonizado las marismas del río Odiel (Huelva), que presentan altos niveles de metales (Fe, Ni, Cu, Pb, Zn, As, Cd,...) debido a la histórica actividad minera en la cuenca y a la cercanía de un polo industrial petroquímico. Entre los metales destaca la elevada concentración de Fe en sedimentos. Sin embargo, en este medio *Spartina densiflora*, una gramínea de origen sudamericano, prospera con éxito, colonizando nuevas áreas y desplazando a especies nativas. Nuestras investigaciones demostraron que esta habilidad para colonizar ambientes pro-oxidantes y competir con especies autóctonas está relacionada con la posesión de mecanismos no enzimáticos (del ácido ascórbico), así como con la modulación de mecanismos enzimáticos muy eficaces como defensa antioxidante. Por otra parte, en el caso de *Erica andevalensis* (Cabezudo & Rivera) se trata de una especie vegetal endémica del sudoeste de la Península



Ibérica capaz de crecer en suelos muy afectados por la actividad minera (escorias de minas, riberas de los ríos Tinto y Odiel, etc.), sin competencia vegetal en estas zonas que muestran un alto rango de contaminación metálica, especialmente por cadmio (Cabezudo and Rivera, 1980; Nelson *et al.*, 1985; Soldevilla *et al.*, 1992; Asensi *et al.*, 1999; Márquez-García and Córdoba, 2010). Nuestros estudios en el laboratorio confirmaron que esta especie es capaz de reproducirse y crecer en presencia de altos niveles de metales (cadmio), gracias a la activación de su maquinaria enzimática antioxidante sumamente eficaz.

Finalmente, en los últimos años nos hemos interesado por la relación entre ambientes contaminados por metales pesados y aquellas patologías de peces relacionadas con estos contaminantes [Myers *et al.*, 1994; Blasco *et al.*, 1999., González de Canales *et al.*, 2001; Oliva *et al.*, 2009; entre otros]. Los peces son muy sensibles a muchos contaminantes y los cambios patológicos que sufren permiten definir la toxicidad de un ecosistema y establecer el peligro potencial que poseen los contaminantes que existen en él [Moiseenko y Kudryavtseva, 2001]. La presencia de lesiones en estructuras orgánicas de peces ha sido observada en ambientes contaminados por metales, así como en peces tratados experimentalmente con ellos [Arellano *et al.*, 1999]. Numerosas alteraciones observadas en el sistema vascular y las malformaciones durante su desarrollo larvario han sido asociadas a procesos de contaminación (Crespo, 1993). Así, se han descrito numerosos efectos histopatológicos producidos por sustancias tóxicas en diferentes órganos de peces [Domitrovic, 2000; Cerqueira y Fernandes, 2002; Mazon *et al.*, 2002; Ortiz *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2005; Vigliano *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2007 y 2009]. Nuestros trabajos han evaluado la presencia del daño inducido por metales (Cu, Pb, As) en peces obtenidos en zonas costeras de Huelva y Cádiz, y mantenidos en el laboratorio, con la intención de encontrar biomarcadores moleculares útiles de este daño a diferentes niveles (actividades enzimáticas, cuantificación de daños celulares y genotoxicidad). Concretamente, nuestros datos muestran que en ambientes particularmente contaminados, estos metales en concentraciones subletales son capaces de generar lesiones histopatológicas, una importante actividad enzimática antioxidante y un elevado potencial genotóxico en los peces, incluso con concentraciones metálicas y tiempos de exposición mucho más bajas que las encontradas medioambientalmente, hasta tres veces más bajas que las establecidas por las agencias reguladoras. El registro de la actividad enzimática antioxidante de determinados tejidos animales, así como el uso de test de micronúcleos en células sanguíneas pueden considerarse unos biomarcadores de alerta temprana apropiados para monitorizar la toxicidad y genotoxicidad inducida por metales pesados en ambientes acuáticos naturales o artificiales.

Como muestra de nuestros estudios os dejamos con el siguiente trabajo de investigación inédito, realizado con una especie animal, *Carasius aurata* (L.).



Carassius Auratus



[1]

Introducción

La polución en el medio acuático es un problema cada vez más serio y que va en aumento. Los organismos acuáticos, incluyendo peces, acumulan los xenobióticos del medio, directamente del agua contaminada o indirectamente a través de la cadena alimenticia (Ameur *et al.*, 2015), lo cual causa daños a nivel histológico y fisiológico que, en condiciones extremas, desencadenan su muerte. Por lo tanto, conservar el buen estado del medio acuático garantiza la supervivencia y conservación de las especies que lo habitan.

La presencia en el medio de concentraciones nocivas de algunos elementos químicos es un tipo especial de degradación que se denomina contaminación. El contaminante, en general, tiene un efecto adverso sobre los organismos. Por su origen puede ser geogénico o antropogénico (Galán y Romero, 2008). Los efluentes industriales, la eliminación de aguas residuales, la lixiviación del suelo y la lluvia son los principales fuentes de metales pesados en el medio acuático (Arellano *et al.*, 1999); además de la emisión de residuos domésticos o la aplicación de fertilizantes y pesticidas que favorecen la contaminación por metales pesados (Sánchez Moyano *et al.*, 2005). Los metales son la causa principal de toxicidad en las masas de agua y constituyen un amplio grupo de contaminantes acuáticos por su capacidad bioacumulable y no degradable, además de su biodisponibilidad y su toxicidad (Velma y Tchounwou, 2010).

Entre los metales considerados muy tóxicos se encuentran Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Ti, y Zn (Galán y Romero, 2008). Muchos metales son esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y seres humanos, como son el Na, K, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, Mo, Se, V, Zn y Mn. Las dianas celulares principales del proceso toxicológico de los metales son las proteínas, las membranas celulares, orgánulos y ADN. Los efectos tóxicos de los metales pueden producirse por la interacción directa entre el ion metálico libre y su diana (Ferrer, 2003). Por otro lado, los metales pueden participar de forma directa o indirecta en la formación de Especies Reactivas del Oxígeno (en adelante, EROs), llevando a las células al estado de estrés oxidativo, lo cual se asocia con efectos tóxicos a diferentes niveles. Además, los metales pueden generar mutaciones (daño genotóxico) y la consiguiente carcinogénesis, debido a que estos se intercalan o forman uniones covalentes con el ADN sin ser reparado antes de la replicación (Javed *et al.*, 2017).

El cobre, zinc, arsénico, plomo y cadmio son metales que se encuentran disueltos normalmente en el medio acuático y se encuentran definidos en las normativas de calidad de las aguas, tanto marinas como de ríos. Muchos de estos metales son absorbidos y acumulados por los peces e incorporados a la cadena trófica, causando problemas serios a la salud en los consumidores finales, como el hombre (Figueroa, 1998).

[1.1]

El cadmio (Cd)

El cadmio es un elemento químico de número atómico 48 y masa atómica 111,40; su símbolo en la tabla periódica es Cd. Es un metal pesado, blanco azulado, dúctil y maleable. En algunos aspectos



puede ser muy similar al zinc. Su estado de oxidación más común es +2. Además, puede presentar el estado de oxidación +1, siendo muy inestable. El Cadmio es un metal traza, no es esencial en las funciones biológicas de los organismos, siendo tóxico para las plantas, los animales y los humanos en pequeñas concentraciones.

| 1.1.1 | El cadmio en el medio ambiente

El cadmio está considerado como uno de los 126 contaminantes principales por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Waisberg *et al.*, 2003). Este metal es uno de los principales agentes tóxicos asociado a contaminación ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más temidas de un tóxico: a) efectos adversos para el hombre y el medio ambiente, b) bioacumulación, c) persistencia en el medio ambiente y d) dispersión (Ramírez, 2002).

El Cd puede alcanzar el medio ambiente de forma natural a través de los minerales del suelo, fuegos forestales, emisiones volcánicas, y actividades humanas como la minería, productos contenedores de metales, fertilizantes y por la combustión de gasolina. El cadmio puede producir efectos adversos debido a su alta toxicidad, incluso en baja concentración, y a su bioacumulación en la cadena alimenticia (Pereira *et al.*, 2016). Este metal es más tóxico en agua dulce, ya que en agua salada forma compuestos que son menos biodisponibles para los organismos (Bradl, 2005).

La meteorización de la roca madre es la vía geogénica principal de liberación del Cd al ambiente. Por otra parte, el aumento y la mayor intensidad de la minería y otras actividades humanas, como fertilizantes o la industria electrónica son la actual causa de las elevadas concentraciones ambientales de cadmio (Gramlich *et al.*, 2018). El Cd puede formar complejos solubles con sustancias húmicas provocando que no se reduzca su toxicidad como ocurre con otros metales. Por su parte, las fuentes principales del cadmio en el agua son los efluentes provenientes de fábricas de electrogalvanizados, petroquímicas y de la lixiviación de depósitos geológicos. Una de las principales formas de incorporación de este metal a la cadena alimentaria es a través de la dispersión en el suelo y aguas hasta las plantas y animales marinos. El ser humano incorpora al organismo aproximadamente un tercio del cadmio al que está expuesto con los alimentos de origen animal que consume y dos tercios de origen vegetal (Anton y Lizaso, 2001).

| 1.1.2 | Efectos tóxicos del cadmio en peces

El Cd representa un problema ecológicamente significativo debido a su capacidad de acumularse en organismos vivos y causar cambios morfológicos. El cadmio produce efectos similares en los peces y en los humanos, los cuales incluyen deformaciones del sistema esquelético y daño en el funcionamiento del riñón.

En peces se ha mostrado que se acumula principalmente en el riñón, hígado y branquias, causando cambios patológicos en los órganos citados (Giari *et al.*, 2007). En peces expuestos al Cd se observaron cambios como hiperplasia del epitelio lamelar primario y secundario, separación del epitelio respiratorio, necrosis e hipertrofia epitelial, telangiectasia lamelar e hiperplasia de células cloro, encargadas de la captación y liberación de Ca y Cl para la osmorregulación (Arellano *et al.*, 1999). En el hígado, se encontraron cambios en los hepatocitos como son cuerpos mieloides, daño en las mito-



condrias, dilatación del retículo endoplasmático y un número elevado de lisosomas y autofagosomas (Giari *et al.*, 2007).

Tanto el Cd como el As, el Hg y el Pb tienen en común la capacidad de incrementar la producción de radicales libres y de disminuir la disponibilidad de reservas antioxidantes del organismo, convirtiendo al estrés oxidativo en un componente clave en las consecuencias fisiopatológicas generadas por estos metales (Jomova y Valko, 2011).

[1.2]

Test de micronúcleos inducidos (MNI)

El ensayo de micronúcleos fue desarrollado por W. Schmid en 1975, e inicialmente se propuso para llevarlo a cabo en la medula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha utilizado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se le utiliza ampliamente (Zúñiga y Gómez, 2006). El test de micronúcleos es un ensayo para determinar el daño genotóxico provocado por distintas sustancias químicas y elementos físicos. Mediante este test se puede determinar el daño causado por los agentes mutagénicos sobre los cromosomas, identificando cromosomas rezagados y/o fragmentos (Martínez, 2005). Los micronúcleos son aglomeraciones de cromatina que se parecen al núcleo principal y son vistos como pequeños núcleos en el citoplasma de las células. Es un tipo de núcleo de menor tamaño, en comparación con el que se encuentra habitualmente. Se puede identificar fácilmente a través de la microscopía óptica en las células después de obtener una muestra de sangre, previamente preparada y con tinción de Giemsa al 5%, facilitando observar la cantidad de micronúcleos presentes en los eritrocitos (Carranza, 2011).

[1.3]

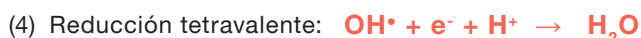
El estrés oxidativo

En las especies aerobias, aquellas que necesitan del oxígeno para poder realizar sus funciones vitales, durante el metabolismo aerobio se pueden generar moléculas muy tóxicas llamadas Especies Reactivas de Oxígeno (en adelante, EROs) y que se caracterizan por ser compuestos altamente reactivos.

El estrés oxidativo ocurre cuando se genera un desequilibrio entre la generación de EROs y la capacidad antioxidante, pudiéndose crear un daño celular, desatar trastornos fisiológicos y propiciar que se produzcan sucesos patológicos (Yu, 1994). Las EROs se caracterizan por ser compuestos altamente reactivos, ya que poseen uno o varios electrones desapareados en su molécula.

[1.3.1] Las especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las EROs pueden ser radicales libres y especies no radicales y se producen debido a alteraciones en la reducción tetravalente del oxígeno molecular (O_2) a agua (H_2O) en las mitocondrias. Así, se pueden formar distintos radicales del oxígeno parcialmente reducidos y altamente inestables (reacciones 1-4).



Los metales de transición con capacidad oxidorreductora como el Fe^{+2} o el Cu^+ , pueden acelerar la generación de EROs al actuar como catalizadores de la reacción de Fenton (reacción 5) que a su vez está integrada en el ciclo de Haber-Weiss (reacción 6) (Halliwell, 2006).



El ion superóxido (O_2^-) es un radical libre, que en condiciones normales se produce en pequeñas cantidades en la cadena respiratoria aeróbica. Por otro lado, puede ser sustrato, metabolito intermediario o metabolito final de algunas reacciones enzimáticas. Los principales daños causados por el superóxido en sistemas biológicos son 1) la destrucción de centros metálicos de proteínas, 2) la oxidación de cadenas laterales de lípidos y aminoácidos y 3) la formación de otras especies reactivas, como el radical hidroxilo y el peroxinitrito (Jiménez *et al.*, 2005). Su toxicidad es indirecta, ya que se fundamenta en que puede sufrir una conversión hacia otras especies derivadas del oxígeno que son muy reactivas y dañinas, tales como el radical hidroxilo (OH^\bullet).

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) no se considera un radical libre porque no posee electrones desapareados en su capa de valencia y, aunque es la forma menos reactiva de las EROs, presenta una serie de características que lo hacen especialmente relevante en el proceso de estrés oxidativo: 1) su vida media es de 1 milisegundo (ms), superior a la de otras EROs; 2) participa en numerosas reacciones que generan radicales libres; 3) tiene la capacidad de unirse a pequeñas moléculas como aminoácidos, nucleótidos y ácidos nucleicos; y 4) puede generar daño oxidativo en puntos de la célula alejados de su lugar de producción debido a que presenta carga eléctrica neutra, lo que le impide ser compartimentado por las células y le confiere la capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas. Por otro lado, la peligrosidad del H_2O_2 también reside en que es precursor directo del radical hidroxilo, la especie reactiva de oxígeno más peligrosa que se conoce (reacción 3).



El radical hidroxilo (OH^\bullet) es una de las especies químicas más reactivas que se conocen. A temperatura celular (37°C), su vida media es aproximadamente de 9-10 segundos, inferior al de otras EROs, lo cual le impide interactuar con moléculas alejadas de su lugar de producción. Por esta razón, el OH^\bullet reacciona sin especificidad alguna oxidando moléculas próximas. La elevada reactividad que presenta, así como la inexistencia de mecanismos enzimáticos celulares que la eliminen, hacen que evitar su formación sea una estrategia muy importante (Vranová *et al.*, 2002).

| 1.3.2 | El daño oxidativo

La peroxidación lipídica o lipoperoxidación es una constatación física del daño celular provocado por radicales libres y hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. En este proceso, los radicales libres capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares y en la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poliinsaturados debido a que contienen múltiples dobles enlaces, entre los cuales se encuentran los grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) que poseen hidrógenos particularmente reactivos.

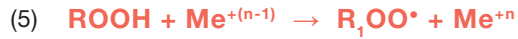
La peroxidación lipídica de membranas consiste en un proceso que se produce en tres fases fundamentales:

Fase I o iniciación: el proceso se inicia cuando las EROs, sobre todo el radical hidroxilo (OH^\bullet), extraen átomos de hidrógeno a las cadenas alifáticas de los ácidos grasos de las membranas celulares, provocando la formación de un radical lipídico bastante inestable (R^\bullet) y H_2O_2 .

Fase II o propagación: en esta fase, el radical lipídico reacciona con oxígeno molecular, generándose radicales peroxilos, hidroperóxidos (ROOH), peróxidos cíclicos y radicales alcóxílicos lipofílicos.

Fase III o terminación: los radicales formados en la fase anterior, que tampoco son estables, pueden reaccionar con un nuevo ácido graso, dando lugar a un nuevo radical lipídico y a hidroperóxidos lipídicos. Así mismo, los hidroperóxidos (ROOH) pueden descomponerse en varias especies reactivas incluyendo aldehídos como el malondialdehído (MDA), alcanos, epóxidos lipídicos y alcoholes, constituyendo la mayoría tóxicos y mutágenos activos.





Otro de los efectos deletéreos principales derivados del estrés oxidativo es el daño genotóxico. El daño oxidativo da lugar a la modificación química de las bases. El material genético tiene zonas con un alto grado de susceptibilidad para el ataque por $\text{OH}\cdot$, incluyendo las bases nitrogenadas y el esqueleto azúcar-fosfato. Así, este radical es responsable de la hidroxilación, de la apertura del anillo y de la fragmentación del DNA (Kelly *et al.*, 1998), lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o en la alteración de la expresión de genes (Rodríguez-Perón *et al.*, 2001).

| 1.3.3 | El sistema antioxidante

A lo largo de la evolución los organismos han desarrollado mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo. Estos mecanismos intentan prevenir la producción de EROs, detener o retardar la reacción de oxidación en cadena inducida por éstas y reparar los daños que causan a las macromoléculas. Estos mecanismos antioxidantes pueden diferenciarse en dos grupos: de tipo enzimático y no enzimático.

El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra los radicales libres. Está compuesto por una gran variedad de actividades enzimáticas capaces de desactivar selectivamente diferentes tipos de EROs, entre las que destacan la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran moléculas como la vitamina E, vitamina C (ácido ascórbico), el glutatión (GSH, que se encuentra en el citosol y las mitocondrias) y los carotenoides.

La actividad SOD reside en una familia de metaloenzimas de muy alta eficiencia catalítica que eliminan el ion superóxido (O_2^-). El principal proceso del que toma parte es en la catalización de una reacción de dismutación donde una molécula de O_2^- se oxida hasta O_2 molecular, mientras que la otra se reduce a H_2O_2 .



La CAT es una enzima que cataliza la reacción del H_2O_2 a H_2O . Se puede encontrar en prácticamente todos los órganos, sobre todo en el hígado y en eritrocitos. Constituye una hemoproteína en la que el átomo de hierro realiza un intercambio redox con una alta eficacia catalítica (Lee *et al.*, 2018).





[1.4]

El cadmio y el estrés oxidativo en peces

En general, el efecto tóxico de los metales está mediado por la inducción de la producción de EROs, bien de forma directa, como resultado del ciclo redox, o indirecta por la inactivación de los captadores de metales y por la inactivación de las enzimas antioxidantes (McRae *et al.*, 2016). Por lo tanto, la alteración de las actividades antioxidantes normales, la peroxidación lipídica y el daño genotóxico derivado como resultado de estrés oxidativo, son usados como buenos biomarcadores para monitorizar la presencia de metales u otros xenobióticos en el medio ambiente en general y, en particular, en el medio acuático mediante el uso de peces (Ramírez-Duarte *et al.*, 2017).

El cadmio no es un metal activo del ciclo redox. Sin embargo, está involucrado en la formación de EROs. Uno de los posibles mecanismos puede ser el incremento indirecto de las EROs, a través del desplazamiento de iones como el hierro y el cobre, de esa forma, Fe y Cu quedan libres para la formación de EROs por la reacción de Fenton (Jomova y Valko, 2011). Además, este metal actúa como un análogo del Ca, compitiendo con éste para ser absorbido a través del mecanismo de absorción de alta afinidad de Ca presente en las branquias (MacDonald *et al.*, 2002).

En la FIGURA 06-1, se esquematizan los principales efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular. Algunos autores mencionan que el cadmio no es directamente genotóxico (IARC, 1993; Dally y Hartwig, 1997), sino que induce estrés oxidativo mediante mecanismos indirectos, como el descenso de antioxidantes celulares y la liberación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Waisberg *et al.*, 2003). Varios autores han descrito la capacidad del ion cadmio para inducir especies reactivas de oxígeno en distintos tipos de células (Koizumi *et al.*, 1996; Thevenod *et al.*, 2000; Almazan *et al.*, 2000). La intensificación del metabolismo oxidativo da lugar a la generación del radical superóxido, el cual puede transformarse por conversión enzimática o espontánea a peróxido de hidrógeno que, a través de la reacción de Fenton puede generar el radical hidroxilo, altamente tóxico (Romero *et al.*, 2008).

De manera que el cadmio es capaz de inducir la producción de una gran variedad de especies reactivas de oxígeno, incluyendo O_2^- , H_2O_2 y OH^\bullet . Esto proporciona la principal explicación de la toxicidad celular de este metal pesado (Romero *et al.*, 2008). El mecanismo por el cual el cadmio inicia la formación de EROs puede deberse fundamentalmente a que este metal provoca un descenso intracelular del contenido de glutatión y reduce la actividad de las enzimas antioxidantes, permitiendo la acumulación de EROs y un incremento del estrés oxidativo intracelular (Waisberg *et al.*, 2003). Por este motivo, la exposición de especies al cadmio afecta el ADN celular e intensifica el estrés oxidativo (Romero *et al.*, 2008).

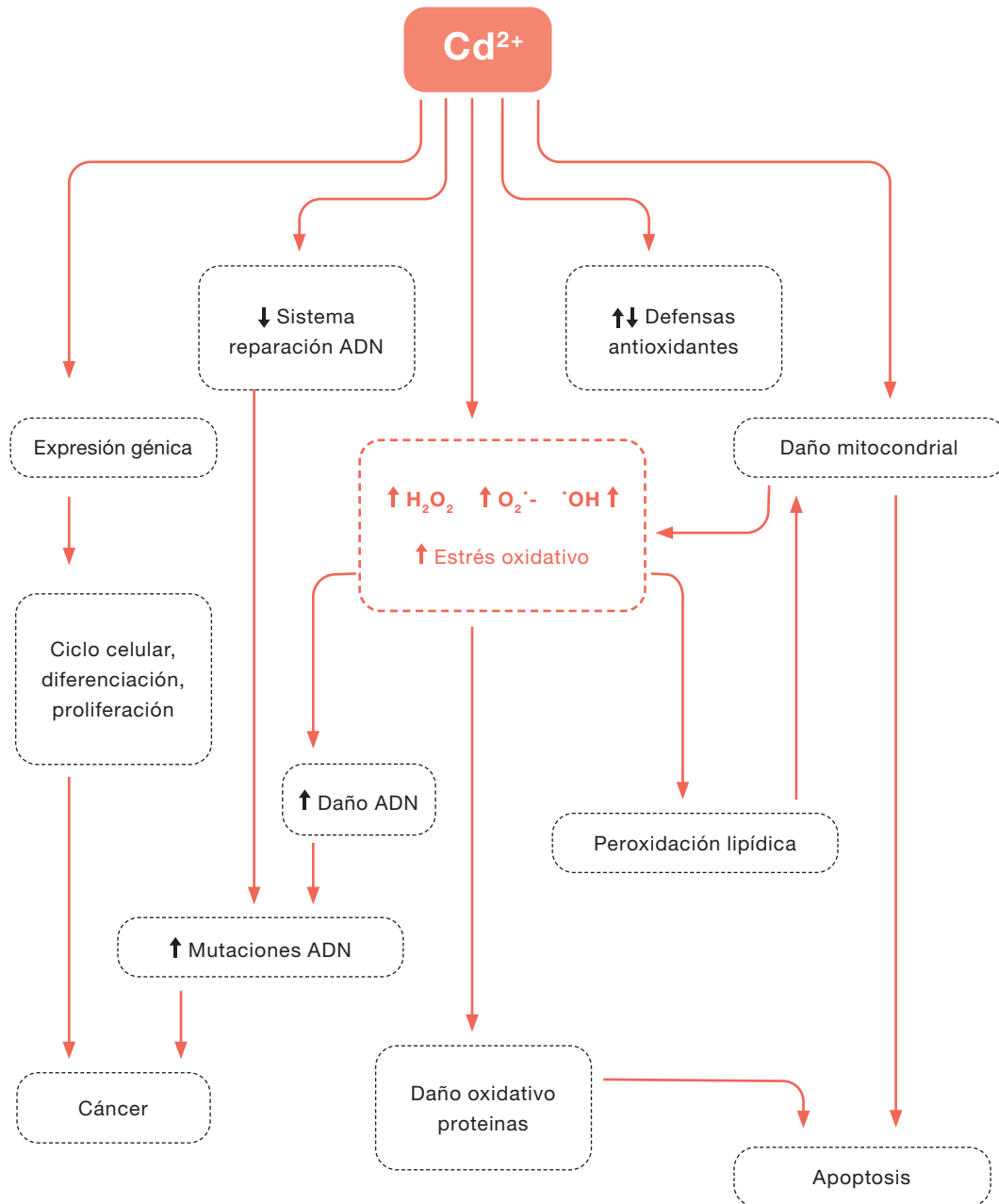
El cadmio, al igual que otros metales pesados, como el plomo y mercurio, presenta una elevada neurotoxicidad (Pohl *et al.*, 2006). Atraviesa la barrera hematoencefálica (Murphy, 1997) y puede acumularse en distintas regiones cerebrales (Lafuente *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2006). La neurotoxicidad asociada a la exposición al cadmio podría ser debida al efecto global de una serie de pequeñas perturbaciones en el metabolismo cerebral, y del estrés oxidativo en particular, ya que este metal parece intensificar la peroxidación lipídica a través de la inhibición de la superóxido dismutasa (SOD) y otros enzimas relacionados (Gutiérrez-Reyes *et al.*, 1998). Por otro lado, el aumento de especies reactivas de oxígeno puede conllevar diversas perturbaciones fisiológicas: mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, alteraciones en la transmisión sináptica, etc. (Evans, 1995).



FIGURA 06-1

Esquema general de los efectos tóxicos del cadmio a nivel celular

FUENTE: imagen tomada de: Repetto, G., Bejarano, A. & Jiménez, M. (2008). *La regulación de la protección frente al riesgo por agentes físicos*. Revista de Toxicología. pp. 25.





[1.5]

Los peces en la biomonitorización ambiental

El uso regular o sistemático de organismos vivos para evaluar los cambios producidos en el medio ambiente o en la calidad del agua recibe el nombre de monitorización biológica o biomonitorización (De Zwart, 1995). En el caso de ecosistemas acuáticos, debido a que los metales pesados pueden bioacumularse en órganos y tejidos de los organismos vivos y causar efectos nocivos sin que en el medio se sobrepasen los valores límites establecidos, este tipo de monitorización resulta mucho más real y eficiente.

Los peces son considerados excelentes bioindicadores de la calidad del medio acuático y por ello son ampliamente utilizados en los ensayos ecotoxicológicos que evalúan las respuestas biológicas y bioquímicas de los organismos frente a los contaminantes ambientales (Powers, 1989). El hecho de que aparecen ampliamente extendidos en el medio acuático, estando presentes en la mayoría de ambientes, incluso en los más contaminados, los hacen modelos idóneos para la monitorización del medio. Resulta interesante que presentan respuestas biológicas frente a la contaminación similares a las de mamíferos y que pueden afectar a la salud humana a través de la cadena alimenticia. Además, juegan un papel fundamental en la cadena trófica acuática, ya que son portadores de energía de niveles tróficos superiores e inferiores (incluyen diferentes niveles tróficos) (Beyer, 1996). A ello hay que sumar que son muy sensibles a pequeños cambios ambientales, pero también presentan una rápida capacidad de recuperación cuando las perturbaciones desaparecen (Bhattacharya *et al.*, 2007). Finalmente, en términos económicos y biológicos se pueden reducir los costos mediante el uso de pequeños peces de acuario en estudios de toxicidad (Domitrovic, 1997), los cuales presentan diferentes patrones de acumulación, dependiendo del metal, de la concentración en el medio y del tiempo de exposición (Eisler *et al.*, 1972).

En este sentido, los estudios de campo y laboratorio anteriores han demostrado que distintos tipos de marcadores enzimáticos y genéticos en distintas especies de peces podrían ofrecer un buen modelo como biomarcadores fiables para la vigilancia de la contaminación por metales en el medio acuático. Los estudios de evaluación de la toxicidad del Cd en peces son muy escasos en comparación con los correspondientes a otros metales. Por tanto, parece oportuno su abordaje pues, entre otros aspectos, podría ayudar a desarrollar procedimientos de monitorización ambiental de este metal en el medio acuático.

[2]

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar los efectos tóxicos tempranos que el cadmio tiene sobre los peces de la especie *Carassius auratus* (L.), mediante el desarrollo de bioensayos de laboratorio con Cd a diferentes concentraciones analizando los biomarcadores de exposición y de efecto.



Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- a) **Realizar un seguimiento y detección** histológica de la bioacumulación cualitativa del Cd en diferentes tejidos (branquias e hígado).
- b) **Evaluar la inducción de daño genotóxico** mediante el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.
- c) **Evaluar el estrés oxidativo** y los mecanismos de respuesta antioxidante inducida por el cadmio:
 - c1) Evaluar el daño oxidativo mediante medidas de peroxidación lipídica (hidroperóxidos) en dos órganos diferentes, branquias e hígado, de *Carassius auratus* (L.).
 - c2) Analizar las actividades enzimáticas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en branquias e hígado.

[3]

Material y Métodos

[3.1]

Ensayos de toxicidad con cadmio (Cd) en laboratorio

El estudio se llevó a cabo con peces de la especie *Carassius auratus* (L) en estadio adulto [FIGURA 06-2]. Se emplearon tanques de material de vidrio de 15 litros de capacidad.

Antes del inicio del tratamiento, los peces fueron aclimatados durante 24 horas sin alimentación tras lo cual se comenzaron los bioensayos. Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: los tanques fueron llenados con 10 L de agua dulce, la temperatura del agua fue de 24°C promedio, con oxigenación constante, sin recambio de agua durante el bioensayo y se utilizaron 9 peces por estanque de tratamiento.

Según estudios previos y de acuerdo a la literatura, los animales se expusieron a diferentes concentraciones de cadmio durante 96 horas, teniendo un tanque control:

- a) Tratamiento 0 (Control): Peces expuestos a una concentración de **0,0 mg/L de CdCl₂**
- b) Tratamiento 1: Peces expuestos a una concentración de **0,01 mg/L de CdCl₂**
- c) Tratamiento 2: Peces expuestos a una concentración de **0,1 mg/L de CdCl₂**
- d) Tratamiento 3: Peces expuestos a una concentración de **1 mg/L de CdCl₂**

FIGURA
06-2

Tanques para bioensayos de exposición a distintas concentraciones de cadmio con peces *Carassius auratus* (L).



[3.2]

Extracción y preparación de las muestras biológicas.

Se seleccionaron al azar individuos del control y de cada concentración para la extracción y procesamiento de las muestras que se utilizaron en los análisis de histología, bioquímica y micronúcleos. Una vez concluido el período de exposición, los peces fueron anestesiados a través de una dosis de 0,1% de 2-phenoxyethanol, posteriormente se midieron y pesaron. Después, fueron sacrificados y se les extrajo sangre del pedúnculo caudal. El mantenimiento de los peces y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo teniendo en cuenta la Directiva CEE 86/609 (Guía de uso y cuidado de animales de laboratorio).

A continuación se tomaron muestras biológicas del hígado y de las branquias que se fijaron en formol (pH 7,2) para la realización de los estudios histológicos. Paralelamente, otras muestras se congelaron a -80°C y se procesaron sin fijar, para el estudio biomarcadores de estrés oxidativo. A continuación, se especifican las preparaciones más detalladamente.



| 3.2.1 | Fijación, inclusión en parafina y sección para estudios histoquímicos

Se seleccionaron 3 peces por tratamiento para los análisis histológicos, muestras de hígado y branquias de estos peces fueron fijadas en formol tamponado a pH 7,2 durante 24 horas. Después de ello, fueron lavadas durante dos horas en agua corriente. Se inició entonces el proceso de deshidratación con alcohol 70% por 24 horas, se realizó un lavado rápido con alcohol 70% y se dejaron en alcohol 90% por toda una noche. Al otro día, se realizó 3 baños en alcohol 100% por 1 hora cada uno, posteriormente 2 baños de benceno (Xilol) de 30 min cada uno. A continuación, se llevó a cabo un baño de benceno/parafina (1:1) durante 4 horas a 60°C, desde esta etapa los baños se realizaron en la estufa para lograr mantener la temperatura, posteriormente un baño en parafina 100% durante 3 horas a 60°C, un segundo baño en parafina 100% durante toda la noche a 60°C y un último baño en parafina 100% durante 3 horas a 60°C. Se siguió esta metodología descrita por Bancroft *et al.* (1990).

Finalmente, se prepararon los bloques y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Por último, los bloques de parafina se tallaron manualmente y se realizaron cortes de 5 micras de espesor que se obtuvieron con un microtomo Jung RM 2025 (Leyca).

| 3.2.2 | Tinciones

Se realizaron dos tinciones diferentes. Por un lado, la de Hematoxilina-Eosina siguiendo la metodología descrita por Luna (1968). Esta tinción se utilizó para observar la estructura histológica de branquias e hígado de los peces estudiados. La hematoxilina es un colorante básico y esta característica genera que tenga afinidad por estructuras ácidas como es el núcleo celular, por otro lado, la eosina es un colorante ácido lo que genera que tenga afinidad por estructuras básicas como el citoplasma celular. Para la aplicación de la Hematoxilina-Eosina, primero a los cortes se les procedió a eliminar la parafina, se mantuvieron en un baño de Xilol por 30 min, posteriormente dos baños de alcohol al 100% y 90% por 15 minutos, un baño de alcohol de 70% por 10 minutos y dos baños en agua corriente y destilada por 10 minutos cada uno. Una vez concluidos los baños, se procedió a aplicar la tinción de Hematoxilina por 20 minutos, pasado este tiempo se lavó la muestra con agua corriente y se le agregó la Eosina por 5 minutos, concurrido este tiempo se procedió a lavar nuevamente las muestras y se continuó con la deshidratación con alcohol y Xilol para su posterior montaje con bálsamo de Canadá.

La tinción con Ditizona se utilizó para observar cambios a nivel celular generados por el Cd. Esta técnica fue desarrollada por Seregin e Ivanov (2001), y mejorada por Vieira da Cunha *et al.*, (2008), basada en la capacidad de la Ditizona para producir un compuesto de color rojizo después de reaccionar con algún metal en este caso el cadmio. Para la aplicación de la Ditizona primero a los cortes se les procedió a eliminar la parafina, se mantuvieron en un baño de Xilol por 30 min, posteriormente dos baños de alcohol al 100% y 90% por 15 minutos, un baño de alcohol de 70% por 10 minutos y dos baños en agua corriente y destilada por 10 minutos cada uno. Una vez concluidos los baños, se procedió a aplicar la tinción de Ditizona por 90 minutos y se continuó con el montaje, las muestras fueron montadas con glicerina para su posterior observación con microscopía óptica.

En el presente estudio, el cadmio ha sido el único metal agregado al agua en los distintos tratamientos, por lo que se supone que cualquier cambio en las tinciones histológicas entre las muestras



biológicas de los individuos control y tratados se debe al efecto del cadmio. Las secciones fueron analizadas en microscopía óptica y las imágenes fueron digitalizadas para su posterior análisis.

[3.3]

Ensayo de micronúcleos inducidos (MNi).

Se evaluó la frecuencia de micronúcleos inducidos (MNi) en los eritrocitos de sangre obtenida de la aleta caudal de cada pez. La preparación de los portaobjetos y los criterios de evaluación e identificación para MNi se realizaron como se describe en Cavas *et al.*, (2005). Brevemente, después de que los peces fueran anestesiados y sacrificados, se extrajeron muestras de sangre periférica de la aleta caudal y se realizó una extensión en un portaobjeto, se fijaron con etanol puro durante 20 minutos y una vez secos se tiñeron con solución de Giemsa al 5% durante 30 minutos. Se utilizó bálsamo de Canadá para el montaje de las muestras. Solo se evaluaron las células (eritrocitos) claramente aisladas de las células circundantes. Los criterios para la identificación de micronúcleos fueron los siguientes:

- a) MNi deben ser más pequeños que un tercio del tamaño de los núcleos principales.
- b) MNi debe estar claramente separados de los núcleos principales.
- c) MNi debe estar en el mismo plano de enfoque y tener el mismo color que los núcleos. La frecuencia de los micronúcleos se evaluó mediante la observación de los portaobjetos con un aumento de x1000 utilizando el microscopio óptico Leica DM 2500 y se expresó como el número de MNi/1000 células para al menos 18.000 células por tratamiento (2000 cel/ individuo).

Para evitar la generación de un sesgo en la evaluación de los micronúcleos, las muestras fueron codificadas por una persona diferente a la que realizó el conteo de los micronúcleos.

[3.4]

Evaluación de los parámetros bioquímicos

[3.4.1] Homogenización y extracción de la fracción subcelular de los órganos.

Los análisis bioquímicos llevados a cabo en el estudio se realizaron a partir de una fracción subcelular, la cual se obtuvo mediante un proceso de troceado y homogeneización (mediante el T10 Basic ULTRATURRAX®), siempre en contacto con hielo, en presencia de un tampón homogeneizador (tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, KCl 1,2%). Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 10.000g durante 30 min a 4°C quedando un sobrenadante que se alícuota y finalmente se conservó a -80°C hasta su uso en los ensayos bioquímicos.

[3.4.2] Evaluación de los Niveles de Hidroperóxidos

El proceso se llevó a cabo siguiendo el método descrito en Gay y Gebicki (2000), utilizando 50 µL de muestra (sobrenadante resultante del centrifugado) mezclado con 950 µL de reactivo FOX (Ferric-Xilenol Orange). El reactivo está compuesto por: Ácido sulfúrico 25 mM; Xilenol-Orange: 400 µL



en 200 mL de disolución; Sorbitol 100 mM; Sulfato Amónico de Fe (II) 250 μ M. La mezcla se incubó durante unos 45 minutos y se dejó reposar.

Posteriormente, se midió la absorbancia a 560 nm en cubetas de plástico, con las muestras en dilución de 1/20, y con un coeficiente de extinción de $2,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se utilizó el espectrofotómetro DU 800 Beckman Coulter.

| 3.4.3 | Evaluación de la Actividad Catalasa (CAT: EC 1.11.16)

La medida de la actividad catalasa se realizó siguiendo el método descrito en Aebi (1983). La mezcla de reacción contenía 2740 μ L de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7), 250 μ L de H_2O_2 y 10 μ L de muestra en hígado y 40 μ L de muestra en branquias, en un volumen final de 3 mL.

Las medidas se llevaron a cabo mediante un espectrofotómetro durante 30s cada una en las muestras de hígado y 45s para las muestras de branquias, a una longitud de onda de 240 nm. La actividad catalasa fue calculada en términos de nanomoles de H_2O_2 consumidos por minuto y mg de proteína ($\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}$). El coeficiente de extinción utilizado fue de $43,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se utilizó el espectrofotómetro DU 800 Beckman Coulter.

| 3.4.4 | Evaluación de la Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD: EC 1.15.11)

Esta medida se realizó siguiendo una modificación de la metodología expuesta en McCord y Fridovich (1969). Este método se basa en la capacidad de la SOD de inhibir la reducción del NBT mediada por el O_2^- generado por el sistema de la Xantina oxidasa.

La mezcla de reacción contenía: Tampón fosfato potásico 50 mM; EDTA 5 mM a pH= 7.8; Xantina 50 mM; NBT 1 mM; Xantina oxidasa 5.4 U^2/mL 50 μ L; Muestra de 50 μ L. La reacción se inició mediante la adición de la xantina oxidasa. Para alcanzar la velocidad máxima se llevó a cabo una incubación de un minuto, después de este tiempo se llevó a cabo la medida a 560 nm durante 30 segundos sin muestra, y a continuación con muestra para cuantificar el grado de inhibición. Así, la reducción del NBT en ausencia de muestra se empleó como referencia o control.

Una unidad de actividad SOD constituye la cantidad de enzima que produce un 50% de inhibición del control (donde la muestra es sustituida por el tampón). Se utilizó el espectrofotómetro DU 800 Beckman Coulter.

| 3.4.5 | Medida de la Cantidad de Proteínas

El procedimiento se realizó siguiendo el método descrito en Bradford *et al.*, (1976). Este procedimiento permite determinar la cantidad de proteína mediante un procedimiento colorimétrico. Se procedió a realizar una mezcla conformada por: Muestra 20 μ L; NaOH 50 μ L; Reactivo Bradford 1000 μ L.

La mezcla resultante se agitó y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente se pasó a medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 y 450 nm. Se construyó una recta de calibrado con BSA (Albumina de suero Bovino) 1 mg/ml. Se utilizó el espectrofotómetro DU 800 Beckman Coulter.



[3.5]

Análisis estadístico

Los resultados de los micronúcleos y los parámetros bioquímicos se presentan como la media \pm la desviación típica (SD). La normalidad fue comprobada mediante el test de Kolmorov-Smirnoff. Para la comparación de medias entre los grupos experimentales se utilizó un análisis de varianza no paramétrico, de Kruskal-Wallis, seguido del test post hoc de Dunn. Para ello, se utilizó el paquete estadístico SPSS 20 (IBM).

[4]

Resultados

[4.1]

Características morfológicas de los peces estudiados

En la TABLA 06-1 que se muestra a continuación, se presentan los valores medios de las tallas totales, tallas estándar y pesos de los individuos *Carassius auratus* (L) utilizados en el experimento de toxicidad de cadmio, distribuidos en los distintos tratamientos experimentales.

En total, los peces utilizados en los experimentos mostraron unas tallas totales medias de $8,0 \pm 1,0$ cm, una talla estándar media $4,9 \pm 0,7$ cm y un peso medio $3,3 \pm 0,9$ g. No se observó diferencias en la morfología de los peces estudiados entre los grupos experimentales.

TABLA
06-1

Datos de tallas y pesos de peces adultos de *Carassius auratus* (L.) para los diferentes grupos experimentales en el estudio de toxicidad de Cd. Los datos se presentan como las medias \pm SD.

Tratamiento	mg/L de CdCl ₂	N° de peces	Talla Std (cm)	TallaTotal (cm)	Peso (g)
Control	0	9	4,5 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6	2,9 \pm 0,8
T1	0,01	9	5,4 \pm 0,5	8,5 \pm 0,9	3,5 \pm 0,8
T2	0,1	9	5,3 \pm 0,5	8,5 \pm 1,0	3,8 \pm 0,9
T3	1	9	4,6 \pm 0,6	7,4 \pm 1,0	2,9 \pm 0,9
Total =		36	4,9\pm0,7	8,0\pm1,0	3,3\pm0,9



[4.2]

Identificación histoquímica de la disposición de cadmio en hígado y branquias

De las imágenes obtenidas para la histología se pudo observar hígado [FIGURAS 06-3, 06-5, 06-6 Y 06-7] y branquias [FIGURAS 06-4 Y 06-8] de *Carassius auratus* (L). Se obtuvieron cortes de los peces sometidos a los tres tratamientos de CdCl_2 y el control. De los peces control se observa hígado y branquias en condiciones normales, se identifican claramente los hepatocitos en el hígado, además de arteriola [FIGURA 06-5] y vénulas normales [FIGURA 06-6]. Además, se pueden observar branquias normales, identificando claramente arco branquial, láminas y laminillas branquiales [FIGURA 06-4]. En los peces control no se observó tinción con Ditzona de los hepatocitos en hígado [FIGURA 06-7], ni de las células epiteliales en branquias [FIGURA 06-8].

En el caso de los peces expuestos a las tres concentraciones distintas de CdCl_2 se pudo observar coloración marrón en células del hígado (hepatocitos) [FIGURAS 06-9, 06-11 Y 06-13] y células branquiales periféricas [FIGURAS 06-10, 06-12 Y 06-14]. Estos cambios en la coloración celular se deben a la capacidad de la Ditzona para producir un compuesto de color rojizo después de reaccionar con metales, como el cadmio, presentes en el interior de las células.

FIGURA
06-3

Histomorfología de hígado normal

Control. Aumento: 40x Tinción: Hematoxilina-Eosina.

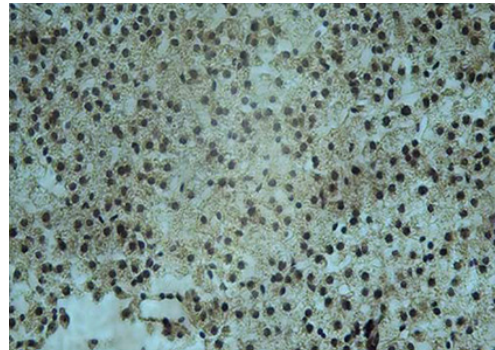


FIGURA
06-4

Histomorfología de branquias

Las flechas señalan laminillas branquiales. Control. Aumento: 40x Tinción: Hematoxilina-Eosina.

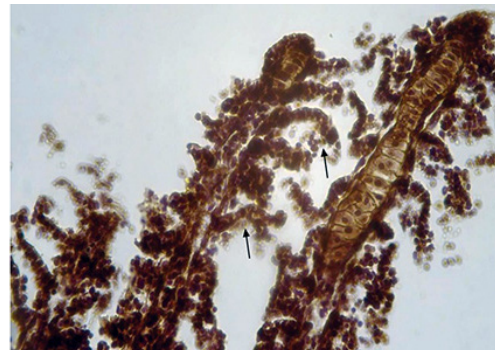




FIGURA
06-5

Histomorfología de hígado

Hepatocitos normales (flechas amarillas). Arteriola con células sanguíneas en su interior (flecha roja). Control. Aumento: 40x
Tinción: Hematoxilina-Eosina.

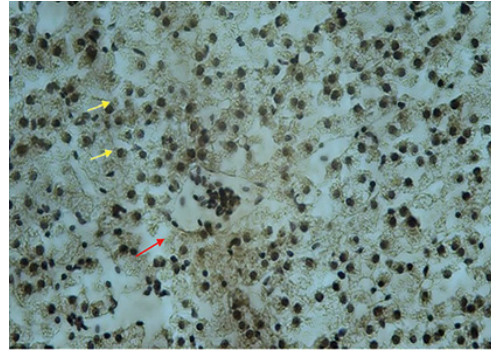


FIGURA
06-6

Histomorfología de Hígado

Flecha roja: vénula con células interior. Control. Aumento: 40x
Tinción: Hematoxilina-Eosina

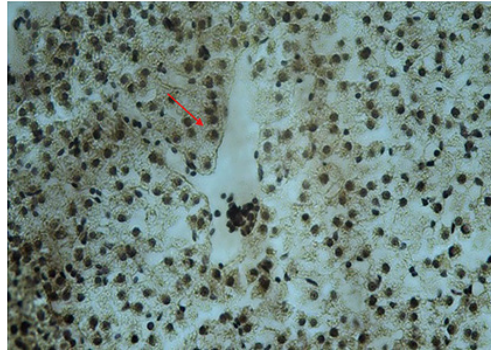


FIGURA
06-7

Histomorfología de hígado

Control. Aumento: 40x Tinción específica con Ditizona.

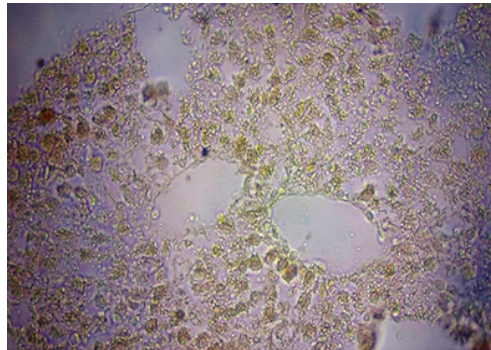


FIGURA
06-8

Histomorfología de branquias

Control. Aumento: 40x Tinción específica con Ditizona

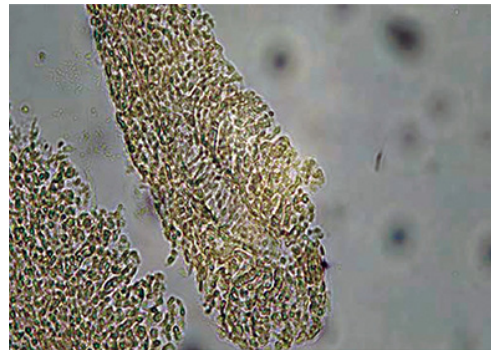




FIGURA
06-9

Histomorfología de hígado

Se identifica la tinción de hepatocitos ennegrecidos debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 1 (0,01 mg/L). Aumento: 40x. Tinción específica con Ditzona.

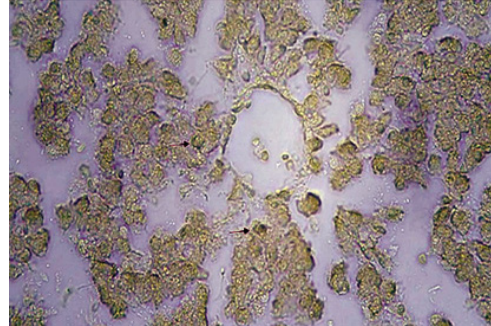


FIGURA
06-10

Histomorfología de branquias

Se identifica la tinción de células epiteliales ennegrecidas de las laminillas debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 1 (0,01 mg/L). Aumento: 40x. Tinción específica con Ditzona.



FIGURA
06-11

Histomorfología de hígado

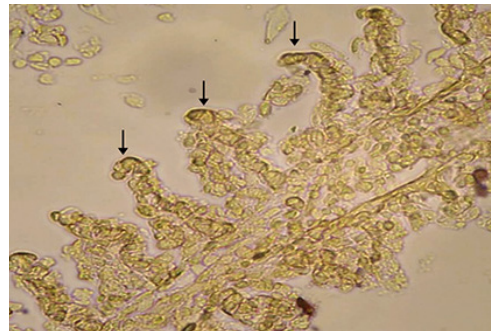
Se identifica la tinción de hepatocitos ennegrecidos debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 2 (0,1 mg/L). Aumento: 20x. Tinción específica con Ditzona.



FIGURA
06-12

Histomorfología de branquias

Se identifica tinción de células ennegrecidas de las laminillas periféricas debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 2 (0,1 mg/L). Aumento: 40x. Tinción específica con Ditzona.

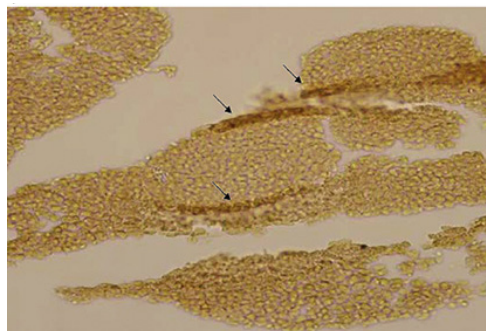




**FIGURA
06-13**

Histomorfología de Hígado

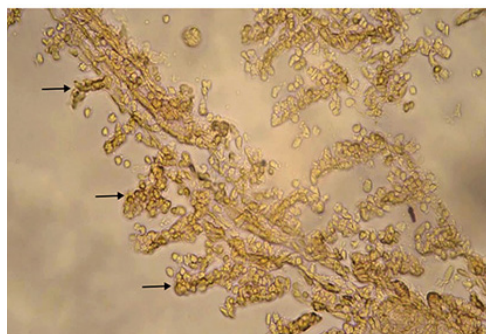
Se identifica la tinción de hepatocitos ennegrecidos debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 3 (1 mg/L). Aumento 20x. Tinción específica con Ditzona



**FIGURA
06-14**

Histomorfología de branquias

Se identifica la tinción de células ennegrecida de las laminillas periféricas debido a la presencia de cadmio (flechas). Tratamiento 3 (1 mg/L). Aumento: 40x Tinción específica con Ditzona.



[4.3]

Ensayo de micronúcleos inducidos (MNi)

Como se muestra en la FIGURA 06-15, al cabo de las 96 horas de exposición a las diferentes concentraciones de cadmio se observa una tendencia hacia el incremento en el número de micronúcleos asociado al aumento en la concentración de cadmio en el agua, con una dosis-dependencia significativa desde la concentración más baja de CdCl_2 usada (0,1 mg/L), donde los niveles de MNi contabilizados resultaron estadísticamente diferente del grupo control.

En la sangre periférica, extraída de la aleta caudal de *Carassius auratus* (L), para el análisis de MNi mediante microscopía óptica, se pudo observar a los eritrocitos normales [FIGURA 06-17] con un núcleo central de forma elíptica y con contornos definidos. Además, y con frecuencias muy reducidas, también se detectaron eritrocitos que presentaban algunas alteraciones en la morfología nuclear, eritrocitos con brotes nucleares “nuclear buds” [FIGURAS 06-17 Y 06-18], pero para este estudio solo se consideraron eritrocitos con micronúcleos bien definidos según los parámetros descritos en la metodología [FIGURAS 06-16, 06-17 Y 06-18].



FIGURA
06-15

Frecuencia de micronúcleos (MNi) inducidos por cadmio en peces *Carassius auratus* (L).

Después de 96 horas de exposición.

Los datos se muestran como media \pm SD, n=12. (*): $p < 0,01$ vs Control, T1 y T2.

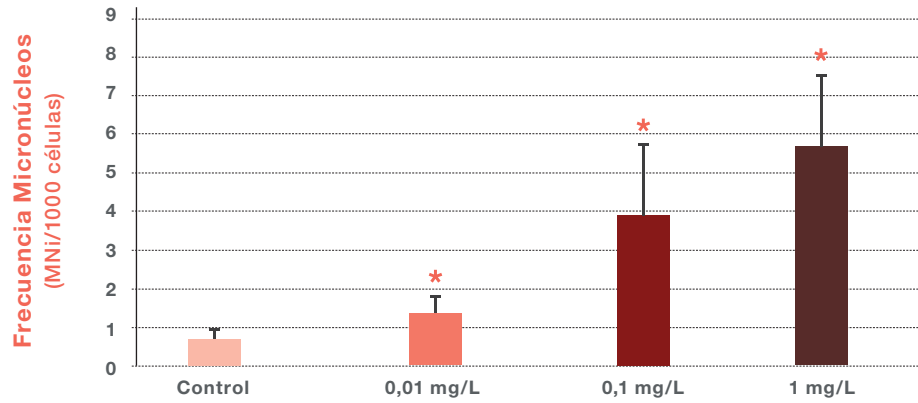


FIGURA
06-16

Eritrocitos de sangre periférica de *Carassius auratus* (L.), (flechas)

Eritrocitos con micronúcleos.

Aumento: 100x. Tinción: Giemsa 5%.

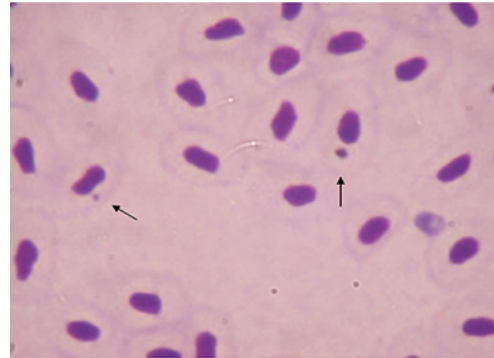


FIGURA
06-17

Eritrocitos de sangre periférica de *Carassius auratus* (L.), (flechas negras) Eritrocitos normales, (flechas rojas) Eritrocitos con "nuclear buds".

Aumento: 40x. Tinción: Giemsa 5%.

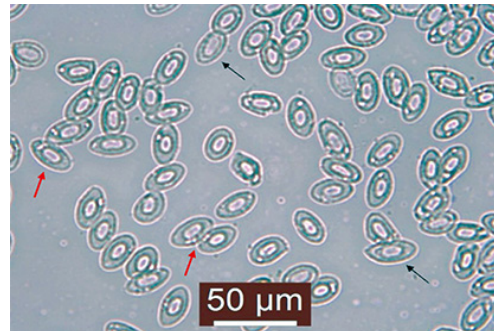




FIGURA
06-18

Eritrocitos de sangre periférica de *Carassius auratus* (L.), (flecha negra) Eritrocito con micronúcleos, (flecha roja) Eritrocito con "nuclear buds". Aumento: 100x. Tinción: Giemsa 5%.



[4.4]

Evaluación bioquímica de biomarcadores de estrés oxidativo

[4.4.1] Efecto del cadmio sobre los niveles de Hidroperóxidos (ROOH)

Los hidroperóxidos (ROOH) son productos generados durante el ataque oxidativo a moléculas como lípidos y proteínas; especialmente, en la reacción en cadena de radicales libres que tiene lugar durante la peroxidación lipídica de las membranas. Por tanto, la medida de éstos constituye un marcador de daño oxidativo en las membranas celulares. Se utilizó el método FOX (Fe-orange xilenol) (Gay y Gebicki, 2000) para la cuantificación de los niveles de hidroperóxidos.

Como se puede observar en las FIGURAS 06-19 Y 06-20, tras 96 horas de exposición a las distintas concentraciones se observó un aumento significativo con la mayor concentración de 1 mg/L de cad-

FIGURA
06-19

Niveles de hidroperóxidos (ROOH) en branquias de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. Control, T1 y T2.

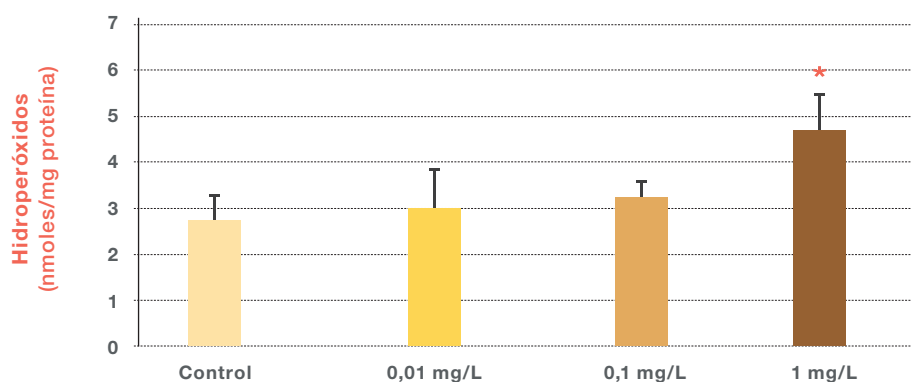
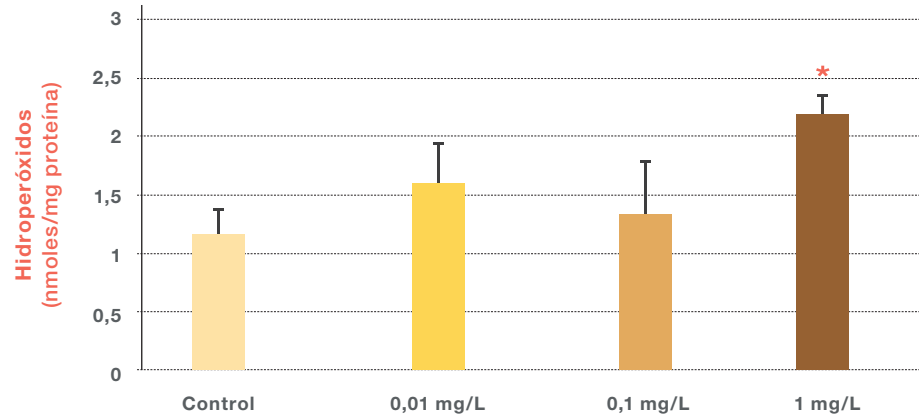




FIGURA
06-20

Niveles de hidroperóxidos (ROOH) en hígado de *Carassius auratus* (L.), expuestos a 4 tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. C y T2.



mio con respecto al control en ambos órganos estudiados (branquias e hígado). En las branquias no se observan diferencias significativas a 0,01 y 0,1 mg/L frente al control. Solo se observa diferencia significativa en 1 mg/L, donde se obtiene un aumento del 72% de la cantidad de hidroperóxidos. En el caso del hígado la situación se repite, registrándose también solo una diferencia significativa con la mayor concentración (1 mg/L) frente al control, observándose un aumento de hidroperóxidos del 90%.

| 4.4.2 | Efecto del cadmio sobre la actividad catalasa (CAT).

La actividad catalasa reside en una familia de isoenzimas especializadas en la eliminación del H_2O_2 , sin necesidad de disponer de un sustrato reducido.

En las FIGURAS 06-21 Y 06-22 se puede observar el efecto de los tratamientos con cadmio sobre la actividad de la CAT en los órganos estudiados. En ambos órganos se puede observar una estimulación por parte de las concentraciones de cadmio. En el caso de las branquias se observó un aumento significativo en los tres tratamientos utilizados respecto al control. En la FIGURA 06-21, se observa un aumento del 32% en las concentraciones de 0,01 y 0,1 mg/L ($CdCl_2$) y del 89% en 1 mg/L, en la actividad CAT. En el hígado se observó en la concentración 0,1 mg/L un aumento del 21% y en 1 mg/L del 68% en la actividad de la catalasa respecto al control, siendo ambos significativos [FIGURA 06-22].

| 4.4.3 | Efecto del cadmio sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD).

La actividad superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa frente al radical superóxido, que es transformado en agua oxigenada (reacción de dismutación). En las células eucarióticas existen dos tipos, CuZn-SOD y Mn-SOD, siendo ésta última de localización mitocondrial. Como puede observarse en las FIGURAS 06-23 Y 06-24 se aprecia una tendencia al aumento en todos los tratamientos



en ambos órganos estudiados, pero éste sólo resultó ser significativamente diferente frente al control en la mayor concentración de cadmio utilizada (1 mg/L). En las branquias, las concentraciones de 0,01 y 0,1 mg/L no presentaron diferencias significativas frente al control. En la FIGURA 06-23 se observa un aumento del 67% en la concentración 1 mg/L (CdCl_2) de la actividad de SOD. La misma situación se repite en el hígado, donde se observa un aumento del 98% en la actividad de la superóxido dismutasa [FIGURA 06-24] solo en la concentración 1 mg/L (CdCl_2), mientras que en las dos concentraciones más bajas no presentan diferencias significativas respecto al control.

FIGURA
06-21

Actividad catalasa (CAT) en branquias de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. Control; (#): $p < 0,05$ vs T1 y T2.

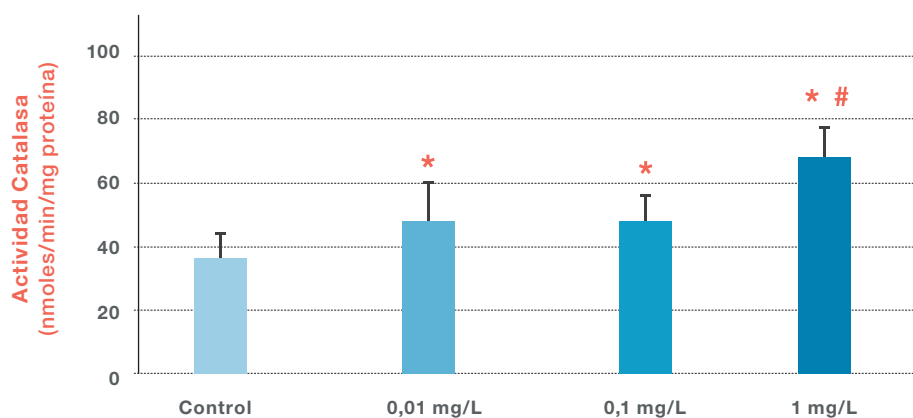


FIGURA
06-22

Actividad catalasa (CAT) en hígado de *Carassius auratus* (L.), expuesto a tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. Control, T1 y T2; (#): $p < 0,05$ vs Control.

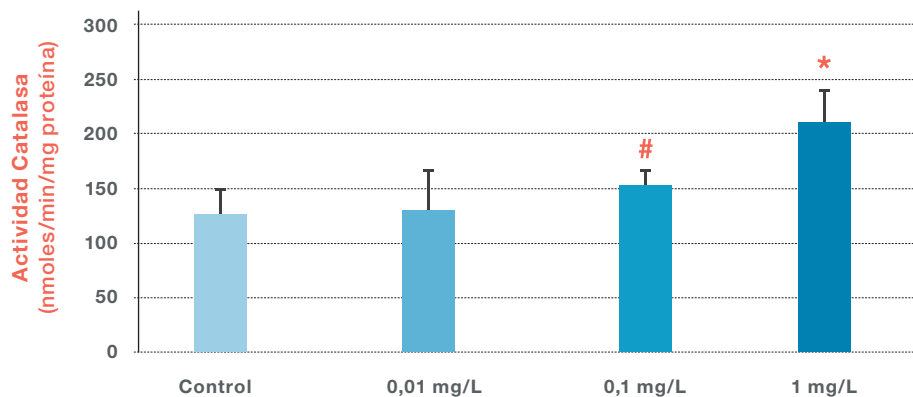




FIGURA
06-23

Actividad superóxido dismutasa (SOD) en branquias de *Carassius auratus* (L.), expuestas a tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. Control, T1 y T2.

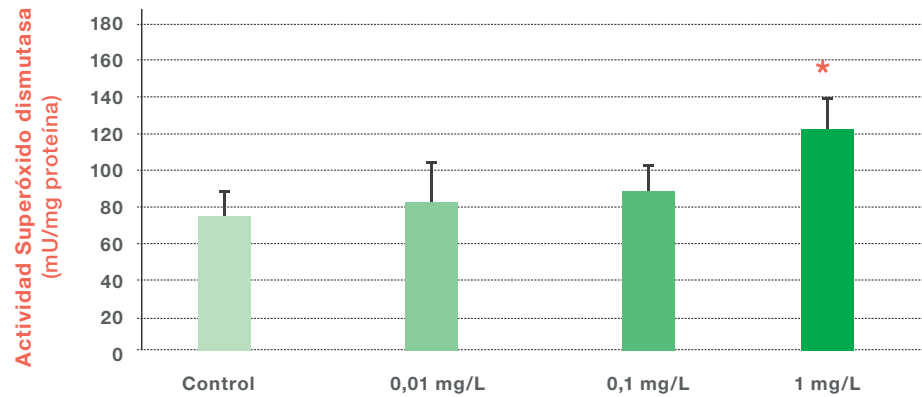
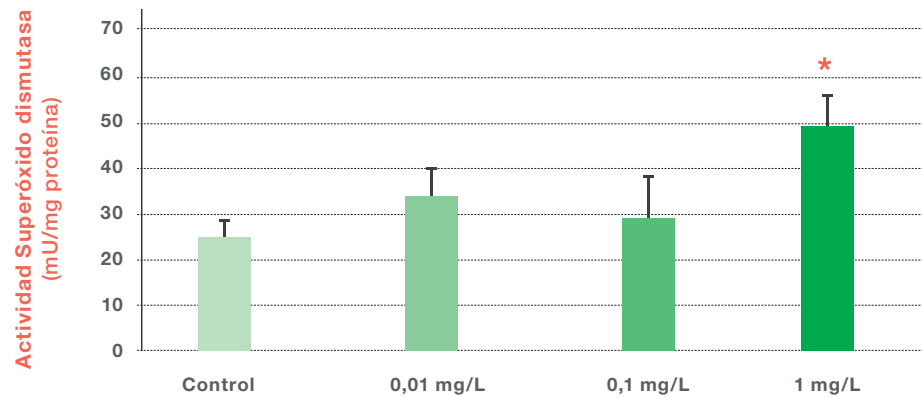


FIGURA
06-24

Actividad superóxido dismutasa (SOD) en hígado de *Carassius auratus* (L.), expuestas a tratamientos con diferentes concentraciones de cadmio (0, 0.01, 0.1 y 1 mg/L en el agua) durante 96 horas de tratamiento. Se muestra la media \pm SD, n=9. (*): $p < 0.01$ vs. Control y T2.



[5] Discusión

La contaminación ambiental es un tema que nos afecta a todos, es considerado un problema global, siendo los metales pesados uno de los contaminantes de mayor importancia debido a su toxicidad y acumulación en los organismos y a la biomagnificación a través de la cadena trófica (Shafaqat *et al.*,



2014). Los metales pesados como, por ejemplo, arsénico, cadmio, mercurio y plomo, son considerados los más tóxicos para el ambiente y las especies animales (Pandey y Madhuri, 2014). Estos metales producen efectos biológicos adversos en los organismos llegando a ser letales o subletales (Pandey y Madhuri, 2014). Los efectos tóxicos de los metales pesados se manifiestan afectando a la tasa de crecimiento, a funciones fisiológicas, reproducción y mortalidad. Los organismos acuáticos pueden absorber los contaminantes directamente del agua (vía directa) y/o a través de la alimentación (vía indirecta). Desde el punto de vista orgánico, los metales pueden ingresar en los peces mediante tres vías: branquias, superficie de la piel y tracto digestivo. Las branquias son la vía a través de la cual se produce la mayor tasa de ingreso de los metales en el cuerpo del animal desde el agua, mientras que la superficie de la piel representa el menor porcentaje (Shafaqat *et al.*, 2014).

Los organismos, también los acuáticos, necesitan de algunos metales pesados en muy pequeñas cantidades para su supervivencia (microelementos o metales esenciales). Sin embargo, en concentraciones inadecuadas, todos los metales pueden llegar a ser sustancias tóxicas y contaminantes ambientales no biodegradables, susceptibles de acumularse en los tejidos y órganos de los animales, y causar graves daños en el hígado, páncreas, sistema nervioso central, tejidos mucosos, tracto intestinal y sistemas reproductores. Estas sustancias tienden a unirse covalentemente a macromoléculas y ADN, lo que puede favorecer la inducción de estrés oxidativo (Gaete *et al.*, 2017). La toxicidad de estas sustancias depende de las rutas que tomen, la posición del organismo expuesto en la cadena alimentaria, el tipo de metal, la edad de los individuos expuestos, la genética o el género (Łuczyciska *et al.*, 2018).

En el medio acuático, el cadmio está presente en forma de ion libre o como complejo iónico asociado a otras sustancias inorgánicas u orgánicas. Los compuestos de cadmio solubles se movilizan en el agua, mientras que los insolubles se depositan en el sedimento (ATSDR, 2012). Los niveles de cadmio son generalmente más elevados en las zonas próximas a plantas metalúrgicas y minas. Además, la utilización de fertilizantes superfosfatados en suelos agrícolas resulta en la acumulación de cadmio y la posterior escorrentía a ríos (McDowell, 2009) y, por lo tanto, su transporte hacia los océanos. El drenaje ácido de minas moviliza cadmio enriquecido naturalmente que conduce a elevadas concentraciones en el agua. Encontramos varios ejemplos de ello. Un ejemplo es lo que ocurre aguas abajo de la mina Tui en Te Aroha (Nueva Zelanda) donde se han medido concentraciones de cadmio de 286 µg/L (Sabti *et al.*, 2000), mientras que concentraciones mucho más altas de 800 µg/L se han reportado en corrientes asociadas con drenaje ácido de minas en la región de la costa oeste de Nueva Zelanda (Craw *et al.*, 2005). En el caso de Huelva (España), la carga media calculada de contaminantes transportada por el río Odiel a la ría de Huelva y golfo de Cádiz es 45 t / día de metales entre los que se encuentra el cadmio (Fe+Zn+Mn+Cu+Pb+Cd) (Sarmiento *et al.*, 2004). La cantidad y tipología de vertidos de metales pesados a la Ría de Huelva están relacionados con el caudal de agua dulce (y, en consecuencia, con las precipitaciones). Así, durante las crecidas o inundaciones se registró una descarga máxima diaria de 72.475,00 kg de metales pesados, de los cuales 1481 kg fueron de As, 470 kg de Pb y 170 kg de Cd (Sainz *et al.*, 2004)

El cadmio representa uno de los metales de mayor contaminación en muchas partes del mundo encontrándose acumulado en altas concentraciones en los tejidos de los peces en ambientes acuáticos con contaminación (Zelikoff *et al.*, 1995). Los efectos tóxicos del cadmio se encuentran bien descritos en



peces pudiendo afectar procesos fisiológicos y bioquímicos en tejidos y órganos (Al-Asgah *et al.* 2015). Este metal se acumula en diferentes órganos (hígado, páncreas, riñones, intestino, branquias, etc.) causando cambios histopatológicos en ellos (Abalaka, 2015). La acción del cadmio resulta en un bloqueo de los grupos sulfhídricos de las enzimas, donde compite por sitios de ligamiento con el Zn (Allen, 1993). Las actividades de las enzimas glucolíticas aumentan bajo condiciones anóxicas, sin embargo, en organismos contaminados con Cd tales ajustes bioquímicos son alterados, reduciendo la producción de energía y limitando la capacidad de sobrevivir frente al estrés anóxico (Nuseti *et al.*, 2010).

En su forma iónica (Cd^{2+}), el cadmio en el agua imita el calcio (Ca^{2+}), entrando en los peces a través de los canales de calcio del epitelio apical (Galvez *et al.*, 2006; Verbost *et al.*, 1987). Una vez absorbido, la magnitud de la acumulación de cadmio se correlaciona con la magnitud del efecto tóxico (McGeer *et al.*, 2012). De acuerdo con su ruta de entrada, los principales efectos tóxicos del cadmio son sobre la homeostasis del calcio. Por ejemplo, la ATPasa del calcio ubicada en la membrana basolateral del epitelio branquial es inhibida por el cadmio (Verbost *et al.*, 1987), lo que resulta en un deterioro de la absorción de calcio, hipocalcemia plasmática y una eventual muerte (McGeer *et al.*, 2000).

El cadmio también puede afectar la homeostasis de otros iones. Debido a la pérdida constante de sodio desde el cuerpo (donde está más concentrado) al ambiente (más diluido), existe un mecanismo en los peces de agua dulce para absorber sodio en las branquias. Esto se logra, en parte, por enzimas tales como la anhidrasa carbónica (CA) y la ATPasa de sodio/potasio (NKA), que ayudan a generar condiciones favorables para el transporte de sodio a la branquias de los peces, en contra de un gradiente de concentración (Hwang *et al.*, 2011). Se sabe que el cadmio perjudica la actividad de NKA y CA (Da Silva y Martínez, 2014; Lionetto *et al.*, 1998), lo que conducen a un deterioro de la absorción de sodio y comprometiendo el estado del sodio corporal (Da Silva y Martínez, 2014; McGeer *et al.*, 2000).

Otros problemas provocados por el cadmio en peces son: el daño oxidativo (medido por la peroxidación lipídica, se ha observado daño en el ADN y carbonilación de proteínas) (Nunes *et al.*, 2015; Thomas y Wofford, 1993); la inhibición de la actividad antioxidante de enzimas a través de la unión al sitio activo, y/o el deterioro de la unión enzimática apropiada (Wang *et al.*, 2015). También puede aumentar la producción de EROs a través del desplazamiento de hierro en la reacción de Fenton, que puede conducir a daño oxidativo (Nair *et al.*, 2013).

Los estudios en peces, como bioindicadores, se han ido haciendo cada vez más comunes para poder identificar la toxicidad de diferentes metales. Estos ensayos de toxicidad realizados en condiciones controladas en el laboratorio tienen la ventaja de poder aislar el efecto de un único contaminante y relacionarlo de forma precisa con las concentraciones de exposición establecidas para el estudio.

En el presente estudio se han evaluado distintos parámetros: a) la inducción de daño genotóxico del cadmio mediante los ensayos de micronúcleos; b) se identificó acumulación de cadmio en células de branquias e hígado; c) y se evaluó su efecto en la inducción de estrés oxidativo a través de la cuantificación del daño oxidativo por medio de la medida de peroxidación lipídica y de la respuesta antioxidante (evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes). Para los bioensayos se utilizó individuos de la especie *Carassius auratus* (L). Las pruebas fueron realizadas en tanques con tres concentraciones distintas (0,01; 0,1 y 1 mg/L) y teniendo como referencia un tanque control; la exposición de Cd se llevó a cabo durante 96 horas, a través de su adición al agua porque imita mejor la exposición natural a los metales disueltos o suspendidos en el agua (Rodríguez-Cea *et al.*, 2003).



Los resultados obtenidos muestran que las tres concentraciones distintas de cadmio generaron la acumulación del metal en los dos órganos estudiados, branquias e hígado, como indican los estudios histoquímicos, y paralelamente se observa un aumento en la cantidad de micronúcleos en los eritrocitos de los peces así como en la inducción de estrés oxidativo después de 96 horas de exposición.

Existen numerosos procedimientos para medir genotoxicidad. Una herramienta de alerta temprana para medir genotoxicidad es el ensayo denominado “The Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE), conocido como ensayo cometa (Collins *et al.*, 1995), utilizado para detectar el daño que se produce en el ADN. Esta técnica se basa en la visualización microscópica de las imágenes del ácido desoxirribonucleico después de que las células son embebidas en agarosa, lisadas y sometidas a una electroforesis alcalina (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016). Un ejemplo de este procedimiento es el realizado por Gaete *et al.* (2014), en las especies *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis* donde midieron efectos de genotoxicidad de las aguas de los ríos Aconcagua y Maipo y del estero Catapilco (Chile), los metales medidos fueron Cu, Zn, Pb.

Otro de los procedimientos más aceptados en la literatura es la evaluación de la inducción de micronúcleos (ensayo de micronúcleos). Descrito inicialmente por Schmid (1975), es utilizado en la actualidad como un método simple y alternativo, para evaluar daños a nivel cromosómico. Se considera la prueba de micronúcleos como la técnica más adecuada para evaluar efectos genotóxicos de una amplia gama de compuestos en peces (Rodríguez-Cea *et al.*, 2003). Los micronúcleos inducidos (MNI) son pequeñas masas de cromatina separadas del núcleo celular y que se encuentran en el citoplasma, por lo tanto, se genera una ruptura cromosómica o mitótica (Schmid, 1975). La prueba de micronúcleos se puede llevar a cabo en cualquier tejido activo en proliferación. En peces, se han utilizado principalmente las células sanguíneas, branquiales, hepáticas, renales y de las aletas (Al-Sabti y Metcalfe 1995; Cavas *et al.* 2005; Udroui 2006; Cavas, 2008; Ahmed *et al.*, 2011). En otros metales, Cavas *et al.*, (2005) evaluó la inducción de MNI en la sangre de tres peces distintos, expuestos a concentraciones de 0,01 y 0,21 mg/L de Cu después de 21 días de exposición, encontrando un efecto no significativo en carpa prusiana (*Carassius gibelio*), una inducción de MNI en carpa común (*Cyprinus carpio*) y una mortalidad total en *Corydoras paleatus*. Canalejo *et al.*, (2016) observó un aumento en la frecuencia de MNI, en *Dicentrarchus labrax* expuestos a concentraciones de 0,01; 0,1; 1, y 10 mg/L de Pb durante 24 y 96 horas, incrementándose cada vez más la presencia de micronúcleos con dosis más altas de plomo. Por otro lado, Cavas (2008) encontró que los tratamientos con acetato de plomo a dosis de 0,01 a 0,1 mg/L durante 2 a 6 días indujo significativamente la formación de MNI en eritrocitos, branquias y células de aletas de *Carassius auratus* (L). En el caso del As, las frecuencias de MNI aumentan gradualmente a mayores concentraciones de este metal (Canalejo *et al.*, 2016). Yadav y Trivedi (2009) observaron una dependencia gradual entre el tiempo de exposición y el aumento de la frecuencia de MNI en la sangre inducida por As_2O_3 (6,94 mg/L) durante 24 a 168 horas de exposición en *Channa punctata*.

Los resultados obtenidos en este estudio indican una tendencia a incrementar el número de micronúcleos asociada al aumento en la concentración de cadmio en el agua, con una dosis-dependencia significativa, ya que los niveles de MNI contabilizados desde el nivel de exposición de 0,01 mg/L de $CdCl_2$ resultaron estadísticamente diferentes del grupo control. Zhu *et al.*, (2004) mostró que a concentraciones de 0,01 y 1 mg/L después de 48 o 96 horas de exposición a Cr y Cd en carpa (*Cyprinus carpio*), indicaron una dosis dependencia en la frecuencia de micronúcleos, diferente a lo que vieron con el Cu que no mostro ningún efecto significativo en la frecuencia de micronúcleos a las dos concentraciones antes



mencionadas. Del mismo modo, Sánchez-Galán *et al.* (1999) encontraron que en la trucha marrón (*Salmo trutta*) inyectadas intraperitonealmente (1,7 mg/kg de peso corporal) con cadmio y mercurio se generó un aumento de MNi en eritrocitos renales después de 24 horas de tratamiento, a diferencia del cobre que no generó aumento en los MNi. También se observaron resultados similares en la anguila (*Anguilla anguilla*, L.) (Sánchez-Galán *et al.*, 2001; Gravato *et al.*, 2006). En India, Parveen y Shadab (2012) vieron que en la especie *Channa punctatus*, en los individuos expuestos a distintas concentraciones de cloruro de cadmio (0,5, 1,0, 2,0 y 5,0 ppm) durante 72 horas, se generó un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos de la sangre de la aleta caudal, además de varias anomalías cromosómicas. Estos estudios muestran claros indicios de la existencia de una relación directa entre la exposición a cadmio y el aumento en la frecuencia de MNi en los eritrocitos de los peces.

El cadmio afecta negativamente a varios órganos, principalmente a los riñones, pulmones, huesos, placenta, cerebro y el sistema nervioso central (Castro-González y Méndez-Armenta, 2008). Varios estudios han demostrado que el cadmio se acumula preferentemente en los órganos internos como el hígado y riñón, y no tanto en músculo, donde se han encontrado concentraciones menores en otros estudios (Castro-González y Méndez-Armenta, 2008; Storelli *et al.*, 2005). Por ello, es por lo que en este estudio se decidió evaluar histológicamente las branquias y el hígado.

Las branquias son los órganos encargados de la respiración de los peces, ingresando O₂ y eliminando CO₂. Las branquias de los peces están compuestas por cuatro arcos branquiales (óseos), dos hileras de filamentos branquiales y éstas a su vez están compuestas por las laminillas o lamelas donde tiene lugar el intercambio de gases. Además, las branquias están compuestas de tres diferentes tipos de células: células de moco o neuroepiteliales, células del pavimento (PVCs) o células epiteliales y células ricas en mitocondrias (MRCs.). En este estudio se pudo observar acumulación de cadmio en células epiteliales periféricas de las branquias y, además, se observó hiperplasia lamelar. El hígado es el segundo órgano a estudiar y la importancia de su estudio radica en su posición fisiológica clave y su capacidad de detoxificación. Los hepatocitos son las células primarias del hígado, constituyen el 75% del peso del hígado y son los encargados de la secreción de la bilis (Gartner y Hiatt, 2002). En los peces teleósteos (esqueleto óseo) como nuestra especie estudiada, *Carassius auratus* (L.), el hígado se encarga del procesamiento de proteínas, lípidos, vitaminas y carbohidratos, además de ser el encargado de la detoxificación y la síntesis de diferentes proteínas. En peces, el hígado es un órgano esencial de acumulación de metales. Los metales se acumulan principalmente en los lisosomas de los hepatocitos. En nuestro estudio se pudo observar acumulación de cadmio en los hepatocitos del hígado.

Las muestras obtenidas para los análisis histológicos fueron teñidas con dos tinciones diferentes. Se utilizó Hematoxilina-Eosina para ver la estructura de los tejidos, debido a que la hematoxilina es un colorante básico y por ello tiene afinidad por estructuras ácidas como el núcleo celular. Sin embargo, la eosina es el inverso a la hematoxilina, siendo un colorante ácido que tiene afinidad por estructuras básicas como el citoplasma celular. Esto nos permite identificar con claridad el armazón tisular de hígado y branquias. En el caso del hígado de los peces control, se observa claramente hepatocitos, arteriolas y vénulas, mientras que en el caso de las branquias se pueden observar las estructuras branquiales (arco, láminas y laminillas).

Con la finalidad de poder observar a nivel histológico si existía una acumulación de cadmio en los tejidos, se realizó una segunda tinción con Ditizona, esta técnica fue desarrollada por Seregin e Ivanov



(2001), basada en la capacidad de la Ditzona para producir un compuesto de color rojizo después de reaccionar con cadmio o cualquier otro metal a estudio, presente en las células o tejidos. Nuestros resultados muestran que existe una marcada diferencia entre los peces control y los peces expuestos a los tres tratamientos con cadmio. Desde el tratamiento 1 (0,01 mg/L de CdCl_2) se pudo observar células teñidas de un color marrón indicando que existía acumulación de cadmio, estas tinciones fueron en ambos tejidos estudiados y tanto branquias como el hígado se vieron afectados. Si comparamos nuestro estudio con el realizado por Costa y Costa (2008) en la especie *Sparus aurata* (L.), un estudio de corta duración (48 h) en el que a los peces se les inyectaron intraperitonealmente dosis individuales de Cd (100-250 $\mu\text{gCd/L}$), aquí el cadmio generó una degradación histológica del tejido hepático y una inducción de las metalotioneínas (MTs), fuertemente correlacionada con las dosis de cadmio inyectadas, pero no con la bioacumulación o el tiempo de supervivencia. En este estudio, la inyección con cadmio genera muerte de la mayoría de los peces y una degradación histológica mucho más rápida. En nuestro bioensayo no se generó muerte de ninguno de los peces estudiados debido a que el experimento se realizó a concentraciones más bajas de cloruro de cadmio, ya que era importante para nosotros ver desde qué nivel mínimo de concentración de este metal encontraríamos alguna alteración. Costa y Costa (2008) mencionan que la relación entre la dosis de cadmio, el cadmio hepático bioacumulado y la MTs hepáticas indica la existencia de un umbral de absorción de cadmio, tras el cual los animales ya no son capaces de regular o bioacumular este metal, no dependiendo del tiempo de supervivencia sino de la dosis del metal.

Existen evidencias de bioacumulación de cadmio en organismos de aguas continentales. Así, por ejemplo, los altos niveles de cadmio en especies marinas están asociados con una dieta donde predominan los moluscos (Storelli y Marcotrigiano, 2004), pero las evidencias para una biomagnificación en la cadena trófica son aún inconsistentes (Castro-González y Méndez-Armenta, 2008; Falcó *et al.*, 2006; Roméo *et al.*, 1999; Storelli y Marcotrigiano, 2004). Los resultados sugieren que la diferencia interespecífica del contenido de cadmio puede ser atribuida a la conducta alimentaria y a factores intrínsecos como las tasas de los procesos fisiológicos e ingesta (Storelli y Marcotrigiano, 2004; Storelli *et al.*, 2005). Distintos estudios han considerado que el Cd puede provocar daños a nivel molecular en los organismos marinos en bajas concentraciones, conllevando alteraciones en el transporte a través de las membranas biológicas (Dailianis y Kaloyianni, 2004), en la actividad enzimática (Canesi *et al.*, 1998; Nusetti *et al.*, 2010), en la producción energética (Sokolova, 2004), y en daños oxidativos (Prakash y Jagannatha-Roa, 1995; Rajkumar *et al.*, 2011).

En nuestro estudio hemos observado que la acumulación del Cd empieza a detectarse levemente desde concentraciones muy bajas del metal (0,01 mg/L), aunque la tinción con Ditzona es mucho más fuerte a dosis de 1 mg/L de Cd. Hirt y Domitrovic (2002) evaluaron la toxicidad del cloruro de cadmio en la especie *Cichlasoma dimerus* en tratamientos similares a los nuestros con ensayos agudos durante 96 h y con otros ensayos a largo plazo (28 días), y encontraron efectos histopatológicos (congestión laminar, hemorragia, hiperplasia epitelial, hipertrofia epitelial, fusión laminar de branquias). Con relación al nivel de toxicidad, se determinó que el cadmio pertenece al grupo Grupo 2 (tóxico) con una CL50 entre 1 y 100 mg/L, y su toxicidad en relación con otros metales pesados fue $\text{Cd-Zn-Pb-Cr} < \text{Al} < \text{Cu-Hg}$ (Hirt y Domitrovic, 2002). Es importante contrastar nuestro trabajo con el realizado por los autores antes mencionados porque al trabajar con menores concentraciones a tiempos más largos de



exposición podemos demostrar que la presencia del cadmio, y por tanto su toxicidad tisular, puede empezar a ser representativa desde concentraciones muy bajas.

En nuestro estudio, los peces expuestos a cadmio durante 96 h. también mostraron una acumulación de este elemento en las branquias, dependiente de la dosis utilizada como nos muestran las observaciones histológicas con la tinción de Ditizona. El cadmio ha sido descrito como uno de los metales pesados más tóxicos a través de su acción sobre estos órganos. Así, se ha observado que produce generalmente asfixia en los peces debido a que los precipitados o coagulados de mucoproteínas, producidos como defensa, se depositan sobre el epitelio branquial. Esto produce un bloqueo del intercambio de gases, de la excreción de productos de desecho y de la osmorregulación (Tafanelli y Summerfelt, 1975). Algunos de estos efectos, como la pérdida de equilibrio, fueron observados en ejemplares de *Brachydanio rerio* que fueron expuestos a cloruro de cadmio en ensayos agudos y subagudos (Karlsson-Norrgrén *et al.*, 1985). El cadmio afecta la morfología del epitelio de las branquias produciendo patologías a nivel celular que influyen en los sistemas de regulación iónica (Evans, 1987). Alteraciones similares a las antes mencionadas son descritas por Andreozzi *et al.* (1994) también en *Carassius auratus* (L), la misma especie utilizada en nuestro estudio, aunque expuestos a concentraciones mucho mayores de cloruro de cadmio (20 mg/L) que las estudiadas por nosotros. A estas dosis, las alteraciones vasculares más frecuentes fueron hemorragia y congestión tanto a nivel branquial como hepático, demostrándose así que los dos órganos elegidos para nuestro estudio (hígado y branquias) son muy sensibles a los efectos tóxicos de los metales, y en especial al cadmio y, por tanto, son una herramienta tisular y orgánica muy adecuada para observar cualquier efecto deletéreo a dosis bajas o muy bajas, como las empleadas en nuestro estudio, para el análisis y selección de los mejores biomarcadores de alerta temprana.

Distintos estudios han considerado que el cadmio puede provocar daños a nivel molecular en los organismos marinos en bajas concentraciones, conllevando a alteraciones en el transporte a través de las membranas biológicas (Dailianis y Kaloyianni, 2004), actividad enzimática (Canesi *et al.*, 1998; Nusetti *et al.*, 2010), producción energética (Sokolova, 2004) y daños oxidativos (Prakash y Jagannatha-Roa, 1995; Rajkumar *et al.*, 2011).

El oxígeno es esencial para el desarrollo de las actividades metabólicas en los organismos aerobios. El oxígeno trabaja como un aceptor de electrones durante la respiración celular, pero también es el principal responsable del incremento en la formación de EROs. En células normales, las EROs son detoxificadas por las defensas antioxidantes, de esta forma se genera un balance entre la producción de prooxidantes y el sistema antioxidante de defensa. Sin embargo, cuando hay una marcada producción de EROs, el sistema antioxidante de defensa se puede alterar o resultar insuficiente y esto lleva a un incremento en el daño en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando diversos procesos celulares (Van der Oost *et al.*, 2003). Las EROs pueden generar peroxidación lipídica, daños en las membranas celulares, ruptura del ADN (daño genotóxico) y alteraciones en la estructura y funciones de las proteínas y otras biomoléculas (Pérez y Pérez 2000). Por ello, el estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de EROs y la capacidad de su eliminación por parte de las defensas antioxidantes, generando un daño oxidativo que lleva a una gran cantidad de cambios bioquímicos y fisiológicos, los cuales pueden desencadenar un deterioro y muerte celular (Sies, 1997). En el caso concreto de los peces tienen un buen desarrollo de las defensas antioxidantes. Estas pueden ser de tipo enzimático,



entre ellas están la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), y pueden ser no enzimáticas como el glutatión (El-Gazzar *et al.*, 2014) y la melatonina (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* muestran que el cadmio participa en la generación de EROs y en sus derivados (Drağ-Kozak *et al.*, 2019). Los efectos del cadmio administrado en altas concentraciones han sido atribuidos a un aumento excesivo de EROs en las células, y que conducen a estrés oxidativo. La acumulación de EROs en respuesta a la exposición al cadmio puede ocurrir debido a la inhibición de antioxidantes y enzimas antioxidantes, y/o mediante un efecto del metal en la generación EROs (McRae *et al.*, 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que el cadmio tiene una fuerte afinidad por el sitio activo de la enzima superóxido dismutasa en el hígado del pez cebra (Wang *et al.*, 2015), y también se conoce que la exposición al cadmio puede alterar la estructura proteica de la catalasa (Wang *et al.*, 2015). Es por esto que uno de nuestros objetivos es el de evaluar el efecto del cadmio en la inducción de estrés oxidativo, mediante la cuantificación de daño oxidativo a través de la medida de la peroxidación lipídica y de la respuesta antioxidante, determinada por las actividades de la catalasa (CAT) y la superóxido-dismutasa (SOD).

La evaluación de la peroxidación lipídica, que resulta del daño oxidativo ocasionado a lípidos saturados e insaturados de las bicapas lipídicas, ha sido ampliamente utilizada como un marcador de daño oxidativo en peces inducido por contaminantes metálicos (Roberts y Oris, 2004; Ahmad *et al.*, 2006a; 2006b; Gioda *et al.*, 2007). En este caso, los niveles de hidroperóxidos constituyen un marcador del daño oxidativo muy utilizado en los peces. Los hidroperóxidos son los productos primarios de la oxidación y se forman a partir de los ácidos grasos insaturados. Alteran las membranas celulares y son altamente tóxicos, llegando a provocar problemas en las funciones o en la vida de las células. Los resultados obtenidos durante nuestro estudio demostraron que la exposición a concentraciones de 1 mg/L de cadmio provocó un incremento en los niveles de hidroperóxidos tanto en las branquias como en el hígado, confirmando que con esos niveles de cadmio se produjo una situación de estrés oxidativo y en consecuencia daño en las membranas celulares.

Nuestros datos acerca de un incremento en los niveles de hidroperóxidos coinciden con Oliva *et al.* (2012), quienes relacionan altos niveles de peroxidación en hígado de *Solea senegalensis* con la presencia de altos niveles de As y Cd en dicho órgano. En otro estudio realizado con *Carassius auratus* (L), pero con otro metal, en este caso el manganeso (Mn), se observó que tratamientos a largo plazo (96 h.) incrementaron los niveles de hidroperóxidos en todos los órganos estudiados (branquias, riñón, hígado y cerebro) (Vieira *et al.*, 2012). También hay estudios de peces tratados con Zn donde se observa una inducción de los niveles de TBAR (marcador de peroxidación lipídica) en hígado, cerebro y riñón, pero no así por el Cu que incluso los reduce en el hígado (Gioda *et al.*, 2007). Indudablemente, esto podría indicar que metales pesados, como el Cd, Pb, Mn, As, y Zn, generan daños oxidativos en peces.

Como mencionamos anteriormente, entre los principales mecanismos para eliminar las EROs de las células animales se encuentran las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La superóxido dismutasa constituye la primera línea defensiva frente al radical superóxido (O_2^-), provocando su dismutación y dando lugar a la formación de agua oxigenada (H_2O_2). El O_2^- se genera principalmente en reacciones de autooxidación y tienen lugar durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que en ambos órganos, branquias e hígado, se generó una estimulación de la actividad SOD a concentracio-



nes de 1 mg/L de CdCl_2 , generándose un incremento del 67% en las branquias y un 98% en el hígado *versus* el grupo control. Si comparamos esto con lo realizado por Vieira *et al.* (2012), pero con Mn, nuestros resultados se asemejan a los de ellos puesto que la actividad SOD resultó sensiblemente estimulada (por encima del 200% vs. los controles) en el hígado y en branquias, no así en cerebro donde la actividad SOD se encontró inhibida en un 75% vs. el grupo control.

Hay estudios que han demostrado que, bajo condiciones de estrés oxidativo, la SOD puede presentar comportamientos diferentes. Inicialmente o cuando el estrés es moderado, la SOD puede ser estimulada. Sin embargo, cuando la situación de estrés oxidativo se alarga durante un período de tiempo y persiste, la SOD puede llegar a alcanzar sus niveles de saturación y tender a estabilizarse, o incluso a disminuir su actividad (Berrahal *et al.*, 2007; Ates *et al.*, 2008). Una disminución en la actividad SOD se ha visto en el hígado después de la administración de cadmio también para las especies *Rhamdia quelen* (Pretto *et al.*, 2011) y *Oreochromis niloticus* (Saglam *et al.*, 2014). En otro estudio, con peces *Oreochromis niloticus* (Tilapia) expuestos a Pb administrado en la dieta también mostraron una inhibición dosis-dependiente de la actividad SOD de riñón (Dai *et al.*, 2012).

La catalasa es otra enzima que presenta un papel relevante en la defensa antioxidante (Di-Giulio *et al.*, 1993). Se encarga de catalizar la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). La actividad catalasa puede localizarse en prácticamente todas las partes de la célula, aunque es mucho más abundante en los peroxisomas y las mitocondrias (Halliwell *et al.*, 1995). En nuestro estudio se pudo observar un aumento respecto al control en la actividad enzimática de la catalasa en todas las concentraciones ensayadas, desde la menor concentración de 0,01 mg/L de cadmio en branquias. Viendo un aumento del 89% de la actividad de la catalasa a la concentración de 1 mg/L de cadmio. Por su parte, en el hígado se presentó un aumento significativo de la actividad de la catalasa a la mayor concentración estudiada de 1 mg/L. Dicho aumento fue de 68% de la actividad de CAT sobre el control. En otro estudio, realizado con *Carassius auratus* (L.) tratados con 0.1 y 1 mg/L de Mn durante 96 h., se obtuvo un incremento de la actividad CAT solamente en las branquias; mientras que fue inhibida en el hígado y el riñón, y no se afectó en el cerebro (Vieira *et al.*, 2012). En el estudio realizado por Arantes *et al.* (2016) donde se expusieron a los peces a diferentes metales (Ag, Cd, Cr, Cu y Zn), se observó que el Cd y el Cr inhibieron o no tuvieron efecto sobre la actividad CAT en riñón, branquias y cerebro, pero la estimularon en el hígado; la Ag inhibió la CAT en el hígado, riñón y cerebro, pero la estimuló en las branquias. El Zn tuvo un efecto estimulador en hígado y cerebro, pero ninguno en riñón o branquias; y el Cu inhibió la CAT en el riñón, pero la estimuló en los otros órganos.

Como mencionamos anteriormente, las branquias podrían ser consideradas como el órgano de los peces más sensible a los contaminantes, ya que como hemos visto alcanzan los niveles más altos de producción de hidroperóxidos lipídicos (un buen marcador de daño oxidativo real). Esto puede estar vinculado al mayor contacto de este órgano con los metales presentes en el agua, en nuestro caso el cadmio. Y el hígado al ser el órgano encargado a la detoxificación de toxinas, es al igual que las branquias altamente afectado por los contaminantes o los agentes tóxicos. Nuestro estudio, indica que existe una relación directa entre la exposición al cadmio en peces y la inducción de daño genotóxico evaluado con los ensayos de micronúcleos y el estrés oxidativo medido por el aumento de la peroxidación lipídica y la respuesta antioxidante de la superóxido dismutasa y la catalasa. No obstante,



nuestros resultados indican que, si bien, se ha generado una respuesta antioxidante, ésta no ha sido suficiente para evitar la generación de estrés oxidativo medido por la cantidad de hidroperóxidos, en ambos órganos. Además, se pudo observar una acumulación de cadmio en branquias e hígado junto con un aumento en la cantidad de micronúcleos observados en eritrocitos de *Carassius auratus* (L). La evaluación de los parámetros analizados en este estudio, pueden considerarse como buenos biomarcadores para la monitorización ambiental de los ecosistemas acuáticos.

La presencia de metales pesados en los ecosistemas constituye un serio problema debido a su elevada persistencia medioambiental y su alta toxicidad para los organismos vivos; ejemplo de ello son el cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) (Kolf-Clauw *et al.*, 2007). Por este motivo, es muy importante mantener un equilibrio en los sistemas acuáticos, evitar la contaminación desmedida, y una continua supervisión de los desechos asociados a las industrias y la minería. Son factores principales a tener en cuenta en el momento de generarse una inestabilidad en los ecosistemas y, por lo tanto, daño en los organismos que allí viven y se relacionan.

[6]

Conclusiones

Tras la exposición a corto plazo, durante 96 horas, de ejemplares de *Carassius auratus* (L) a diferentes concentraciones de cadmio (0,01; 0,1 y 1 mg/L) en condiciones controladas de laboratorio se observó:

- 1) **La bioacumulación de Cd**, inducida por las tres concentraciones de cadmio evaluadas, en las células de los dos tejidos estudiados: branquias e hígado.
- 2) **La inducción de daño oxidativo (peroxidación lipídica)**, evaluado mediante la cuantificación de los niveles de hidroperóxidos, en branquias e hígado por la concentración de cadmio más alta (1 mg/L).
- 3) **La inducción de una respuesta antioxidante**, puesta de manifiesto por un incremento de las actividades enzimáticas SOD y CAT, tanto en branquias como en hígado. No obstante, ello no fue suficiente para evitar el desarrollo del daño oxidativo.
- 4) **La inducción de daño genotóxico**, evaluado mediante el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, por las distintas concentraciones de cadmio ensayadas.
- 5) **Los parámetros bioquímicos y citogenéticos** evaluados en peces en este trabajo pueden ser utilizados como biomarcadores tempranos apropiados para la monitorización ambiental de la contaminación por cadmio en el medio acuático.



[7]

Bibliografía

- | Abalaka, S.E. (2015). "Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in *Auchenoglanis occidentalis* fish from Tiga dam, Nigeria". J. Environ. Health Sci. Eng., 13: 67-74
- | Aebi, H. (1983). "Catalase". En: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 273-286.
- | Agency For Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR) (2012). "Public Health Statement for Cadmium". CAS # 7440-43-9
- | Ahmad, I.; Maria, V.; Oliveira, M.; Pacheco, M.; Santos, M. (2006-a). "Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone". Mutat. Res., 608: 16-28.
- | Ahmad, I., Pacheco, M.; Santos, M. (2006-b). "*Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of fresh water wetland ecosystem (Pateirade Fermentelos, Portugal)". Chemosphere, 65: 952-962.
- | Ahmed, K.; Al-Mamun, H.; Hossain, M.A.; Arif, M.; Parvin, E.; Akter, M.S.; Khan, M.S.; Islam, M. (2011). "Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test". Chemosphere, 84 (1): 143-149.
- | Al-Asgah, A.N.; Abdel-Warith, A.W.; Younis, E-SM.; Allam, H.Y. (2015). "Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride". Saudi J. Biol. Sci., 22: 543-550.
- | Allen, P. (1993). "Accumulation profiles of cadmium and their modification by interaction with lead and mercury in the edible tissues of *Oreochromis aureus*". Fresenius Envir. Bull., 2: 745-751.
- | Almazan, G.; Liu, H.N.; Khorchid, A.; Sundarajan, S.; Martinez- Bermudez, A.K.; Chemtob, S. (2000) "Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels and cell death". Free Radic. Biol. Med., 29: 858-869.
- | Al-Sabti, K.; Metcalfe, C.D. (1995). "Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water". Mutat. Res., 343: 121-135.
- | Ameer, W.; El Megdiche, Y.; De Lapuente, J.; Barhoumi, B.; Trabelsi, S.; Ennaceur, S.; Camps, L.; Serret, J.; Ramos-López, D.; Gonzalez-Linares, J.; Touil, S.; Driss, M.R.; Borràs, M. (2015). "Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants". A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. Chemosphere, 135: 67-74.
- | Andreozzi, G.; Antonucci, R.; Affatato, C.; Gargiulo, G.; Battaglini, P. (1994). "Influence du cadmium sur l'Intestin de *Carassius auratus*". Anat. Histol. Embryol., 23: 102-111.
- | Anton, A.; Lizaso J. (2001). "Los metales pesados en la alimentación". Ed. Fundación Ibérica para la seguridad alimentaria. Madrid. España.
- | Arantes, F.P.; Savassi, L.A.; Santos, H.B.; Gomes, M.V.T.; Bazzoli, N. (2016). "Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil". Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88 (1): 137-147.
- | Arellano, J.; Storch, V.; Sarasquete, C. (1999). "Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*". Ecotoxicol. Environ. Saf., 44 (1): 62-72.



- | Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardo, F.V.; Lloret, A.; Lehner, M.; Garcia-de-la Asuncion, J.; Viña, J. (1999). "Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage". *Methods in Enzymology*, Academic Press, 299: 267-276.
- | Ates, B.; Orun, I.; Talas, Z.S.; Durmaz, G.; Yilmaz, I. (2008). "Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺ and Cu²⁺". *Fish Physiol. Biochem.*, 34: 53-59.
- | Bakare, A.A.; Alabi, O.A.; Gbadebo, A.M. Ogunsuyi, O.I.; Alimba, Ch.G. (2013). "In Vivo Cytogenotoxicity and Oxidative Stress Induced by Electronic Waste Leachate and Contaminated Well Water". *Challenges*, 4: 169-187.
- | Bancroft, J.D.; Stevens, A.; Turner, D.R. (1990). "Theory and Practice of Histological Techniques". Churchill Livingstone, Edinburgh.
- | Berrahal, A.A.; Nehdi, A.; Hajjaji, N.; Gharbi N.; El-Fazâ S. (2007). "Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead". *Comptes Rendus Biol.*, 330: 581-588.
- | Beyer J. (1996). "Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies". Academic thesis, University of Bergen, Norway.
- | Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A.; Roy, S. (2007). "Arsenic-induced responses in freshwater teleosts". *Fish Physiol Biochem.*, 33 (4): 463-473.
- | Blasco, J., Arias, A.M., Saenz, V., 1999. Heavy metals in organisms of the river Guadalquivir estuary: possible incidence of the Aznalcollar disaster. *Sci. Tot. Environ.* 242, 249-259.
- | Bradl, H. (2005). "Heavy Metals in the environment". En: Chapter 1: Sources and origins of heavy metals. Ed. H.B. Bradl. University of Applied Sciences Trier. Neubrucke. Germany.
- | Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72 (1-2): 248-254.
- | Cabezudo, B.; Rivera, J. (1980). "Notas taxonómicas y corológicas sobre la Flora de Andalucía Occidental, 2: *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera sp. nov." *Lagascalía*, 9 (2): 223-226.
- | Canalejo, A.; Diaz-De-Alba, M.; Granado-Castro, M.D.; Córdoba, F.; Espada-Bellido, E.; Galindo-Riaño, M.D.; Torronteras, R. (2016). "Early genotoxic response and accumulation induced by waterborne copper, lead, and arsenic in European seabass, *Dicentrarchus labrax*". *Environ Sci Pollut.*, 23: 3256-3266
- | Canesi, L.; Ciacci, C.; Piccoli, G.; Stocchi, V.; Viarengo, A.; Gallo, G. (1998). "In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione". *Comp. Biochem. Physiol. C*, 120: 261-268.
- | Carranza, L.P. (2011). "Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de Indias" Trabajo de grado Magister en Toxicología. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina.
- | Castro-González, M.; Méndez-Armenta, M. (2008). "Metals: Implications associated to fish consumption". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26 (3): 263-271.
- | Cavas, T.; Garanko, N.; Arkhipchuk, V. (2005). "Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate". *Food Chem. Toxicol.*, 43 (4): 569-574.
- | Cavas, T. (2008) "In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells". *Food Chem. Toxicol.*, 46: 352-358.



- | Cerqueira, C.C.C.; Fernandes, M.N. (2002). "Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52 (2), 83-91.
- | Collins, A. R.; Ma, A.G.; Duthie, S.J. (1995). "The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells". *Mutat. Res.*, 336: 69-77.
- | Costa, P.; Costa, M. (2008). "Biochemical and histopathological endpoints of in vivo cadmium toxicity in *Sparus aurata*". *Ciencias Marinas*, 34 (3): 349-361.
- | Craw, D.; Brown, K.; Webster-Brown, J. (2005). "Metals derived from gold mining and geothermal sources". In: Moore, T.A., Black, A., Centeno, J.A., Harding, J.S., Trumm, D.A. (Eds.), *Metal Contaminants in New Zealand*. Resolutionz Press, Christchurch, pp. 231-246.
- | Da Silva, A.O.F.; Martinez, C.B.R. (2014). "Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: enzymes activity and plasma ions". *Aquat. Toxicol.*, 156: 161-168.
- | Dai, W.; Liu, S.; Fu, L.; Du, H.; Xu, Z. (2012). "Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*)". *Aquaculture Research*, 43: 208-214.
- | Dailianis, S.; Kaloyianni, M. (2004). "Cadmium induce both pyruvate kinase and Na⁺/H⁺ exchanger activity through protein kinase C mediated signal transduction, in isolated digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* (L)". *J. Exp. Biol.*, 207: 1665-1674.
- | Dally, H.; Hartwig, A. (1997) "Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells". *Carcinogenesis*, 18: 1021-1026.
- | De Zwart, D. (1995). *Monitoring Water Quality in the Future, Biomonitoring*. Vol. 3. Bilthoven, The Netherlands
- | Di-Giulio, R.T.; Habig, C.; Gallagher, E.P. (1993). "Effects of black rock harbour sediments on indices of bio-transformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish". *Aquatic Toxicology*, 26: 1-22.
- | Domitrovic, H.A. (1997). "El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: Evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870)". VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Argentina.
- | Domitrovic, H. A.; Bechara, J.A.; Flores Quintana, C.; Roux, J.P.; Gavilán, G. (2000). "A survey study of gas supersaturation and fish gas bubble disease in the Paraná River below Yacyretá Dam, Argentina". *Rev. Ictiol.*, 8 (1/2): 29-40
- | Drag-Kozak, E.; Pawlica-Gosiewska, D.; Gawlik, K.; Socha, M.; Gosiewski, G.; Łuszczek-Trojnar, E.; Solnica, B.; Popek, W. (2019). "Cadmium-induced oxidative stress in Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch) hepatopancreas: ameliorating effect of melatonin". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26: 12264-12279.
- | Eisler, R.; Zarogian, G.; Kennekey, R. (1972). "Cadmium uptake by organism". *J. Fish Res. Bd. Can.*, 29: 1367-1369.
- | El-Gazzar, A.M.; Astry, K.E.; El-Sayed, Y.S. (2014). "Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus* L., exposed to sublethal doses of cadmium". *Alex. J. Vet. Sci.*, 40: 29-43.
- | Evans, D. (1987). "The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants". *Environ. Health Perspect.*, 71: 47-58.
- | Evans, P. (1995). "Free radicals in brain metabolism and pathology". *Br. Med. Bull.*, 49: 577-587.
- | Obiakor, M.O.; Okonkwo, J.C.; Ezeonyejaku, C. (2014). "Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes". *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 775-776: 20-30.
- | Falcó, G.; Llobet, J.; Bocio, A.; Domingo, J. (2006). "Daily Intake of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead by Consumption of Edible Marine Species". *J. Agric. Food Chem.*, 54: 6106-6112.



- | Ferrer, A. (2003). "Intoxicación por metales". An. Sist. San. Navarra., 26: 141-153.
- | Figueroa, L. (1998). "Acumulación y depuración de cobre y cadmio en *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1952), (Pises: Cichlidae). Efectos subletales sobre el crecimiento en función de ARN/ADN". Trabajo Especial de Grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 37p.
- | Gaete, H.; Guerra, R.; Carvajal, D.; Vásquez, M.; Valladares, M.; Lobos, G. (2014). "Evaluación de la genotoxicidad de las aguas costeras de Chile central sobre los peces *Mugil cephalus* y *Odontesthes brevianalis*". Hidrobiológica 24 (3): 271-279.
- | Gaete, A.H.; Álvarez, A.M.; Lobos, G.; Soto, C.E.; Jara-Gutiérrez, C. (2017). "Assessment of oxidative stress and bioaccumulation of the metals Cu, Fe, Zn, Pb, Cd in the polychaete *Perinereis gualpensis* from estuaries of central Chile". Ecotoxicol. Environ. Saf., 145: 653-658.
- | Galán E.; Romero A. (2008). "Contaminación de suelos por metales pesados". Rev. Soc. Española Mineralog., MACLA, nº 10.
- | Galvez, F.; Wong, D.; Wood, C.M. (2006). "Cadmium and calcium uptake in isolated mitochondria- rich cell populations from the gills of the freshwater rainbow trout". Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 291: 170-176.
- | Gartner, L.; Hiatt, J. (2002). "Texto Atlas de Histología". McGraw-Hill. México.
- | Gay, C.; Gebicki, J. (2000). "A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric- xylenol orange hydroperoxide assay". Anal. Biochem., 284: 217-220.
- | Giari, L.; Manera, M.; Simon, E.; Dezfuli, B.S. (2007). "Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium". Chemosphere, 67: 1171-1181.
- | Gioda, C.; Lissner, L.; Pretto, A.; Da Rocha, J.; Schetinger, M.; Neto, J.; Morsch, V.; Loro, V. (2007). "Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*". Chemosphere, 69: 170-175.
- | González de Canales, M.L.; Jiménez-Tenorio, N.; Ortiz Delgado, J.B.; Blasco, J.; Arias García, A.M.; Del Valls, A.; Gómez Parra, A. (2001). "Histopathological effects in marine animals from the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill". In: SETAC Europe 11th Annual Meeting, Madrid, Spain, 6-10 May 2001.
- | Gramlich, A.; Tandy, S.; Gauggel, C.; López, M.; Perla, D.; González, V.; Schulin R. (2018). "Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras". Sci. Tot. Environ., 612: 370-378.
- | Gravato, C.; Teles, M.; Oliveira, M.; Santos, M.A. (2006). "Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L-the influence of pre-exposure to beta-naphthoflavone". Chemosphere, 65: 1821-1830.
- | Gutiérrez-Reyes, E.Y.; Albores, A.; Ríos, C. (1998) "Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein". Toxicology, 131: 145-154.
- | Halliwell, B. (1995). "Antioxidant characterization: Methodology and mechanism". Biochem. Pharmacol., 49 (10): 1341-1348.
- | Hirt, M.; Domitrovic, H.A. (2002). "Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a cloruro de cadmio en ensayos agudos y subletales". Rev. Ictiol., 10 (1/2): 17-32.
- | Huerta Jiménez, M.; Ortega Cerrilla, M. E.; Cobos Peralta, M.; Herrera Haro, J.G.; Díaz-Cruz, A.; Guinzberg Perrusquía, R. (2005). "Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos". Interciencia, 30 (12): 728-734.
- | Hwang, P.P.; Lee, T.H.; Lin, L.Y. (2011). "Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms: Am". J. Physiol.- Reg. Integr. Comp. Physiol., 301: 28-47.



- | I.A.R.C. (International Agency for Research on Cancer) (1993) “*Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry*”. En: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58. IARC Scientific Publications, Lyon. 119-237.
- | Javed, M.; Ahmad, M.; Usmani, N.; Ahmad, M. (2017). “*Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in Channa punctatus exposed to heavy metal loaded waste water*”. Sci. Rep. 10, 7 (1): 1675-1685.
- | Jiménez, M.H.; Cerrilla, M.E.O.; Perahta, M.C.; Haro, J.G.H.; Cruz, A.D.; Perrusquia, R.G. (2005). “*Estrés, oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos*”. Interciencia, Caracas, Venezuela, 30 (12): 728-734.
- | Jomova, K.; Valko, M. (2011). “*Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*”. Toxicology, 283 (2-3): 65-87.
- | Karlsson-Norrgrén, L.; Runn, P.; Haux, C.; Förlin, L. (1985). “*Cadmium- induced changes in gill morphology of zebrafish, Brachyderio rerio (Hamilton- Buchanan), and rainbow trout, Salmo gairdneri*”. Richardson. J. Fish. Biol., 27: 81-95.
- | Kelly, K.A.; Havrilla, C.M.; Brady, T.C.; Abramo, K.H.; Levin, E.D. (1998). “*Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model system*”. Environ. Health Perspect., 106 (7): 375-384.
- | Koizumi, T.; Shirakura, H.; Kumagai, H.; Tatsumoto, H.; Suzuki, K.T. (1996) “*Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: cadmium-induced active oxygen-related permeability changes of the plasma membrane*”. Toxicology, 114: 125-134.
- | Kolf-Clauw, M.; Guénin, A.; López, M.P. (2007). “*Micromamíferos y metales pesados: Biomonitorización del medio ambiente*”. Observatorio Medioambiental, 10: 19-37.
- | Lafuente, A.; González-Carracedo, A.; Romero, A.; Esquifino, A.I. (2003). “*Effect of cadmium on 24-h variations in hypothalamic dopamine and serotonin metabolism in adult male rats*”. Exp. Brain Res., 149: 200-206.
- | Lee, J.; Dutta, R.; Maharjan, Y.; Liu, Z.; Lim, J.; Kim, S.; Cho, D.; So, H.; Choe, S.; Park, R. (2018). “*Catalase inhibition induces pexophagy through ROS accumulation*”. Biochem. Biophys. Res. Communications, 501: 696-702.
- | Lionetto, M.G.; Maffia, M.; Cappello, M.S.; Giordano, M.E.; Storelli, C.; Schettino, T. (1998). “*Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺-K⁺-ATPase in eel, Anguilla anguilla, intestine and gills*”. Comp. Biochem. Physiol: Part A, 120: 89-91.
- | López, E.; Arce, C.; Oset-Gasque, M.; Canadas, S.; Gonzalez, M. (2006). “*Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture*”. Free Radic. Biol. Med. 40: 940-951.
- | Łuczynańska, J.; Paszczyk, B.; Łuczynański, M.J. (2018). “*Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer’s health*”. Ecotoxicol. Environ. Saf., 153: 60-67.
- | Luna, L.G. (1968). “*Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*”. McGraw-Hill. NewYork.
- | MacDonald, A.; Silk, L.; Schwartz, M.; Playle R. (2002). “*A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*”. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicol. Pharmacol., 133: 227-242.
- | Márquez-García, B.; Córdoba, F. (2010). “*Antioxidative system in wild populations of Erica andevalensis*”. Environ. Exp. Bot., 68 (1): 58-65.
- | Martínez, S. (2005). “*El cerdo joven como bioindicador de concentraciones bajas de genotóxicas, mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica*”. Trabajo de grado Doctor en Ciencias básicas. Colima, México: Universidad de Colima. Facultad de Medicina, 2005. p. 21.



- | Mazon, A.F.; Cerqueira, C.C.C; Fernandes, M.N. (2002). "Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*". Environ. Res., 88 (1): 52-63.
- | McCord, J.; Fridovich, L. (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for crythrocuprein (hemocuprein)". J. Biol. Chem., 244: 6049-6055.
- | McDowell, R.W. (2009). "Is cadmium loss in surface runoff significant for soil and surface water quality: a study of flood-irrigated pasture". Water Air Soil Pollut., 209: 133-142.
- | McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; Mcdonald, D.G.; Wood, C.M. (2000). "Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue- specific metal accumulation". Aquat. Toxicol., 50: 245-256.
- | McGeer, J.C.; Niyogi, S.; Smith, D.S. (2012). "Cadmium". En: Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Elsevier London, UK, pp. 125-184.
- | McRae, N.K.; Gaw, S.; Glover, C.N. (2016). "Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*". Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol., 179: 184-190.
- | McRae, N.K.; Gaw, S.; Glover, C.N. (2018) "Effects of waterborne cadmium on metabolic rate, oxidative stress, and ion regulation in the freshwater fish, inanga (*Galaxias maculatus*)". Aquat. Toxicol., 194: 1-9.
- | Mirończuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A.M.; Zujko, M.E. (2018). "Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body". Adv. Med. Sci., 63: 68-78.
- | Monteiro S.M.; Mancera J.M.; Fontainhas-Fernandes A.; Sousa M. (2005). "Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*". Comp. Biochem. Physiol. Part C., 141: 375-383.
- | Moiseenko, T.I.; Kudryavtseva, L.P. (2001). "Trace metal accumulation and fish pathologies in areas affected by mining and metallurgical enterprises in the Kola Region, Russia". Environ. Pollut., 114 (2): 285-297.
- | Murphy, V. (1997). "Cadmium: acute and chronic neurological disorders". En: Yasui M, Strong MJ, Ota K, et al, (eds) Mineral and metal: neurotoxicology. Boca Raton: CRC, 229-240.
- | Myers, M.S.; Stehr, C.M.; Olson, O.P.; Johnson, L.L.; McCain, B.B.; Chan, S.-L.; Varanasi, U. (1994). "Relationships between toxicopathich hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in Englishsole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coast, USA". Environ. Health Perspect., 102: 200-214.
- | Nair, A.R.; Degheselle, O.; Smeets, K.; Van Kerkhove, E.; Cuypers, A. (2013). "Cadmium induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)". Int. J. Mol. Sci., 14: 6116-6143.
- | Nunes, B.; Caldeira, C.; Pereira, J.L.; Goncalves, F.; Correia, A.T. (2015). "Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium". Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 22: 3756-3765.
- | Nusetti, O.; Tovar, M.; Zapata-Vívenes, E. (2010). "Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subject anoxic and aerobic conditions". J. Shellfish. Res., 29 (1): 203-208.
- | Oliva, M.; Garrido, M.C.; Pérez, E.; González de Canales, M.L. (2007) "Evaluation of acute copper toxicity during early life stages of gilthead seabream, *Sparus aurata*". J. Environ. Sci. Health, Part A, 42 (4): 525-533.
- | Oliva, M.; Garrido, M.C.; Sales Márquez, D.; González de Canales, M.L. (2009) "Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed to copper: a preliminary toxicity range-finding test". Exp. Toxicol. Pathol., 61(2): 113-121.



- | Oliva, M.; José Vicente, J.; Gravato, C.; Guilhermino, L.; Galindo-Riaño, M.D. (2012). "Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation". *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Jan., 75 (1): 151-162.
- | Ong, W.; He, X.; Chua, L.; Ong, C. (2006). "Increased uptake of divalent metals lead and cadmium into the brain after kainite-induced neuronal injury". *Exp. Brain Res.*, 173: 468-474.
- | Ortiz, J.B.; González de Canales, M.L.; Sarasquete, C. (2003). "Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes". *Sci. Mar.*, 67 (1): 53-61
- | Pandey, G.; Madhury, S. (2014). "Heavy metals causing toxicity in animals and fishes". *Res. J. An. Vet. Fish. Sci.*, 2: 17-23.
- | Parveen, N.; Shadab, G. (2012). "Cytogenetic evaluation of cadmium chloride on *Channa punctatus*". *J. Environ. Biol.*, 33 (3): 663-666.
- | Pereira, L.S.; Ribas, J.L.; Vicari, T.; Silva, S.B.; Stival, J.; Baldan, A.P.; Valdez Domingos, F.X.; Grassi, M.T.; Cestari, M.M.; Silva De Assis, H.C. (2016). "Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 130: 29-36.
- | Pérez, P.; Pérez, J. (2000) "Métodos para medir el daño oxidativo". *Rev. Cub. Med. Mil.*, 29 (3): 192-198.
- | Pohl, H.R.; Abadin, H.; Risher, J.F. (2006). "Neurotoxicity of Cadmium, Lead, and Mercury". En: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (eds) *Neurodegenerative diseases and metal ions*. Vol 1. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, England, pp 474.
- | Powers, D.A. (1989). "Fish as model systems". *Science*, 246: 352-358.
- | Prakash, M.T.; Jagannatha-Roa, K.S. (1995). "Modulations of antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalves *Perna viridis* during heavy metal exposure". *Mol. Cell. Biochem.*, 146 (2): 107-113.
- | Pretto, A.; Loro, V.L.; Baldisserotto, B.; Pavanato, M.A.; Mores, B.S.; Menezes, C.H.; Cattaneo, R.; Clasen, B.; Finamor, I.A.; Dressler, V. (2011). "Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 60: 309-318.
- | Rajkumar, J.; Milton, J.; Ambrose, T. (2011) "Toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to the juveniles of *perna viridis*". *Int. J. Chem. Sci.*, 9 (2): 553-556.
- | Ramírez, A. (2002). "Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos". *Anales de la Facultad de Medicina*, 63: 51-64.
- | Ramírez-Duarte, W.F.; Kurobe, T.; Teh, S.J. (2017). "Effects of low levels of ultraviolet radiation on antioxidant mechanisms of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)". *Chemosphere*, 181: 304-312.
- | Repetto, G.; Bejarano, A.; Jiménez, M. (2008). "La regulación de la protección frente al riesgo por agentes físicos". *Rev. Toxicol.*, 25.
- | Roberts, A.P.; Oris, J.T. (2004). "Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium". *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 138: 221-228.
- | Rodríguez-Perón, J.M.; Menéndez López, J.R.; Trujillo López, Y. (2001). "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo". *Rev. Cubana Med. Mil.*, 30 (1): 15-20.
- | Rodríguez-Cea, A.; Ayllón, F.; García-Vázquez, E. (2003). "Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56: 442-448.
- | Rodríguez-Rey, A.; Noris-García, E.; Fundora-Torres, M.T. (2016). "Principios y relevancia del ensayo cometa". *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, 35 (2): 184-194.



- | Roméo, M.; Bennani, N.; Gnassia-Barelli, M.; Lafaurie, M.; Girard, J.P. (1999). "Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*". *Aquat. Toxicol.*, 48 (2-3): 185-194.
- | Romero, A.; Cabaleiro, T.; Caride, A.; Lafuente, A. (2008) "Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio". *Rev. Toxicol.*, 25: 3-11.
- | Sabti, H; Hossain, Md.M.; Brooks, R.R.; Stewart, R.B. (2000) "The current environmental impact of base-metal mining at the Tui Mine, Te Aroha, New Zealand". *J. R. Soc. New Zealand*, 30 (2): 197-207.
- | Saglam, D.; Atli, G.; Canli, M. (2013). "Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 92: 79-86.
- | Sainz, A.; Grande, J.A.; De la Torre, M.L. (2004). "Characterisation of heavy metal discharge into the Ria of Huelva". *Environ. Internat.*, 30: 557-566.
- | Sánchez Moyano, E.; García Asencio, I.; García Adiego, E.; Leal Gallardo, A.; Ollero De Castro, C.; Fraidías Amarillo, J. (2005). "Vigilancia ecológica del litoral andaluz (I). Monitorización de la macrofauna del sedimento y calidad ambiental de los fondos sublitorales". Ed. Junta de Andalucía - Consejería del Medio Ambiente, I.S.B.N.: 84-96329-46-1.
- | Sánchez-Galán, S.; Linde, A.R.; García-Vázquez, E. (1999). "Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43: 301-304.
- | Sánchez-Galán, S.; Linde, A.R.; Ayllón, F.; García-Vázquez, E. (2001). "Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49: 139-143.
- | Sarmiento, A.M.; Nieto, J.M.; Olías, M. (2004). "The contaminant load transported by the river Odiel to the Gulf of Cádiz (SW Spain)". *Appl. Earth Sci.*; 113 (2): 117-22.
- | Schmid W (1975). "The micronucleus test". *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- | Seregin, I.; Ivanov, V. (2001). "Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants". *Russ. J. Plant. Physiol.*, 48: 523-544.
- | Shafaqat, A.; Mujahid, F.; Saima, B.; Rehan, A. (2014). "Effect of different heavy metal pollution on fish". *Res. J. Chem. Envi. Sci.*, 2: 74-79.
- | Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants". *Exp. Physiol.*, 82: 291-295.
- | Soldevilla, M.; Marañón, T.; Cabrera, F. (1992). "Heavy metal content in soil and plants from a pyrite mining area in Southwest Spain". *Communicat. Soil Sci. Plant Anal.*, 23 (11-12): 1301-1319.
- | Sokolova, I.M. (2004). "Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (*Bivalvia: Ostreidae*)". *J. Exp. Biol.*, 207: 2639-2648.
- | Storelli, M.M.; Marcotrigiano, G.O. (2004). "Content of mercury and cadmium in fish (*Thunnus alalunga*) and cephalopods (*Eledone moschata*) from the south-eastern Mediterranean Sea". *Food Additives and Contaminants*, 21 (11): 1051-1056.
- | Storelli, M.M.; Giacomini-Stuffler, R.; Storelli, A.; Marcotrigiano, G.O. (2005). "Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study". *Mar. Pollut. Bull.*, 50: 993-1018
- | Tafaneli, R.; Summerfelt R. (1975). "Cadmium-Induced histopathological changes in goldfish". EN: *The pathology of fishes*. Edited By Ribelin y Migaki. The University of Wisconsin Press., 25: 613-693.



- | Thevenod, F.; Friedmann, J.M.; Katsen, A.D.; Hauser, I.A. (2000) "Upregulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis". *J Biol Chem.*, 275: 1887-1896.
- | Thomas, P.; Wofford, H.W. (1993). "Effects of cadmium and aroclor 1254 on lipid peroxidation glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues". *Aquat. Toxicol.*, 27: 159-177.
- | Udriou, I. (2006). "The micronucleus test in piscine erythrocytes". *Aquat. Toxicol.*, 23: 201-214.
- | Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk". *Assessment Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- | Velma, V.; Tchounwou, P.B. (2010). "Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *Carassius auratus*". *Mutat. Res.*, 698: 43-51.
- | Verboost, P.M.; Flik, G.; Lock, R.A.C.; Wendelaar Bonga, S.E. (1987). "Cadmium inhibition of Ca²⁺ uptake in rainbow trout gills". *Am. J. Physiol.*, 253: 216-221.
- | Vieira, M.C.; Torronteras, R.; Córdoba, F.; Canalejo, A. (2012). "Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 78: 212-217.
- | Vieira da Cunha, K.P.; Araújo do Nascimento, C.W.; Magalhães de Mendonça Pimentel, R., Pereira Ferreira, C. (2008). "Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming". *J. Hazard. Mater.*, 160 (1): 228-234.
- | Vigliano, F.A.; Aleman, N.; Quiroga, M.I.; Nieto, J.M. (2006). "Ultrastructural characterization of gills in juveniles Argentinian Silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes)" *Anat. Histol. Embryol.*, 35: 76-83.
- | Vranová, E.; Inzé, D.; Van Breuseguem, F. (2002). "Signal transduction during oxidative stress". *J. Exp. Bot.*, 53: 1227-1236.
- | Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B.; Beyersmann, D. (2003). "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis". *Toxicology*, 192: 95-117.
- | Wang, J.; Zhang, H.; Zhang, T.; Zhang, R.; Liu, R.; Chen, Y. (2015). "Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase". *Int. J. Biol. Macromol.*, 77: 59-67.
- | Yadav, K.K.; Trivedi, S.P. (2009) "Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*". *Chemosphere*, 77: 1495-1500.
- | Yu, B.P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species". *Physiol. Rev.*, 74: 139-163.
- | Zelikoff, J.T.; Bowser, D.; Squibb, K.S.; Frenkel, K. (1995). "Immunotoxicity of low-level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies". *J. Toxicol. Environ. Health*;45 (3): 235-248.
- | Zhu, Y.; Wang, J.; Bai, Y.; Zhang, R. (2004) "Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.)". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72: 78-86.
- | Zúñiga, G; Gómez, B. (2006). "La prueba de micronúcleos" En: Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana, 19 (1).



Se terminó de editar el libro
Biología de Huelva
Naturaleza, Biodiversidad,
Bioindicadores y Biomarcadores
el 12 de mayo de 2022,
estando al cuidado de la edición
el Servicio de Publicaciones
de la Universidad de Huelva





DIPUTACIÓN
DE **HUELVA**



Universidad
de Huelva



CÁTEDRA
DE LA PROVINCIA