



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL
NITRITO EN LA RESPUESTA RESPIRATORIA Y
EN ALGUNOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS
DE LA CARPA HERBÍVORA
Ctenopharyngodon idella (PISCES,
CYPRINIDAE).**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O**

**P R E S E N T A:
LAURA ANGELICA RANGEL RAMOS**



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDA**



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Alteraciones producidas por el nitrito en la respuesta respiratoria y en algunos parámetros sanguíneos de la carpa herbívora Ctenopharyngodon idella (pisces Cyprinidae).

realizado por Laura Angelica Rangel Ramos

con número de cuenta 8125484-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía
Propietario Dra. Sonia Sofía Espina Aguilera
Propietario Dra. Cecilia Vanegas Pérez
Suplente en C. Fabian Contreras Arizaga
Suplente Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

903
2013
[Handwritten signatures and stamps]

A GERARDO Y ABRAHAM

Por que son lo más importante para mí en la vida y significar la ilusión.

A HECTOR

Por su apoyo y amor.

A LEONOR

Por que esto es el resultado de su amor y esfuerzo.

I N D I C E

	No. PAG.
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	10
A.- CAPTURA, MANTENIMIENTO Y ACLIMATACIÓN	10
B.- FASE EXPERIMENTAL	11
a. CONSUMO DE OXÍGENO	12
b. PARÁMETROS SANGUÍNEOS	13
1.- Nitrito en plasma	13
2.- Metahemoglobina en plasma	14
3.- Cloruro plasmático	15
4.- Análisis estadístico	15
RESULTADOS	17
A.- CONSUMO DE OXÍGENO	17
B.- PARÁMETROS SANGUÍNEOS	18
1.- Nitrito en plasma	18
2.- Metahemoglobina en plasma	19
3.- Cloruro en plasma	20
DISCUSION	21

LITERATURA CITADA	29
TABLAS	35
FIGURAS	39

RESUMEN

Debido a los efectos tóxicos que puede ocasionar la presencia de altas concentraciones de nitrito en peces, en este trabajo se estimó el efecto de la exposición aguda al contaminante sobre la respuesta respiratoria, así como, algunas modificaciones causadas por la exposición aguda al contaminante sobre algunos parámetros sanguíneos de juveniles de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*).

Los peces se expusieron por 96 h a una concentración de nitrito que causa el 10% de mortalidad (CL₁₀-96 h). La mortalidad después del periodo de exposición fue menor del 5% de la muestra de peces. La respuesta respiratoria de los peces expuestos al nitrito disminuyó después de 96 h. En cuanto a los parámetros sanguíneos estimados la concentración de nitrito y el porcentaje de metahemoglobina en plasma, alcanzaron un máximo después de 48 h de exposición. Así mismo, el porcentaje de metahemoglobina se relacionó de manera potencial con la concentración de nitrito en el plasma de los peces. Finalmente los niveles de cloruro en el plasma tendieron a disminuir.

Los resultados obtenidos indican que aún cuando las carpas son consideradas como organismos tolerantes a los contaminantes, son sensibles a la presencia de nitrito.

Así mismo, este trabajo incrementa la información respecto al mecanismo de acción de este contaminante en ciprinidos, dado que los trabajos al respecto son escasos.

INTRODUCCIÓN

En México, las carpas chinas entre las que destacan la carpa cabezona, la carpa plateada y la carpa herbívora se importaron con el fin de incrementar la producción piscícola; en particular, la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* se introdujo en 1965. Actualmente, esta especie es aceptada por la población como alimento debido a su alto nivel proteico y su sabor (Arredondo y Juárez, 1986).

En cautiverio la carpa herbívora no se reproduce en forma natural, sin embargo, en el centro de Producción Piscícola de Tezontepec de Aldama, en el Estado de Hidalgo se ha logrado desarrollar con éxito la tecnología para su reproducción (Arredondo, 1987). Algunos autores mencionan que *C. idella* es una de las pocas especies dulceacuícolas que se alimentan de macrófitas acuáticas, actuando así como control biológico de las plantas acuáticas flotantes y sumergidas que pueden disminuir el oxígeno disuelto en el medio, así como evitar la penetración de la luz (Hickling, 1966).

La conducta y la fisiología de las carpas, así como, la de los demás organismos acuáticos, pueden ser modificada por efecto de cambios en los parámetros fisicoquímicos del medio. En condiciones naturales algunas sustancias químicas constituyentes de los medios dulceacuícolas se encuentran en concentraciones bajas; sin embargo, cuando el equilibrio ambiental es alterado los niveles de tales componentes se pueden incrementar y producir daño a los organismos. El nitrito es

uno de estos compuestos, que en forma natural se encuentra en concentraciones bajas en el medio (Diab y Shilo, 1988). Bajo ciertas circunstancias como la disminución de la concentración de oxígeno ambiental, la presencia de desechos industriales, la eutroficación y la disminución de la intensidad lumínica, los niveles de nitrito pueden aumentar convirtiéndose en un producto tóxico para las especies acuáticas (Anthoniesen *et al.*, 1976; Lewis y Morris, 1986).

El nitrito actúa en la sangre de los organismos como un agente oxidante de la hemoglobina, es decir, transforma el hierro (Fe^{2+}) a su estado férrico (Fe^{3+}); debido a esta oxidación los niveles de metahemoglobina o ferrihemoglobina en el plasma de los organismos se incrementan. Altas concentraciones de metahemoglobina en sangre pueden ocasionar hipoxia en los tejidos (Bodanski, 1951). Un síntoma característico de niveles elevados de metahemoglobina es el color café de la sangre y de las branquias de los peces (Bowser *et al.*, 1983; Lewis y Morris, 1986).

En general, los peces obtienen iones a través de la dieta y la mayoría son también capaces de acumular iones captados mediante mecanismos de canales activos asociados a las células del cloro de las branquias (Maetz, 1971). El ión nitrito penetra al organismo a través del mismo mecanismo por el cual se transporta el cloruro hacia el plasma de los peces, por lo tanto actúa como un inhibidor del transporte de cloruro (Bath y Eddy, 1980). También se ha propuesto que el nitrito penetra en forma de

ácido nítrico (HNO_2), atravesando las células epiteliales. En la sangre este compuesto se disocia en protones y iones nitrito (Colt y Tchobanglous, 1976).

Cuando el nitrito se presenta en elevadas concentraciones en el medio, la acumulación del compuesto en los organismos se incrementa poniendo en riesgo la sobrevivencia y el buen estado fisiológico de los animales acuáticos. Algunos autores han estimado la toxicidad del nitrito en algunas especies de peces dulceacuícolas, señalando que la concentración letal media de nitrito en exposiciones agudas de 96 horas ($\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$) varía dependiendo de la especie de que se trate (Lewis y Morris, 1986). En general se conoce que los ciprínidos son organismos tolerantes a la acción del nitrito: para *Cyprinus carpio* se reporta una $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$ menor de $32 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ (Lewis y Morris, 1986); mientras que para los juveniles de la carpa herbívora aclimatados a 24°C se reporta una $\text{CL}_{50-96 \text{ h}}$ de $10.8 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ (Alcaraz, 1993).

La magnitud del daño producido por el nitrito en los peces depende de las características fisicoquímicas del medio. Se ha determinado el efecto protector de diferentes iones contra la toxicidad del nitrito; en este sentido, se conoce que el ión cloruro disminuye la toxicidad del contaminante de manera eficiente. Perrone y Meade (1977) fueron los primeros autores en probar el efecto protector del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en el salmón *Oncorhynchus kisutch*. A la fecha, el efecto amortiguador del cloruro contra el daño producido por el nitrito ha sido comprobado en el bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Tomasso et al., 1979).

Schwedler y Tucker, 1983); en la trucha arcoiris, *Salmo gairdneri* (Wedemeyer y Yasutake, 1978; Eddy y Williams, 1986) y en la carpa herbívora, *Ctenopharyngodon idella* (Davalos, 1992; Alcaraz y Espina, 1993; Espina y Alcaraz, 1993; Alcaraz y Espina, 1994).

Por otro lado Eddy *et al.* (1983) encontraron que el bromo también disminuye la toxicidad del nitrito en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri*. Así mismo, se ha demostrado que otros aniones como el bicarbonato y algunos cationes como el calcio, el magnesio, el sodio y el potasio tienen un efecto protector, aunque en menor grado contra el efecto tóxico causado por el nitrito (Tomasso *et al.*, 1980; Huey *et al.*, 1980; Bowser *et al.*, 1983). Los niveles de oxígeno disuelto en el medio determinan también el efecto tóxico del nitrito, ya que a concentraciones bajas del gas los organismos acuáticos son más sensibles al tóxico (Watenpaugh y Beitingger, 1986).

Se conoce que en peces, así como en otros grupos de vertebrados (mamíferos y anfibios), la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina en el plasma es mediada por la enzima metahemoglobina-reductasa (Cameron, 1971; Freeman *et al.*, 1983; Eddy y Williams, 1987). De esta manera, cuando los peces se exponen a una concentración constante de nitrito, los niveles de metahemoglobina en la sangre se incrementan hasta un punto máximo, después de lo cual se estabilizan en el tiempo debido a que la formación y reducción de la metahemoglobina alcanza el equilibrio (Huey *et al.*, 1980).

En relación al tiempo de acción de nitrito, Bartlett *et al.* (1987) observaron la formación de metahemoglobina en el plasma de algunos peces de origen amazónico de las familias Characidae y Prochilodontidae, después de una hora de exposición a 6 mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$. No obstante, algunos autores señalan que la acumulación máxima de nitrito se produce a las 24 h de exposición como el caso de *Ictalurus punctatus* (Huey *et al.*, 1980). Al respecto, Bath y Eddy (1980) observaron en la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), que después de 24 h de exposición al nitrito el 80% de la hemoglobina se había oxidado a metahemoglobina. Por otra parte, se han mencionado alteraciones ultraestructurales y funcionales en la célula de cloro después de 48 h de exposición al nitrito (Krous *et al.*, 1982; Gaino *et al.*, 1984).

En el medio natural, así como en los estanques de cultivo, los peces pueden estar expuestos a altas concentraciones de nitrito por periodos cortos. De aquí se desprende la importancia de evaluar el efecto producido por exposiciones agudas, así como medir el tiempo de acción del mismo.

Se conoce que las respuestas fisiológicas de las especies acuáticas son buenos indicadores del estrés que producen los contaminantes (Sprague, 1971). En particular, es importante medir el efecto del nitrito sobre la respuesta respiratoria de los organismos debido al mecanismo de acción tóxica del contaminante sobre los pigmentos respiratorios. Así mismo, considerando la incorporación del nitrito al

sistema circulatorio de los peces, es importante cuantificar las alteraciones producidas en los parámetros sanguíneos de los organismos.

Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se planteó el siguiente objetivo:

Estimar el efecto subletal causado por el nitrito a lo largo del tiempo de exposición a través de evaluar las alteraciones en diferentes respuestas, esto con el fin de proponer indicadores tempranos del efecto tóxico causado por este contaminante en juveniles de *C. idella*.

Objetivos particulares:

- Medir el estrés fisiológico producido por el contaminante a través del consumo de oxígeno de los juveniles de *Ctenopharyngodon idella*, expuestos, por diferentes lapsos a la CL_{10-96} h del $N-NO_2^-$ /L.
- Cuantificar la concentración de nitrito, el porcentaje de metahemoglobina y la concentración de cloruro en el plasma de las carpas expuestas al nitrito en diferentes tiempos de exposición a la CL_{10-96} h mg/L al contaminante.
- Integrar las alteraciones a lo largo del tiempo de exposición con el fin de proponer una respuesta o un conjunto de ellas como posibles indicadores tempranos del grado de alteración causado por el tóxico en los peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. CAPTURA, MANTENIMIENTO Y ACLIMATACIÓN

Los juveniles de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* utilizados en este estudio, fueron proporcionados por el centro de producción Piscícola de Tezontepec de Aldama, el cual se localiza a los 20° 03' latitud norte; 99° 17' longitud oeste y a 1610 m.s.n.m. en el Estado de Hidalgo, México (Arredondo, 1987). Esta piscifactoria es el principal núcleo de producción y distribución de ciprinidos a nivel nacional.

Los organismos se capturaron con redes de cuchara de 1mm de abertura de malla y se colocaron en contenedores con agua del sitio de recolecta. Posteriormente se seleccionaron los organismos de la talla requerida para el desarrollo de esta investigación, de 3.3 ± 0.99 g de peso húmedo. El traslado de las carpas se realizó en bolsas de polietileno, con agua de los estanques y con atmósfera saturada con oxígeno para asegurar la sobrevivencia y el buen estado fisiológico de los peces durante el transporte. La captura se realizó en la época de invierno.

En el laboratorio, las carpas se colocaron en 10 acuarios de 60 L a una densidad de 20 organismos por acuario, con aireación constante y a una temperatura similar a la del sitio de captura (24° C). Durante el periodo de mantenimiento y aclimatación se utilizó agua filtrada por carbón activado, cuyas características químicas fueron las

siguientes: pH 8.4-8.7 (pH metro digital, Corning; ± 0.5), alcalinidad de 136-139 mg CaCO_3/L , 80-115 mg Cl^-/L (APHA, 1985) y 24°C (termómetro Brannan $\pm 0.01^\circ \text{C}$). Durante el tiempo que los organismos permanecieron en el laboratorio el fotoperiodo se fijó en 12 horas luz y 12 de oscuridad. Los peces se alimentaron diariamente (10% de su peso corporal) con una dieta de alimento balanceado comercial (purina para trucha, 40% proteína) y espinaca fresca molida.

Durante la fase de aclimatación a la temperatura de 24°C por 21 días, el agua de los acuarios se recambió diariamente, substituyendo una tercera parte por agua filtrada por carbón activado, con el fin de preservar la buena calidad del agua y retirar el alimento que no era ingerido por los peces. Al finalizar esta fase se suspendió la alimentación de los animales 24 h antes de exponerlos a las condiciones experimentales.

B. FASE EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron utilizando agua dulce artificial moderadamente dura (EPA, 1989), cuyas características fueron: pH 7.4-7.8, alcalinidad de 60-70 mg CaCO_3/L , 5.0 ± 0.5 mg Cl^-/L y 24°C . Los peces se colocaron en 8 acuarios de 30 L a una densidad de 20 organismos por acuario con agua dulce artificial 24 h antes de exponerlos al contaminante. Al finalizar este periodo se agrego a 6 de los acuarios una solución estándar de nitrito de sodio (NaNO_2^- Merk, 99%) en cantidad suficiente

para obtener una concentración de 5.0 mg N-NO₂⁻/L. Esta concentración equivale a la cantidad de nitrito que produjo la muerte del 10% de los juveniles de carpa herbívora en 96 horas (CL₁₀-96 h de N-NO₂⁻ mg/L) en condiciones ambientales similares a las utilizadas en este trabajo (Alcaraz, 1993). A los organismos de los otros dos acuarios no se les agregó nitrito y fueron utilizados como testigos.

El consumo de oxígeno, así como la concentración de nitrito, el porcentaje de metahemoglobina y la concentración de cloruro en el plasma de los juveniles de *C. idella* se midió en los peces expuestos durante 3, 6, 24, 48 y 96 h al nitrito, y en el grupo testigo que se mantuvo sin el contaminante por los mismos lapsos.

a. CONSUMO DE OXÍGENO

El consumo de oxígeno de los juveniles de *C. idella* se midió en respirometros cerrados de 250 ml. Se utilizó un baño termorregulado (24° C), donde se colocaron 11 respirometros, de los cuales 10 contenían un animal y uno más sin organismo, que se consideró como testigo. Se mantuvo una aireación constante en las cámaras respirométricas durante 30 min; este periodo permitió disminuir el estrés de los organismos. Posteriormente se tomó una muestra inicial del agua de cada respirometro; se suspendió el suministro de aire y se sellaron las cámaras durante 30 min; después de este período se tomó la muestra final de agua de cada respirometro. La concentración de oxígeno disuelto de las muestras iniciales y

finales se midió con un oxímetro (YSI-54 ARC \pm 0.01 mg O₂/L). El oxígeno consumido por cada pez se calculó por diferencia entre las concentraciones de dichas muestras. Los valores se corrigieron con los datos obtenidos en el respirómetro testigo, sin organismo. Al finalizar las mediciones, los animales se sacrificaron y se pesaron en balanza de plato (OHAUS, \pm 0.50). El consumo de oxígeno de las carpas se expresó en mg O₂/h por organismo.

b) PARÁMETROS SANGUÍNEOS

Con el fin de determinar la concentración de metahemoglobina en la sangre de los peces se emplearon 10 organismos; para medir la concentración de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) y de cloruro (mg Cl⁻/L) plasmáticos se emplearon en cada caso cinco organismos. Los peces se retiraron de los acuarios y se sacrificaron haciendo una incisión en la parte dorsal, a la altura del opérculo. Las muestras de sangre se obtuvieron con una jeringa hipodérmica de 1 ml de capacidad. Para evitar la coagulación de la sangre se utilizó una solución de heparina (Hepar-th 2500 U.1/ml).

1. NITRITO EN PLASMA

La sangre obtenida de cada organismo se centrifugó con el fin de romper la interfase plasma/célula, en seguida, se tomo una alícuota de 200 μ L del sobrenadante, a la cual se adicionó 3 ml de agua desionizada y 0.2 ml de reactivo AZO-DYE

(N-naftil etilendiamina y sulfamilamina, 1/1). Después de 10 min se midió la absorbencia de las muestras en un espectrofotómetro a 540 nm (Spectronic 88, Bausch & Lomb). La intensidad del color de la muestra es proporcional a la concentración de nitrito en el plasma (Palacheck y Tomasso, 1984). Los resultados obtenidos se expresaron en mg N-NO₂⁻/L de plasma.

2. METAHEMOGLOBINA EN PLASMA

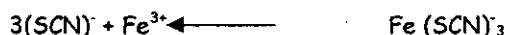
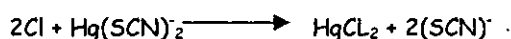
Para medir el porcentaje de metahemoglobina en el plasma de las carpas, se utilizó la técnica propuesta por Bartlett *et al.* (1987); la sangre de los peces se obtuvo de manera similar a la descrita anteriormente. Se tomaron muestras de 50 a 100 µl de sangre heparinizada y se mezclaron con 4 ml de buffer tris-EDTA pH 8.0, que contenía 0.01 M de tris (tris-hydroxymethyl-aminometano) y 0.4 mM de EDTA (disodio etil-diamino-tetracetato). La muestra se centrifugó a 3000 rpm y se midió la absorbencia a 630 nm (A₁). Inmediatamente después se tomó una alícuota de 2.5 ml del hemolizado, se le agregaron 50 µl de una solución que contenía 30 mg NaNO₂⁻/L, y se midió la absorbencia a 630 nm (A₂) con un espectrofotómetro (Spectronic 88, Bausch and Lomb). El porcentaje de metahemoglobina respecto a la hemoglobina total presente en el plasma de las carpas (mHb; %) se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{mHb (\%)} = (A_1/A_2) 100$$

Donde A_1 y A_2 es la absorbancia medida a 630nm.

3. CLORURO PLASMÁTICO

Para la cuantificación de cloruro en el plasma de las carpas se utilizó la técnica de diagnóstico Sigma (Sigma Proc. No. 461). De manera general este procedimiento se basa en las siguientes reacciones:



donde el tiocianato de la sal mercurica es desplazado por el cloruro; el tiocianato liberado forma un complejo con los iones férricos, los cuales al desplazarse lo hacen en forma de un complejo rojo, visible a una intensidad de 460 nm. La intensidad del color a esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración del cloruro presente en el plasma. Los resultados obtenidos se expresaron en mg Cl^-/L de plasma (Tietz, 1976).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el examen de los resultados se empleo el Análisis Exploratorio de Datos (AED, Tuckey, 1977), el cual considera la mediana (M) como medida de tendencia central resistente a valores atípicos. El efecto del nitrato sobre el consumo de oxígeno de las carpas se visualizó mediante diagramas de cajas en paralelo del AED.

Cada caja está caracterizada por la mediana (M), el cuartil superior (H_s), el cuartil inferior (H_i), la amplitud de la caja ($\Delta H = H_s - H_i$) y el intervalo de confianza (IC, 95%) de la mediana:

$$IC = M \pm 1.58 \frac{\Delta H}{\sqrt{n}}$$

donde M es la mediana, ΔH la amplitud de la caja y n el número de datos.

Las diferencias significativas ($P < 0.05$) en la respuesta respiratoria, los niveles de nitrito y cloruro plasmático, así como el % de metahemoglobina en el plasma de las carpas, en los diferentes tiempos de exposición al nitrito, se estimaron a partir del trasplante de los intervalos de confianza de las cajas en paralelo. Las diferencias se corroboraron mediante el análisis no paramétrico de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (Zar, 1984).

La concentración de nitrito en el plasma se relacionó con el porcentaje de metahemoglobina en la sangre de los peces, de acuerdo a un modelo lineal cuando ambas variables se transformaron a su valor logarítmico. Debido a que la distribución de los valores porcentuales no es normal, los datos se codificaron previamente mediante la transformación angular (Zar, 1984).

RESULTADOS

Las características fisicoquímicas del agua y la concentración del nitrito en el medio no se modificaron durante el periodo experimental. La concentración de nitrito (5 mg N-NO₂⁻/L) utilizada en este estudio corresponde a la concentración subletal que permite el 90% de sobrevivencia de los juveniles de *Ctenopharyngodon idella* (7.60 ± 0.50 g de peso húmedo) aclimatados a 24°C en agua dulce artificial (Alcaraz, 1993). Durante el periodo experimental se observó en los peces un porcentaje de sobrevivencia del 95%.

No se observaron diferencias significativas en la tasa metabólica ni en los parámetros sanguíneos de los peces mantenidos sin el contaminante en el agua dulce artificial ($P > 0.05$), evaluados a las 3, 6, 24, 48 y 96 horas, por este motivo los resultados se agruparon y se calculó el valor mediano correspondiente al testigo.

A. CONSUMO DE OXÍGENO

La tasa metabólica de los juveniles de *C. idella* del grupo testigo fue de 3.3 mg O₂/h. El consumo de oxígeno de los peces expuestos a 5 mg N-NO₂⁻/L no se modificó significativamente después de 3, 6, 24 y 48 h de exposición al nitrito, en relación al grupo testigo ($P > 0.05$), sin embargo, después de 96 h se observó una disminución en la tasa de consumo de oxígeno del 54.6% respecto al testigo ($P < 0.05$). Así mismo, el

consumo de oxígeno de los peces expuestos al contaminante por 96 h fue significativamente menor que el observado en los demás grupos experimentales con una disminución del 46.4 al 59.5% ($P < 0.05$) respecto al testigo (Tabla 1, Fig. 1).

B. PARÁMETROS SANGUÍNEOS

1. NITRITO EN PLASMA

La concentración de N-NO_2^- /L el plasma de los juveniles de *C. idella* del grupo testigo fue de 0.044 mg/L. El nivel de nitrito en el plasma de los peces expuestos a 5 mg N-NO_2^- /L se incrementó significativamente ($P < 0.05$) al aumentar el tiempo de exposición (Tabla 2, Fig. 2). Después de 3 h de exposición la concentración en el plasma fue de 1.12 mg N-NO_2^- /L; después de 6, 24, 48 y 96 h de exposición al contaminante, se observó que la concentración del nitrito plasmático fue mayor que la concentración de nitrito presente en el medio, con factor de bioconcentración ($C_{\text{int}}/C_{\text{ext.}}$) de 1.31, 5.9, 6.3 y 6.08, respectivamente.

La mayor acumulación de nitrito en el plasma de las carpas expuestas al contaminante se observó después de 48 h de exposición; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los niveles de nitrito de las carpas expuestas por 24, 48 y 96 h al contaminante ($P > 0.05$) (Tabla 2, fig. 2).

2. METAHEMOGLOBINA EN PLASMA

Los niveles de metahemoglobina en el plasma de las carpas expuestas a 5 mg N-NO₂⁻/L se incrementaron en presencia de nitrito respecto a los peces mantenidos sin el contaminante (Tabla 3, fig.3). En los peces testigos el porcentaje de metahemoglobina en el plasma respecto a la concentración de hemoglobina total fué de 2.5%. El porcentaje de metahemoglobina de los peces expuestos durante diferentes periodos de tiempo al nitrito fue mayor en todos los casos a los niveles observados en los peces del grupo testigo ($P < 0.05$). En este sentido los niveles de metahemoglobina de los peces expuestos a nitrito por 3, 6, 24, 48 y 96 h fueron 10.1, 16.0, 26.6, 33.8, y 26.2 veces mayores respectivamente, en relación al observado en los peces que permanecieron sin nitrito (Tabla 3, fig.3).

Los niveles más altos de metahemoglobina en la sangre de los peces se observaron después de exponer a los organismos por 48 h al contaminante y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de metahemoglobina con los expuestos por 24 y 96 h al nitrito ($P > 0.05$) (Tabla 3, fig 3).

El porcentaje de metahemoglobina se relacionó con la concentración de nitrito acumulada en el plasma de los organismos. La formación de la metahemoglobina en el tiempo se relaciona de manera potencial con la cantidad de nitrito acumulado en el

plasma de los juveniles de *C. idella* (Fig 4). La ecuación que describe dicha relación es la siguiente:

$$\log \text{mHb (\%)} = 1.15 + 0.49 \cdot \log \text{N-NO}_2^-/\text{L}$$

donde mHb es el porcentaje de metahemoglobina y $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ es la concentración de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^-/\text{L}$) acumulado en el plasma de las carpas. Los parámetros y estimadores de dicho modelo se presentan en la figura 4. Debido a la distribución normal de los valores del porcentaje de metahemoglobina no fue necesaria la transformación de estos datos para realizar la regresión lineal (Zar, 1984).

3. CLORURO EN PLASMA

El nivel de cloruro en el plasma de los peces del grupo testigo fue de 3550 mg/L; sin embargo, la concentración de cloruro en las carpas expuestas a 5 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ tendió a disminuir con el tiempo de exposición al contaminante. La concentración de cloruro en el plasma de los juveniles de carpa herbívora expuestos al nitrito por 3 y 24 h fue similar a la observada en el grupo testigo ($P > 0.05$). En contraste, los niveles del ión en el plasma de los peces expuestos por 6, 48 y 96 h al contaminante fue significativamente menor que la concentración observada en el plasma de los peces testigo ($P < 0.05$). Los niveles de cloruro en el plasma de los peces de los grupos

experimentales observados entre 3 a 96 h fueron similares ($P > 0.05$) independientemente del tiempo de exposición al nitrito (Tabla 4, fig 5).

DISCUSION

La toxicidad del nitrito ha sido observada en varias especies de ciprínidos. Esta familia de peces dulceacuícolas ha sido reconocida como tolerante a este contaminante (Eddy y Williams, 1986). Lewis y Morris (1986) señalan que la concentración letal media (CL_{50} -96h) para la carpa común *Cyprinus carpio*, en presencia de $10 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$ en el medio es de $32 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$.

La toxicidad del nitrito en la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* varía en función de la talla de los peces. Al respecto, Davalos (1992) señala una CL_{50} -96 h de $1.71 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en juveniles de 0.46 g peso húmedo y Alcaraz y Espina (1995) reportan para la especie una CL_{50} -96 h de $10.8 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en juveniles de 7.6 g peso húmedo; en ambos trabajos la concentración de cloruro en el medio fue similar ($4 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$). En este sentido, diversos autores mencionan que los estadios más tempranos, son más sensibles al efecto tóxico del nitrito que los adultos de la especie (Perrone y Meade, 1977).

La concentración de nitrito empleada en el presente estudio ($5 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$) corresponde a la concentración que produce una mortalidad del 10% (CL_{10} -96h) en los juveniles de *C. idella* (Alcaraz, 1993); sin embargo, la mortalidad

experimentales observados entre 3 a 96 h fueron similares ($P > 0.05$) independientemente del tiempo de exposición al nitrito (Tabla 4, fig 5).

DISCUSION

La toxicidad del nitrito ha sido observada en varias especies de ciprínidos. Esta familia de peces dulceacuícolas ha sido reconocida como tolerante a este contaminante (Eddy y Williams, 1986). Lewis y Morris (1986) señalan que la concentración letal media (CL_{50} -96h) para la carpa común *Cyprinus carpio*, en presencia de $10 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$ en el medio es de $32 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$.

La toxicidad del nitrito en la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* varía en función de la talla de los peces. Al respecto, Davalos (1992) señala una $CL_{50-96 \text{ h}}$ de $1.71 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en juveniles de 0.46 g peso húmedo y Alcaraz y Espina (1995) reportan para la especie una $CL_{50-96 \text{ h}}$ de $10.8 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en juveniles de 7.6 g peso húmedo; en ambos trabajos la concentración de cloruro en el medio fue similar ($4 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$). En este sentido, diversos autores mencionan que los estadios más tempranos, son más sensibles al efecto tóxico del nitrito que los adultos de la especie (Perrone y Meade, 1977).

La concentración de nitrito empleada en el presente estudio ($5 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$) corresponde a la concentración que produce una mortalidad del 10% ($CL_{10-96 \text{ h}}$) en los juveniles de *C. idella* (Alcaraz, 1993); sin embargo, la mortalidad

observada fue del 5%. Así, la diferencia entre el valor de mortalidad esperada (10 %) y el valor observado (5%) no es significativo y la diferencia puede atribuirse a la variación intraespecífica de la especie toda vez que las características fisicoquímicas del medio fueron similares en ambos trabajos.

La principal acción tóxica del nitrito en los peces es la oxidación de la hemoglobina de la sangre a metahemoglobina. La presencia de metahemoglobina puede causar alteraciones en el sistema circulatorio y respiratorio de los organismos, debido a que la metahemoglobina presenta una alta afinidad al oxígeno, uniéndose al gas de tal forma que es incapaz de proporcionar de oxígeno a los tejidos; así mismo, este hecho puede dificultar el intercambio gaseoso en las branquias de los peces (Watenpaugh y Beitinger, 1986; Bartlett *et al.*, 1987; Eddy y Williams, 1987).

Aunque existen pocos trabajos referentes al efecto del nitrito sobre la tasa respiratoria de las carpas, se ha reportado en *C. idella* que la presencia del nitrito disminuye el consumo de oxígeno de los animales. Al respecto, Davalos (1992) observó una inhibición del 43 y 30% de la tasa respiratoria de los juveniles de carpa herbívora cuando los organismos se expusieron por 24 y 48 horas a la CL50-96 h de nitrito (1.71 mg N-NO₂⁻ /L). En contraste, en el presente trabajo este consumo de oxígeno no se modificó después de 24 y 48 h de exposición al nitrito; es decir, el consumo de oxígeno disminuyó únicamente después de 96 horas de exposición. Es importante considerar que en este estudio los organismos fueron expuestos a una

concentración del contaminante menor (CL10-96 horas) a la usada por Davalos (1992). Por lo tanto, en los juveniles de *C. idella* expuestos a niveles subletales de nitrito, la disminución en la tasa respiratoria aparentemente ocurre a partir de 96 horas de exposición al tóxico. Esta disminución en el consumo de oxígeno puede atribuirse a la formación en el tiempo de la metahemoglobina en la sangre de los juveniles de *C. idella*, así como, a la incorporación de nitrito en el plasma de los peces.

El nivel de metahemoglobina de los peces testigo fue de 2.5%, lo cual concuerda con los niveles encontrados en peces y mamíferos en los cuales los niveles de metahemoglobina en organismos no intoxicados con nitrito presentaran hasta el 5% de sus hemoglobina oxidada en forma de metahemoglobina (Brown y McLeay, 1975; Eddy y Williams, 1987).

El nivel más alto de metahemoglobina observado en los juveniles de carpa herbívora correspondió al 84.6% después de 48 h de exposición al nitrito. Eddy y Williams (1987) señalan que los peces pueden tolerar concentraciones de metahemoglobina relativamente altas en la sangre sin que se observe mortalidad. Se conoce que el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) tolera un 30% de metahemoglobina mientras que *Salmo gairdneri* y *Onchorynchus kisutch* toleran hasta el 70% de metahemoglobina. Así mismo, Palacheck y Tomasso (1984) mencionan que la totalidad de la hemoglobina de *I. punctatus* se puede encontrar en su forma oxidada (metahemoglobina) sin que se produzca mortalidad. Esto último, aunado a lo

observado en este estudio, donde aun en presencia de 84.6% de metahemoglobina el consumo de oxígeno de *C. idella* no se modificó, puede apoyar la hipótesis que sugiere que el daño causado por el nitrito no se relaciona directamente con la formación de metahemoglobina, sino que más bien las alteraciones pueden deberse a la oxidación de otros compuestos diferentes (Lewis y Morris, 1986).

En éste estudio, los niveles de nitrito en el plasma de las carpas alcanzaron una concentración de $32 \text{ mg N-NO}_2^- / \text{L}$; esto es, la concentración de nitrito acumula en la

sangre de las carpas fue hasta 6.4 veces mayor que la concentración presente en el medio. La acumulación de nitrito en la sangre varía en las diferentes especies de

peces; los salmones y los bagres en general, acumulan grandes cantidades de nitrito en la sangre. En la trucha arcoiris, *Salmo gairdneri* se ha observado una

concentración de nitrito en el medio interno 60 veces mayor a la ambiental sin que se produzca mortalidad (Bath y Eddy, 1980), mientras que en *Micropterus salmoides* y

Lepomis macrochirus la incorporación de nitrito es baja (Palacheck y Tomasso, 1984; Eddy y Williams, 1987). La acumulación de nitrito en la sangre de los juveniles

C. idella es menor a la observada por Jensen *et al.* (1987) para *Cyprinus carpio* (5 veces la concentración presente en el medio), lo cual indica que estos ciprínidos

acumulan menores niveles de nitrito en el plasma respecto a los salmones y bagres.

El daño causado por el nitrito se relaciona con la incorporación de este ión al sistema circulatorio de los organismos. Bath y Eddy (1980) señalan que la sangre puede

actuar como un transportador de nitrito y que la capacidad de formación de metahemoglobina en peces depende de la habilidad de los organismos para acumularlo. En este estudio el porcentaje de metahemoglobina se incremento de manera potencial en relación a la cantidad de nitrito acumulado en el plasma. Resultados similares han sido reportados por Huey *et al* (1982) quienes señalan que la formación de metahemoglobina en las larvas de anfibio *Rana catesbiana* se incrementa de manera potencial respecto a la concentración de nitrito acumulada en el plasma de los organismos. De igual manera, Bath y Eddy (1980) refieren que la acumulación de nitrito se acompaña de un incremento de los niveles de metahemoglobina en el plasma. Por otra parte el aumento del ión nitrito en el plasma de los peces se acompañó de una disminución del ión cloruro. Resultados similares han encontrados en *C. carpio*. Jensen y colaboradores (1987) atribuyen la disminución de cloruro en el plasma a que la permeabilidad de las membranas es mayor para el cloruro que para el nitrito. Es importante considerar que el aumento en este trabajo del nitrito ocurre en una proporción donde la disminución del cloruro se da en una relación de 1:25. Esto sugiere que los mecanismos que determinan los flujos y niveles de nitrito y cloruro en el medio interno de las carpas no estan directamente relacionados, sugiriendo alteraciones complejas del intercambio de iones.

Con respecto al tiempo de acción del contaminante, los niveles más altos de nitrito y metahemoglobina en plasma se observaron después de 24 h de exposición y se

mantuvieron estables en el tiempo. La hemoglobina funcional es una molécula termodinámica inestable, sin embargo en su forma oxidada (metahemoglobina) es estable y fisiológicamente inactiva. El aumento en los niveles de metahemoglobina en peces y mamíferos se controla mediante el sistema metahemoglobina-reductasa (metahemoglobina \rightarrow hemoglobina) (Freeman *et al.*, 1983; Cameron, 1971). En este trabajo los niveles de nitrito y metahemoglobina en sangre alcanzaron un equilibrio después de 24 h de exposición al nitrito, lo cual puede atribuirse a la actividad de esta enzima reductora de la metahemoglobina.

La acumulación de nitrito y el porcentaje de metahemoglobina presente en el plasma de los peces no se relacionó directamente con la magnitud del daño fisiológico causado por el nitrito. Esto es, la disminución del consumo del oxígeno después de 96 h de exposición no corresponde a los máximos niveles de nitrito y metahemoglobina presentes en el plasma de los animales. Por ejemplo, el mayor porcentaje de metahemoglobina se observó después de 48 h de exposición al contaminante; sin embargo, la tasa metabólica después de este tiempo de exposición no fue diferente a la observada en el testigo. Es probable que durante las primeras horas de exposición al nitrito, el consumo de oxígeno pueda compensarse a través de otros mecanismos respiratorios del animal como incremento en los procesos ventilatorios y eficiencia circulatoria (Proseer, 1973). Esto puede explicar en base a que cuando la cantidad de hemoglobina disponible para captar oxígeno disminuye, el

consumo de oxígeno se mantienen constante al menos durante las primeras 48 h de exposición. Así mismo, es probable que los mecanismos de compensación respiratoria de los organismos no puedan mantenerse durante un período prolongado, debido al gasto energético que representan. Probablemente por esto el consumo de oxígeno de las carpas disminuyó unas horas después de alcanzar los máximos niveles de metahemoglobina en plasma.

En varios trabajos se observa el efecto causado por el nitrito, con base en la acumulación de este ión en el plasma y la consecuente formación de metahemoglobina; sin embargo, los resultados de este estudio subrayan la necesidad de medir respuestas conjuntas, que permitan caracterizar de mejor manera las alteraciones causadas por el nitrito.

Los procesos que se llevan a cabo en el medio acuático pueden ser alterados por factores externos; en particular, la nitrificación puede verse interrumpida por periodos cortos de tiempo, incrementándose la concentración de nitrito en el medio.

Este tipo de alteraciones agudas exige de procedimientos capaces de detectar y estimar las alteraciones subletales causados en los organismos. Esto destaca la importancia de evaluar los efectos causados por el nitrito en los organismos, en relación al tiempo de exposición. El presente trabajo proporciona información importante acerca del efecto tóxico causado por exposiciones agudas a nitrito sobre los juveniles de *C. idella*. Así con base en los resultados obtenidos es posible concluir

que los juveniles de *C. idella*, si bien son tolerantes al nitrito respecto a otras especies dulceacuícolas, pueden ser alterados por este contaminante. Por otro lado, la estimación de diferentes respuestas indicadoras de estrés a lo largo de la exposición permiten señalar que son las respuestas bioquímicas las que responden de manera más rápida al efecto tóxico, siendo indicadores tempranos de los efectos subletales causados. De esta manera particular se sugiere que tanto los niveles de nitrito en el plasma, como el porcentaje de metahemoglobina son indicadores apropiados para estimar de manera rápida y sencilla los posibles daños causados por incrementos bruscos de este contaminante en el agua. El uso de estos indicadores de estrés puede ser una herramienta importante que advierta de manera temprana sobre posibles daños funcionales causados por el nitrito en los peces.

Es importante destacar que con base en un mejor entendimiento de los efectos nocivos del contaminante sobre los peces a lo largo del tiempo es posible predecir los efectos causados por el nitrito con el fin de plantar alternativas para reducir los riesgos, una vez que incrementa su concentración en el medio:

LITERATURA CITADA

- ALCARAZ, Z. G. 1993. *Alteraciones causadas por el nitrito en la carpa herbívora Ctenopharyngodon idella*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 108 pp.
- ALCARAZ, Z. G., and ESPINA, S. A. 1993. Efecto de la temperatura y del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en la carpa herbívora *Ctenopharyngodeon idella*. (Pisces, Cyprinidae). *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 9 (1): 21-28.
- ALCARAZ, Z. G., and ESPINA, S. A. 1994. Effect of nitrite on the survival of grass carp. *Ctenopharyngodon idella* (Val) with relation to chloride. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 74-79.
- ALCARAZ, Z. G., and ESPINA, S. A. 1995. Aacute toxicity of nitrite in juvenile grass carp modified by weight and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55 (3): 473-478.
- ANTHONISIEN, A. C., R. C. LOEHR, T. B. S. PRAKASAM, and E.G. GRINATH. 1976. Inhibition of nitrification by amonia and nitrous acid. *J. W. P. C. F.*, 48 (5): 835-852.
- APHA. 1985. *Standard methods for examining water and waster*. 16 ed, Washington, DC.

ARREDONDO, J. F. y J. P. JUAREZ. 1986. *Manual para el cultivo de carpas.*

Dirección General de Acuicultura. Secretaría de Pesca. México, 121 pp.

ARREDONDO, J. L. 1987. *Policultivo Experimental de Ciprinidos Asiáticos de*

México. Tesis Doctoral. Instituto. Ciencias. Mar y Limnología. U.N.A.M. 129 pp.

BARTLET, G. R., A. R. SCHWANTE, and L. V. ADALBERTO. 1987. Studies on the

influence of nitrite on methemoglobin formation in amazonian fishes.

Comp. Biochem. Physiol., 86 C (2): 449-456.

BATH, R. N., and F. B. EDDY. 1980. Transport of nitrite across fish gills. *J. Exp.*

Zool., 214: 119-121.

BODANSKY, O. 1951. Methemoglobinemia and methemoglobin producing compounds.

Pharmac. Rev., 3: 144-196.

BOWSER, P. R., W. W. FALLS, J. VANZAND, N. COLLIER, and J. D. PHILLIPS. 1983.

Methemoglobinemia in channel catfish: Methods of Prevention. *Prog. Fish. Cult.,*

45 (3): 154-157.

BROWN, D. A, and D. J. MCLEAY. 1975. Effect of nitrite on methemoglobin of

juvenile rainbow trout. *Prog. Fish. Cult., 37 (1): 36-38.*

CAMERON, N. J. 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comp.*

Biochem. Physiol., 40 A: 743-749

- COLT, J., and G. TCHOBANOGLOUS. 1976. Evaluation of the short-term toxicity of nitrogenous compounds to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquacult.*, 8: 209-224.
- DAVALOS, A. P. 1992. *Alteraciones producidas por la exposición aguda al nitrito en la carpa herbívora, Ctenopharyngodon idella Val (Pisces, Cyprinidae)*. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencia, U.N.A.M. 39pp.
- DIAB, S., and M. SHILO. 1988. Effect of light on the activity and survival of *Nitrosomas sp* and *Nitrobacter sp* isolated from fish pond. *Israeli J. Aquat. Bamiqqed.*, 40 (2):50-56.
- EDDY, F. B., KUNZLIK A., and BATH N. 1983. Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and salmon, *Salmo salar* L in fresh water and in dilute sea water. *J. Fish. Biol.*, 23: 105-116.
- EDDY, F. B., and E. M. WILLIAMS. 1986. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.*, 156: 867-872.
- EDDY, F. B., and E. M. WILLIAMS. 1987. Nitrite and freshwater. *Fish. Chem. Ecol.*, 3:1-38.
- EPA, Environmental Protection Agency. 1989. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organism*. 2^a Ed. Cincinnati, Ohio.

ESPINA, S. A., and ALCARAZ, Z. G. 1993. Effect of nitrite on the respiratory response of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (val.) with relation to chloride.

Comp. Biochem. Physiol. 106 C (3): 761-764.

FREEMAN, L., T. L. BEITINGER, and D. W. HUEY. 1983. Methemoglobin reductase activity in phylogenetically diverse piscine species. *Comp. Biochem. Physiol.*,

75 B (1): 27-30.

GAINO, E., ARILLO, A., and MENSI, P. 1984. Involvement of the gill chloride cells of trout under acute nitrite intoxication. *Comp. Biochem. Physiol.*,

77A (4):611-617.

HICKLING, F. C. 1966. On the feeding process in the White Amur, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Zool.*, 148: 408-419.

HUEY, W. D., A. B. SIMCO, and D. W. CRISWELL. 1980. Nitrite induced methemoglobin formation in channel catfish. *Trans. Amer. Fish Soc.*,

109: 558-562.

HUEY, D. W., M. C. WOOTEN, L. A. FREEMAN, and T. L. BEITINGER. 1982. Effect of pH and chloride on nitrite-induced lethality in Bluegill (*Lepomis macrochirus*).

Bul. Environ. Contam. Toxicol., 28: 3-6.

JENSEN, B. F., A. N. ANDERSEN, and N. HEISLER. 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation

in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.*, 157: 533-541.

KROUS, S., BLAZER V, and MEADE, L. T. 1982. Effect of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout: the role of chloride cell. *Prog. Fish. Cult.*, 44 (3):126-130.

LEWIS M., and D. P. MORRIS. 1986. Toxicity of nitrite to fish: A review. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 115 (2) 183-195.

MAETZ, J. 1971. Fish Gills: Mechanisms of salt transfer in freshwater and sea water. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 262: 209-249.

PALACHEK, R. M., and J. R. TOMASO. 1984. Toxicity of nitrite to channel catfish (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Tilapia aurea*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1739-1744.

PERRONE, S. J., and T. L. MEADE. 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board. Can.*, 34: 486-492.

PROSSER, C. L. 1973. *Comparative Animal Physiology*. Saunders College Publishing. Philadelphia. 966 pp.

SCHWEDLER, T. E., and C. S. TUCKER. 1983. Empirical relationship between percent methemoglobin in chennel catfish and dissolved nitrite and chloride in ponds *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 117-119.

SPRAGUE, J. B. 1971. Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*,
5: 245-266.

TIETZ, W. 1976. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders. Philadelphia.
879-884.

TOMASSO, J. R., B. A. SIMCO, and K. B. DAVIS. 1979. Chloride inhibition of nitrite-
induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).
J. Fish. Res. Board. Can., 36: 1141-1144.

TOMASSO, J. R.; WRIGHT M. I., SIMCO B. A., and, KENNETH B. D. 1980. Inhibition
of nitrite induced toxicity in channel catfish by calcium chloride and sodium
chloride. *Prog. Fish-Cult.*, 42:144-146.

TUCKEY, W. J: 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley Pub. Company.
Massachusetts, U.S.A.; 1-21.

WATENPAUGH, E. D., and T. L. BEITINGER. 1986. Resistance of nitrite-exposed
channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to hypoxia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*,
37: 802-807.

WEDEMEYER, G. A., and W. T. YASUTAKE. 1978. Prevention and treatment of
nitrite toxicity in juvenile steel head trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res.*
Board. Can., 35:822-827.

ZAR, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 620 pp

TABLA 1. Consumo de oxígeno (mg O₂/h) de los juveniles *C. idella* expuestos durante 3, 6, 24, 48 y 96 horas a 5 mg/L de N-NO₂⁻ /L. Los datos corresponden a los elementos del diagrama de cajas en paralelo.

ELEM	Testigo	Tiempo de exposición, h				
		3	6	24	48	96
M	3.3	3.6	2.8	2.9	3.7	1.5
Hi	2.3	2.7	2.4	2.9	2.9	0.9
Hs	4.0	4.5	3.1	3.8	4.0	2.6
Ci	0.3	0.06	1.3	1.6	1.2	-1.4
Cs	6.6	7.3	4.1	5.2	5.7	4.9
I.C	(2.7, 3.9)	(2.9, 4.2)	(2.5, 3.1)	(2.6, 3.2)	(3.3, 4.0)	(0.95, 2.0)

M= Mediana

Hi= Cuartil inferior

Hs= Cuartil superior

Ci= Cota inferior

Cs= Cota superior

I.C.= Intervalo de confianza

Tabla 2. Niveles de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^-/\text{L}$) presentes en el plasma de *C. idella* del grupo testigo (T) y de los grupos expuestos a $5 \text{ mg de N-NO}_2^-/\text{L}$ en diferentes tiempos. Los valores medianos (M) y el intervalo de confianza (95%).

TIEMPO (h)	N- NO_2^-/L M	I.C.
Testigo	0.44	(0.42 , 0.46)
3	1.12	(0.61 , 1.63)
6	6.64	(3.76 , 9.38)
24	29.59	(21.43 , 37.74)
48	31.95	(24.84 , 39.05)
96	30.44	(23.57 , 37.30)

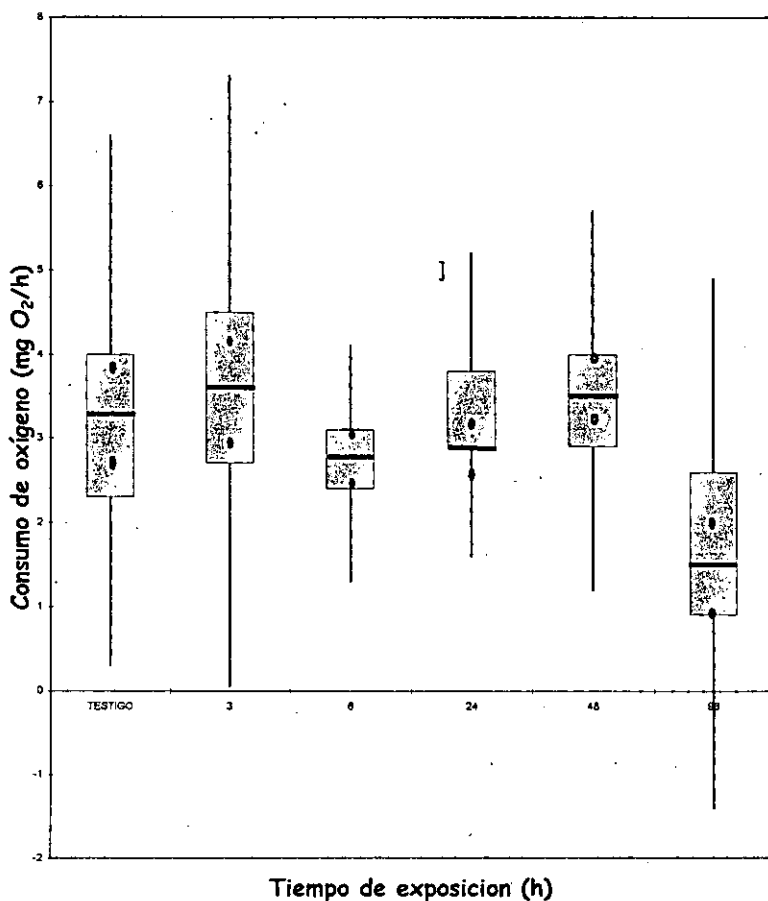
TABLA 3. Niveles de metahemoglobina (mHb, %) presente en el plasma de *C. idella* expuestos a 5 mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ en diferentes tiempos. Se señalan valores medianos (M) y su intervalo de confianza (95%).

TIEMPO (h)	mHb(%) M	I.C.
Testigo	2.5	(1.3 , 3.7)
3	25.2	(11.4 , 38.9)
6	40.0	(33.8 , 46.3)
24	66.6	(51.6 , 81.6)
48	84.6	(77.8 , 91.4)
96	65.5	(46.4 , 84.7)

TABLA 4. Niveles de cloruro (mg/L) presente en el plasma de los juveniles *C. idella* expuestos a 5 mg/L de N-NO_2^- /L en diferentes tiempos. Se señalan valores medianos (M) y su intervalo de confianza (95%).

TIEMPO (h)	Cloro M	I.C.
Testigo	3550	(3072 , 4028)
3	2929	(2383 , 3475)
6	2544	(2385 , 2703)
24	2840	(2370 , 3310)
48	2666	(2191 , 3141)
96	2426	(1920 , 2932)

FIG 1. Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2/\text{h}$) de los juveniles de *C. idella* expuestos durante 3, 6, 24, 48 y 96 h a 5 mg/L de N-NO_2^- . Los datos corresponden a los elementos del diagrama de cajas en paralelo.



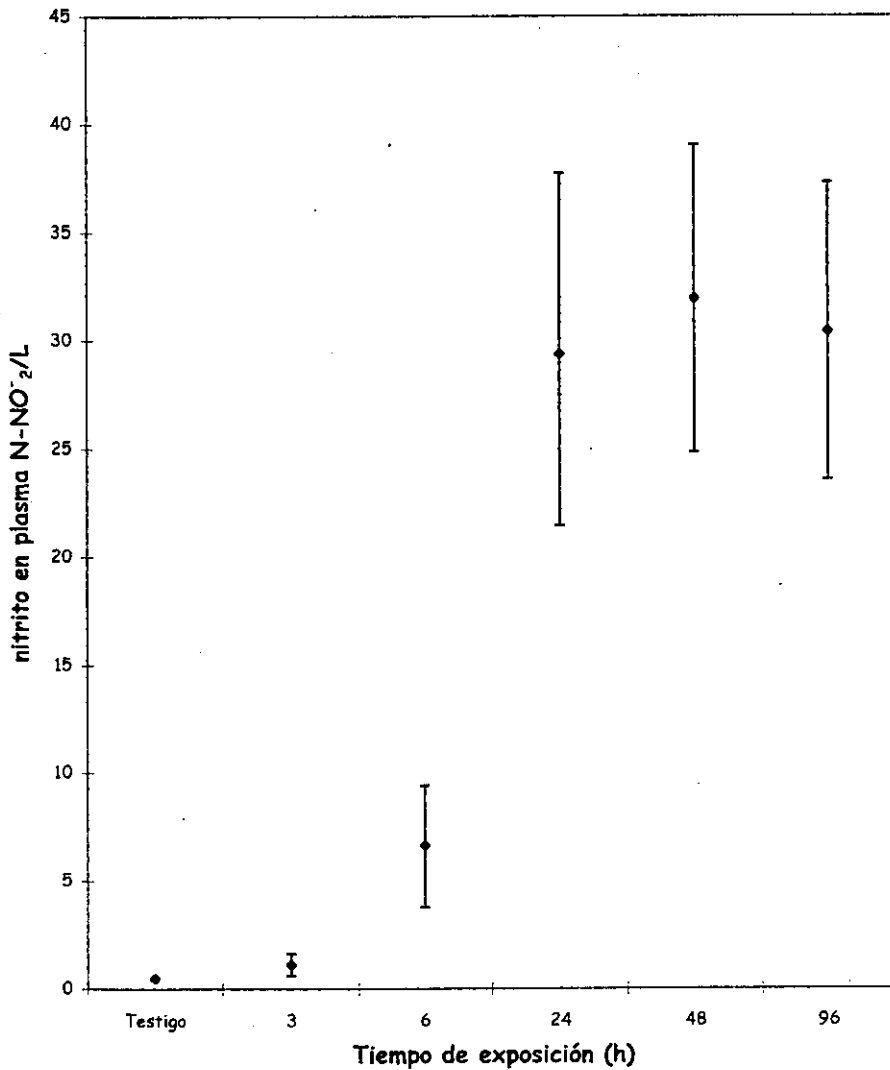


FIG 2. Concentración de nitrito en el plasma de los juveniles de la carpa herbívora *C. idella* expuestos a 5 mg de N-NO₂⁻/L por diferentes tiempos. Se grafican valores medianos y su intervalo de confianza (M, I.C. 95%)

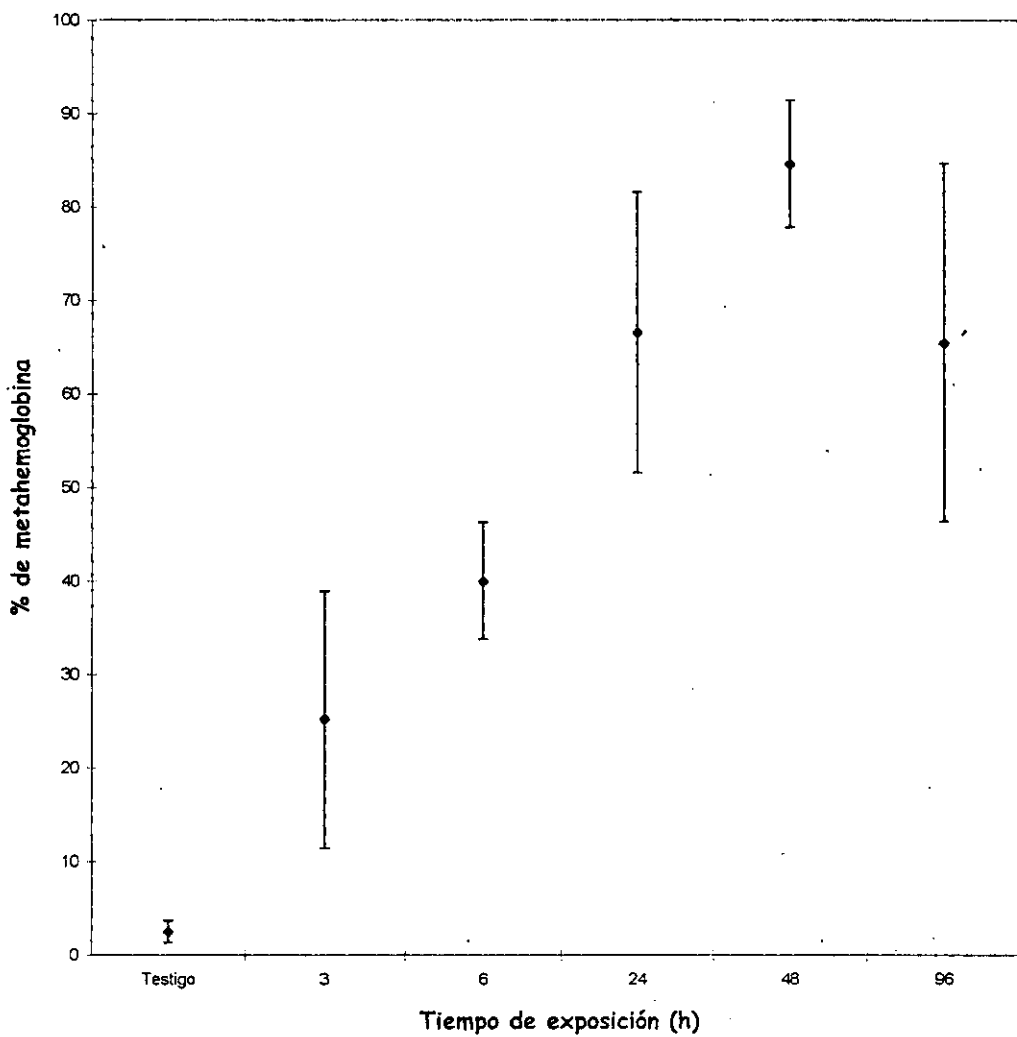


FIG 3. Metahemoglobina (%) en el plasma de los juveniles *C. idella* expuestas a 5 mg de $N-NO_2/L$ por diferentes tiempos. Se señalan valores medianos y su intervalo de confianza (M, I.C; 95%)

$$\text{LnY} = 1.12 + 0.49\text{LnX}; R^2 = 0.97$$

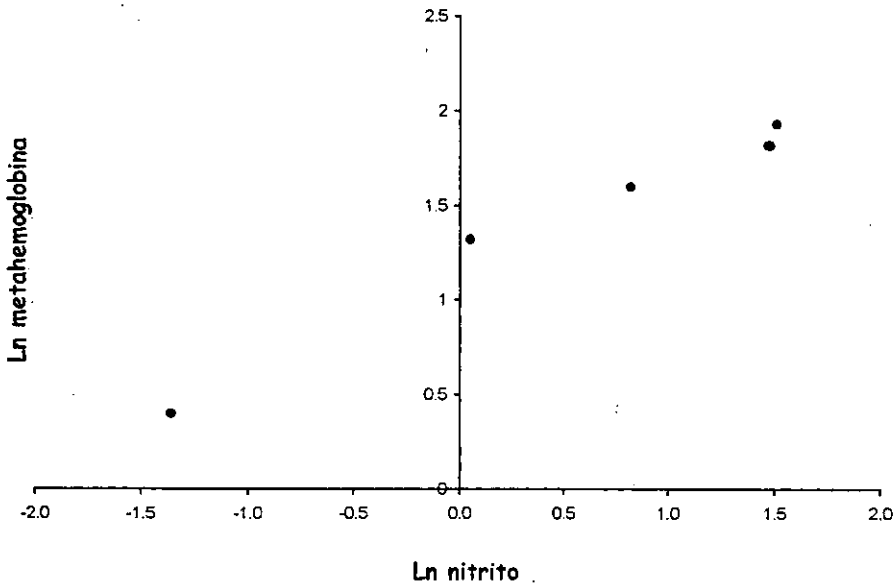


FIG. 4. Relación entre la metahemoglobina (%) y los niveles de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) presentes en el plasma de los juveniles de C. idella expuestos a 5 mg/L de N-NO₂⁻ por diferentes tiempos.

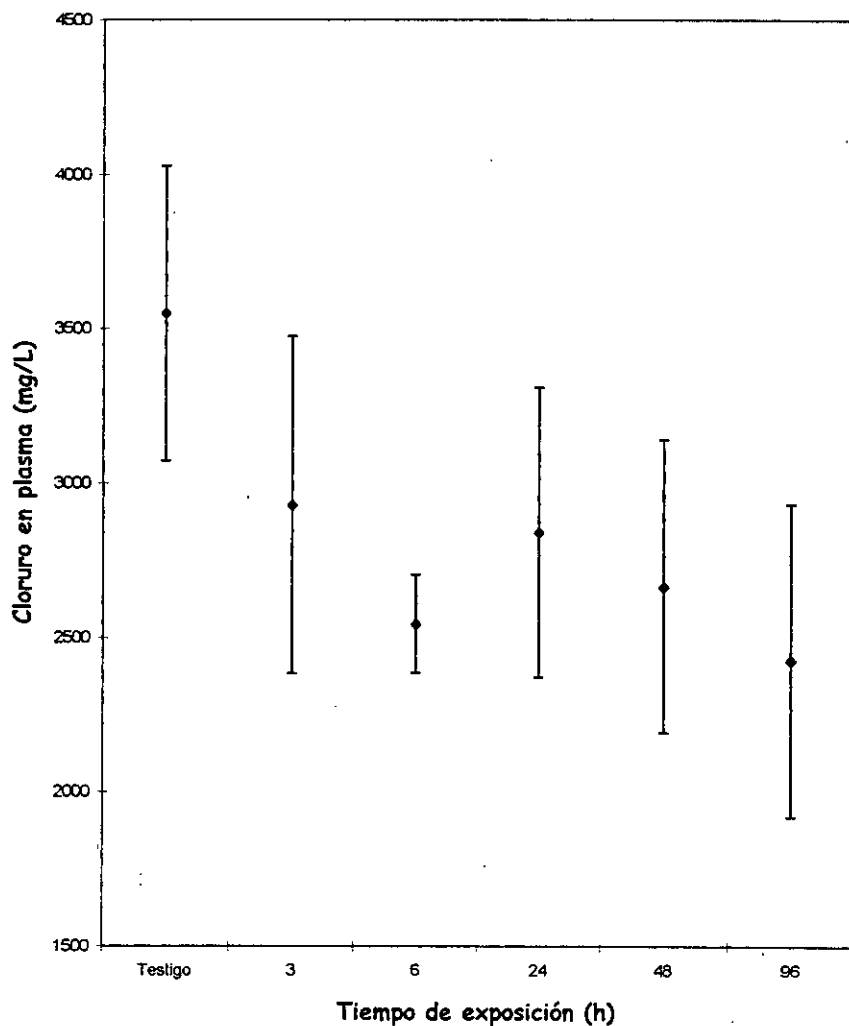


FIG 5. Niveles de cloruro (mg/L) en el plasma de los juveniles *C. idella* expuestos por diferentes tiempos a 5 mg de $N-NO_2/L$. Se señalan los valores medianos e intervalos de confianza (M, I.C.; 95%).