

204



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE  
GLUTATIÓN EN HÍGADO DE *Carassius auratus*  
COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL  
ESTUDIO DE CROMATOS GENOTÓXICOS EN EL  
AGUA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

BERNARDO FRANCISCO SOLIS CASTRO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

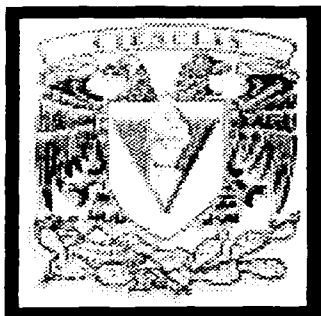
MÉXICO, D.F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

2002





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

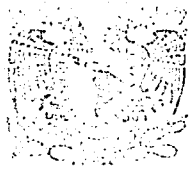


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
Determinación de los niveles de glutación en hígado de Carassius auratus como  
modelo experimental para el estudio de cromosomas genotóxicos en el agua.

realizado por Bernardo Francisco Salas Castro  
con número de cuenta 0655229-0, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología.  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

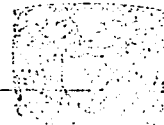
Atentamente

Director de Tesis	Dra. María Eugenia Ganschott Bonanarte	
Propietario	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez	
Propietario	M. en C. María Elena Durán Lizárraga	
Propietario	Dra. Regina Rosalva Montero Montoya	
Suplente	M. en C. Rosa Estelita Gascón Bazán	

Consejo Departamental de **BIOLOGÍA**

Dr. Pineda Marullos

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO DE  
DE BIOLOGÍA

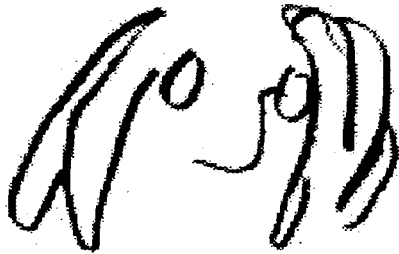
*ESTE PROYECTO FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR CONACYT 30950M*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda mi familia por su apoyo incondicional, así como a mis amigos que me han apoyado en estas diversas etapas desde el Aberdeen, CUAM, Ciencias y el laboratorio, puesto que cada uno de ustedes me ha aportado algo maravilloso su amistad y cariño.

BERN

GRACIAS



Quiero agradecer a la M. en C. Dora Patricia Guzmán Bazán por su asesoramiento en este trabajo.

*The known is finite, the unknown infinite; intellectually we stand on an islet in the midst of an illimitable ocean of inexplicability. Our business in every generation is to reclaim a little more land.*

*T. H. Huxley, 1887.*

*The time will come when diligent research over long periods will bring to light, things which now lie hidden.*

*Seneca; Natural Questions.  
Book 7, First Century.*

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
Marcadores biológicos	4
Marcadores de exposición	4
Marcadores biológicos de efecto	4
Marcadores biológicos de susceptibilidad	5
Biomonitores para ecosistemas	5
Organismos centinelas	5
<b>METABOLISMO DE XENOBIOTICOS</b>	<b>6</b>
<b>HÍGADO</b>	<b>7</b>
Radicales libres	9
Efectos biológicos de los radicales libres	10
Interacción de los radicales libres con proteínas	10
Interacción de los radicales libres con ácidos nucleicos	10
Interacción de los radicales libres con lípidos	11
Especies reactivas del oxígeno (ROS)	11
<b>MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA</b>	<b>11</b>
Descubrimiento del Glutación	12
Glutación	12
Formación de bilis	14
<b>EXCRECIÓN DE LOS METALES</b>	<b>14</b>
Cromo	16
Química ambiental	17
Absorción	17
Distribución y deposito	18
Excreción	18
Efectos biológicos del cromo y sus compuestos	19
Categorización de los compuestos del cromo de acuerdo a su carcinogenicidad	19
<b>DIAGNOSIS</b>	<b>20</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL Y METODO</b>	<b>23</b>
Determinación de GSH	25
Determinación de GSSG	25

Determinación de Proteínas (Bradford)	25
Determinación de la concentración de cromo en branquias por electro fotometría de absorción atómica	25
Análisis de datos	26
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>39</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>46</b>



## RESUMEN

El agua es el recurso natural no renovable más importante del planeta. Esta tiene una gran importancia debido a que además de ser esencial para la supervivencia de los organismos, interviene en la formación de continentes y es moderador del clima.

La contaminación del agua es uno de los problemas más importantes de la actualidad, debido a los daños que ocasiona en la salud de las personas y animales, así como el impacto que tiene en los ecosistemas. Tan solo en la Republica Mexicana el 86% de las aguas residuales están contaminadas, y solo el 40% recibe tratamiento (Jimenez, B., 2002).

Entre los contaminantes de origen antropogénico más importantes se encuentra el cromo hexavalente (Cr VI), la forma más tóxica del elemento metálico que se usa en una gran variedad de industrias (metalúrgica, peletera, manufactura de pigmentos, etc.). El Cr VI es genotóxico para plantas y animales además de ser carcinogénico, por lo que su presencia constituye un riesgo para el ambiente y la salud.

La presencia de contaminantes se puede determinar a través del uso de biomonitores, los que nos permiten obtener información directa acerca de la biodisponibilidad de los agentes tóxicos, sus efectos a nivel del material genético y su posible entrada a la cadena alimenticia. De la misma manera se pueden investigar otros procesos biológicos asociados a la respuesta tóxica, e identificar biomarcadores sensibles y relevantes de la exposición.

El glutatión (GSH) es un tripéptido celular cuya función es la de regular el estado redox y participar en el metabolismo de xenobióticos como los metales, interviniendo en su reducción y eliminación. El Cr VI es reducido a Cr III con la participación del GSH y en esta forma trivalente reacciona con blancos celulares como proteínas y ADN.

El objetivo de este trabajo fue el de explorar el desarrollo de metodologías de campo para evaluar el impacto fisiológico en órganos como el hígado y las branquias analizando los cambios en los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en hígado del pez *Carassius auratus* expuestos a diferentes concentraciones de dicromato de potasio (25,50 y 100 ng/ml) y en diferentes periodos (3 y 7 días). Al mismo tiempo se determinó la cantidad de cromo incorporada en las branquias y se compararon los resultados con otro marcador de efecto, como es la prueba de micronúcleos (MN), utilizada para evaluar la genotoxicidad de la exposición.

Los resultados obtenidos muestran que las carpas tratadas con dicromato de potasio acumularon el metal en branquias, pero esta acumulación no se vio claramente reflejada en un aumento del estrés oxidativo en hígado. Por otro lado los organismos expuestos presentaron características patológicas que podrían indicar exposición y daño por el dicromato.

Consideramos que este estudio podría considerarse como un ensayo piloto que demostró la factibilidad de implementar estas metodologías en *C. auratus*, así como en estudios de campo que involucren un mayor número de organismos o de especies.

## INTRODUCCIÓN

Nuestro planeta visto desde el espacio se diferencia de los demás del sistema solar, es predominantemente un planeta azul debido a que el agua cubre las tres cuartas partes de su superficie. Esta tiene una gran importancia debido a que interviene en la formación de continentes, es moderador del clima, y es esencial para la supervivencia de los organismos.

La vida sería imposible sin agua. Todas las formas, desde simples bacterias hasta los complejos animales y plantas multicelulares contienen agua. Existen gran cantidad de recursos acuáticos pero están distribuidos inequitativamente lo que provoca serios problemas de suministro. Debido a que su uso para un propósito determinado, disminuye la cantidad de agua disponible para otros, se originan serios conflictos y su adecuado reciclaje se hace cada vez más importante (Raven P. et al. , 1997).

La utilización de agua fresca se ha incrementado en todo el mundo, debido en parte, a que la población humana también ha aumentado y a que cada persona en promedio utiliza más agua. En 1996 un reportaje publicado en la revista Science, mencionó que la población humana utiliza el 54% del agua que fluye en ríos y lagos del planeta. Si la población mundial sigue creciendo como se estima, el agua dulce de los ríos y lagos podría terminarse en el siglo actual (Raven P. et al. , 1997).

En México el 86 % de las aguas residuales esta contaminada; y en ciudades con más de 50 mil habitantes se producen hasta 92 m<sup>3</sup>/seg de aguas negras (Jiménez, B., 2002).

Para enfrentar la creciente demanda de agua, se han construido depósitos artificiales y se ha aumentado el uso del agua reciclada. Debido a esto, resulta muy importante garantizar su calidad.

Para reciclar el agua se siguen los siguientes procedimientos:

1. Eliminación de las partículas suspendidas y en flotación por procedimientos mecánicos
2. Uso de microorganismos para descomponer la materia orgánica
3. El uso de procesos químicos, biológicos y físicos para eliminar metales pesados, virus, minerales y compuestos orgánicos.
4. En algunos casos se utiliza la cloración.

Las plantas de tratamiento, no siempre tienen la capacidad para procesar a toda el agua contaminada que llega de las ciudades, y que en la mayoría de los países, están conectadas a un mismo sistema de aguas residuales. En el país se procesa cerca del 40% de las aguas contaminadas, pero solo el 14% cumple con la normatividad mexicana (NOM) (Jiménez, B.2002).

La contaminación del agua subterránea por filtraciones de compuestos inorgánicos, que no son totalmente eliminados por la filtración que ocurre a través del suelo y rocas, es de interés, puesto que la purificación es muy costosa, tarda más tiempo y en algunos casos es prácticamente imposible.

Tanto el agua reciclada como la no reciclada presentan muy diversos tipos de contaminación (tabla 1), como los que se describen a continuación:

- 1) Contaminación por sedimentos, esta es causada por partículas de tierra que caen en el agua por erosión.

- 2) Drenaje, es el agua de desecho que fluye en el sistema hidráulico de las ciudades y las industrias
- 3) Agentes causantes de enfermedades, estos pueden ser los promotores de enfermedades como la tifoidea y el cólera, pueden estar presentes en el agua; estos provienen de los desechos de organismos infectados.
- 4) Nutrientes inorgánicos de plantas y algas, como el nitrógeno y el fósforo, los cuales pueden provenir tanto de desechos de animales y plantas, así como de los fertilizantes utilizados en la industria.
- 5) Compuestos orgánicos, la mayoría de los cuales son sintéticos, comúnmente tóxicos para los organismos acuáticos. Como la mayoría tienen estructuras complejas que son difíciles de degradar, estos compuestos pueden persistir por largos periodos en el medio.
- 6) Químicos inorgánicos, entre los que se encuentran contaminantes como los metales pesados arsénico, mercurio, plomo y cromo.
- 7) Substancias radioactivas en las que se incluyen los desechos de industrias como la minería y la refinería de metales radioactivos como también la contaminación causada por su uso.
- 8) Contaminación termal, la cual ocurre cuando se calienta el agua, producida durante algún proceso industrial, y es desechada en el desagüe.

Las fuentes de contaminación del agua provienen principalmente de dos fuentes, fuentes naturales (volcanes, incendios, etc.) y de actividades humanas. Estas están clasificadas en dos tipos: la primera es una fuente de contaminación puntual, en donde la descarga se da en puntos específicos (desagües). La otra es la contaminación no puntual o contaminación de afluencia, en la cual la entrada del tóxico se da en grandes áreas.

**Tabla 1. -Ecotoxicidad por contaminación de agua**  
Tomado de: Foth, H. 1999.

### CONTAMINACIÓN DEL AGUA

FORMA DE LIBERACIÓN	COMPUESTO	EFECTOS ECOTOXICO DE LA CONTAMINACIÓN
Drenaje	Metales pesados, detergentes	Toxicidad aguda en peces
Tiraderos en altamar	Químicos orgánicos e inorgánicos	Efectos letales agudos en organismos acuáticos
Liberación de desechos	Aceite	Efectos letales a través de la cadena alimenticia
Escurrimiento de tierra agrícola e industrial	Fungicidas, pesticidas, clorofenoles	Crecimiento de algas
Contaminantes industriales	Compuestos orgánicos sintéticos	Eutroficación de pequeños lagos
	Compuestos organocloricos	Ausencia de peces en lagos acidificados
	Radionucleótidos	Cambios topográficos en zooplankton y fitoplankton

## MARCADORES BIOLÓGICOS

Para investigar la presencia de agentes tóxicos biodisponibles en el ambiente (suelo, aire, agua) y para identificar sus posibles efectos, se utilizan distintas metodologías que permiten determinar de una manera más o menos precisa si han sido incorporados a los organismos y si causan algún daño o inhibición. A estos parámetros se los denominan indicadores o marcadores biológicos. Un biomarcador, es definido como la respuesta del sistema biológico al contaminante, el cual entra a los órganos o tejidos del organismo (Fowle y Sexton, 1992).

### MARCADORES DE EXPOSICIÓN

La exposición externa es la cantidad o concentración de material xenobiótico en el ambiente de un organismo, mientras que la dosis interna se refiere a la cantidad de xenobiótico que es transferida o absorbida. La dosis biológicamente efectiva, en términos generales, es la dosis interna que esta cuantitativamente relacionada con un efecto biológico; es decir la cantidad de material xenobiótico que ha interactuado con un receptor celular crítico o con un blanco celular o tisular en donde el efecto biológico se inicia. Dado que estos sitios de recepción son a menudo desconocidos, o no son accesibles al muestreo, es necesario frecuentemente un sitio o compartimento sustituto, para el cual la concentración ha sido correlacionada con la dosis biológicamente efectiva o con el efecto biológicamente identificable en el tejido blanco (Elinder et al. ,1987; NRC, 1989).

Existe una continua necesidad de desarrollar, a través de la investigación, los marcadores adecuados de dosis interna que reflejen la dosis biológicamente efectiva, puesto que la cantidad de xenobiótico que es realmente absorbida por el organismo es generalmente desconocida, y a veces puede estar dentro de los límites de detección (Wild, 1990; Gonsbatt et al. , 1994). La dosis biológicamente efectiva puede depender de las características individuales. Las variaciones individuales en características fisiológicas como el sexo, edad, flujo sanguíneo, permeabilidad de la membrana y la tasa respiratoria afectan significativamente la absorción y distribución de la sustancia química y sus metabolitos (Doull, 1980).

### MARCADORES BIOLÓGICOS DE EFECTO

Para la investigación en salud ambiental, los marcadores biológicos de efecto a un agente tóxico son considerados en el contexto de su relación con la salud del individuo (NRC, 1989; 1992) por lo que un efecto se define como:

- Una alteración en un tejido u órgano
- Un evento temprano en un proceso biológico predictivo del desarrollo de un padecimiento
- Un padecimiento o una enfermedad clínicamente identificable
- Una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero correlacionado con él y por lo tanto útil para predecir la evolución de un padecimiento.

Un marcador biológico de efecto puede ser cualquier cambio cualitativo y cuantitativo predictivo de un daño a la salud y que resulta de la exposición a un agente exógeno. Los marcadores de efectos biológicos tempranos incluyen alteraciones en las funciones de los tejidos blanco después de la exposición. Estos marcadores pueden ser dosímetros para guiar la intervención para reducir o evitar la exposición. Estas señales tempranas pueden también observarse en órganos o tejidos diferentes de los sitios que son críticos para la acción de la sustancia tóxica (NRC, 1989).

Un tejido afectado por una sustancia tóxica puede exhibir una función alterada aún si el organismo afectado no presenta manifestaciones clínicas o fisiológicas de ello (NRC, 1989; Ostrosky et al., 1991; Gonshebbatt et al. 1992; Burns y Munson, 1993).

## **MARCADORES BIOLÓGICOS DE SUSCEPTIBILIDAD**

Algunos marcadores biológicos indican acerca de la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a agentes ambientales. Una característica intrínseca o una enfermedad preexistente que aumente la dosis interna o la dosis biológicamente efectiva, o que amplifique el efecto en el tejido blanco, puede ser un marcador biológico de susceptibilidad incrementada (NIEHS, 1985; Omenn, 1986; Harden, 1990).

## **BIOMONITORES PARA ECOSISTEMAS**

Los organismos centinelas o biomonitores son organismos utilizados para dar una señal de alerta sobre un lugar en específico donde se puede dar una exposición a xenobióticos (Al-Sabti, K. 1993, Butterworth, F. 1995)

Las características principales de un biomonitor son:

1. De bajo costo
2. Proveen información rápida del medio
3. Responden de forma análoga al hombre a los tóxicos en el ambiente
4. De fácil manejo *in situ* y en el laboratorio
5. De una amplia distribución
6. Desarrollo de patologías por la exposición a los tóxicos

## **ORGANISMOS CENTINELAS**

Se refiere a organismos endémicos del lugar de exposición (Butterworth, F. 1995). Comparado al tradicional, estudio físico-químico de monitoreo ambiental, las ventajas primarias de animales centinelas es la información acerca de respuestas letales o subletales de organismos individuales o poblaciones, a exposiciones y estrés que pueden ser más rápidamente interpretados en términos de respuestas de comunidades o ecosistemas como la suma de todo el estrés.

Como ejemplo, podemos mencionar el acuerdo binacional en 1978, entre Canadá y Estados Unidos, llamado "Great Lakes Quality Agreement" (GLWQA), modificado por el protocolo de 1987, que especifica a la trucha de los lagos como indicador regional de la calidad del agua (Bulkley et al., 1989). La recolección sustentable de este pez provee medidas de productividad y de las condiciones de la pesca; mientras que las

concentraciones de los contaminantes en la carne indican exposición a químicos peligrosos y así como sus niveles en el ecosistema.

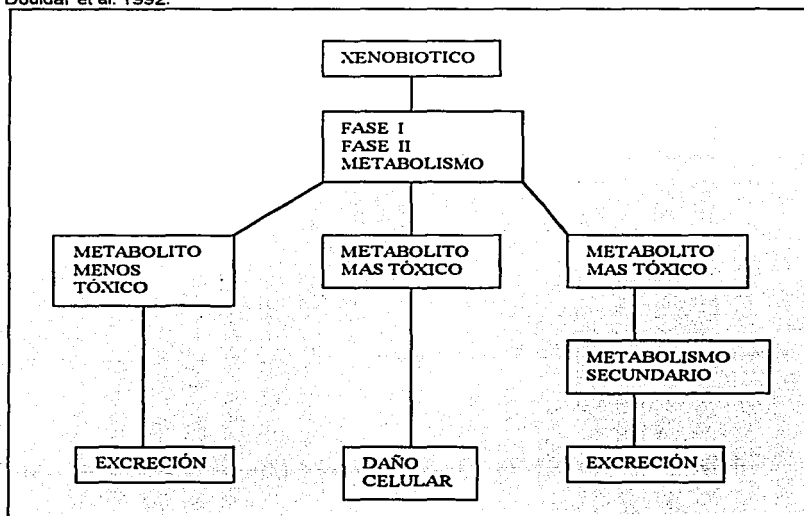
Desde punto de vista de la salud humana, además de los peligros que implica la degradación del ecosistema, la respuesta celular de los peces es similar a la de mamíferos, por lo que los cambios observados ante la presencia de agentes tóxicos permiten predecir efectos similares en la salud humana.

## METABOLISMO DE XENOBIOTICOS

Los procesos que siguen los agentes tóxicos cuando se incorporan a los organismos pueden describirse como absorción, metabolización, distribución y excreción (fig.1). A continuación describiremos las principales vías o formas en que se metabolizan los xenobióticos y las consecuencias que estos tienen para la fisiología de los organismos.

La mayoría de los xenobióticos que ingresan a los tejidos son lipofílicos, esta propiedad les permite atravesar las membranas lipídicas y ser transportados por lipoproteínas en los fluidos corporales. El metabolismo de los xenobióticos es llevado a cabo por enzimas no específicas cuya función esencial es volverlos más polares o hidrosolubles para poder ser excretados en la orina. Una molécula puede hacerse más polar por oxidación o hidrólisis. También su unión a otra molécula, lo que puede facilitar su excreción en la bilis o riñón (Doudar, S. et al. , 1992). El hígado es el principal órgano responsable del metabolismo de xenobióticos, además de ser un órgano blanco de metales de importancia económica (tabla 2) (Zimmerman, H.J., 1987).

**FIG. 1. -Posible resultado del metabolismo de xenobióticos**  
Tomado de: Doudar et al. 1992.



## HIGADO

En el ser humano es el mayor órgano del cuerpo y se encuentra situado en la cavidad abdominal, debajo del diafragma. Recibe la mayor parte de la sangre (cerca del 70%) de la vena porta y una porción menor a través de la arteria hepática. Por la vena porta llega todo el material absorbido por el intestino, con excepción de parte de los lípidos que son transportados por la vía linfática. En virtud de estas circunstancias el órgano esta en posición privilegiada para metabolizar y acumular metabolitos y además neutralizar y eliminar las sustancias tóxicas absorbidas. Esta eliminación se hace por la bilis, secreción exocrina de la célula hepática que tiene gran importancia en la digestión de los lípidos (Junqueira L.C., et al. , 1979).

Como se mencionó antes, es el principal órgano responsable del metabolismo de xenobióticos y es particularmente susceptible a lesiones por drogas o toxinas ambientales (Zimmerman, H.J., et al. 1986, 1987). Se conoce una amplia variedad de toxinas entre las que se incluyen hepatoxinas naturales como productos de las plantas (metabolitos de hongos y plantas) y minerales (Kraybill, H.R., 1974), productos químicos o de la industria farmacéutica (Anónimo, 1974), o productos industriales y materiales de desecho que contaminan el ambiente y a los cuales tienen acceso los seres humanos (Roullier C.H., 1964; Ridder, W.E. et al. , 1974). Las toxinas que son ingeridas, inhaladas y absorbidas, o producidas por las bacterias del estomago entran al hígado a través de la sangre portal (Douidar, S. et al. , 1992).

Las reacciones involucradas en el metabolismo de las sustancias están divididas en dos grupos secuenciales de reacciones denominadas fase I y II. Las reacciones de la fase I hacen un compuesto más polar por oxidación, reducción o hidrólisis (Jakoby, W.B., 1988). Las reacciones de la fase II modifican componentes, generalmente por conjugación de reacciones, para hacer a un compuesto más excretable en algunos casos para hacer el compuesto menos tóxico (Ziegler, D.M., 1988). La toxicidad hepática de la mayoría de los compuestos se debe principalmente a la fase I y en algunos casos a la fase II (Anders M.W., 1988). El glutatión y las enzimas involucradas en su síntesis y conjugación se consideran parte de las reacciones de la fase II.

Como consecuencia de estos eventos el metabolismo de un xenobiótico puede ocasionar que el agente se vuelva menos tóxico, que se vuelva un intermediario más tóxico con su posterior detoxificación, o puede ser bioactivado en un metabolito más tóxico que induzca daño celular Fig. 1.

**TABLA 2. - Zonas blanco de los metales.**

Tomado de: Williams, P. & J. Burson. 1985.

METAL	SISTEMA RENAL	SISTEMA NERVIOSO	HIGADO	TRACTO GASTRO INTESTINAL	SISTEMA RESPIRATORIO	SISTEMA HEMATOPOYETICO	HUESOS	SISTEMA ENDOCRINO	PIEL	SISTEMA CARDIOVASCULAR
ALUMINIO		Sí			Sí					
ARSENICO		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí		
BERILIO					Sí				Sí	
BISMUTO	Sí		Sí						Sí	
CADMIO	Sí	Sí		Sí	Sí		Sí			Sí
CROMO	Sí	Sí	Sí		Sí				Sí	
COBALTO		Sí		Sí	Sí			Sí	Sí	Sí
COBRE				Sí		Sí				
HIERRO		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí		
PLOMO	Sí	Sí		Sí		Sí			Sí	
MANGANESO		Sí			Sí					
MERCURIO	Sí	Sí		Sí	Sí					
NIQUEL		Sí			Sí				Sí	
SELENIO	Sí			Sí					Sí	
ESTRONCIO										Sí
TALIO	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí			Sí		
ESTAÑO(ORG)		Sí		Sí						
ZINC				Sí		Sí	Sí			



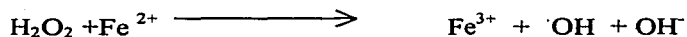
La toxicidad de una gran variedad de xenobióticos parece estar relacionada con su habilidad de inducir estrés oxidativo, caracterizado por el incremento de la producción de radicales libres y/o la estimulación de las respuestas al estrés celular oxidante (Kappus H., 1987; Horton and Fairhurst., 1987).

Si el daño es sostenido o es lo suficientemente intenso para sobrepasar las defensas celulares, el daño a las macromoléculas se puede acumular, originando una falla en la función celular, daño en las membranas y por ultimo la muerte celular. Las especies radicales libres formadas en las células por agentes exógenos o las respuestas endógenas generadas pueden atacar las proteínas, el DNA, y los lípidos insaturados, resultando en su pérdida de función y daño (Sevanian and McLeod., 1997. Por ejemplo, la peroxidación lipídica, es un marcador del estrés oxidativo celular, y ha sido reconocido como un contribuidor del daño oxidativo causado por los compuestos xenobióticos, así como procesos inflamatorios, daño por isquemia-reperfusión y enfermedades crónicas como arterosclerosis y cáncer (Dargel., 1992).

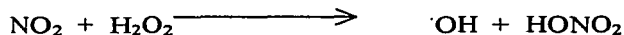
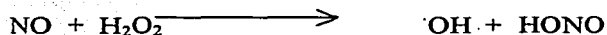
## RADICALES LIBRES

Los radicales libres son definidos como entidades químicas (átomos, moléculas, iones) que posee uno o más electrones no apareados. Un electrón no apareado ocupa un orbital atómico o molecular por si solo. La presencia de electrones no apareados produce radicales, diferentes de las características químicas específicas, con características físicas propias. Los radicales libres son paramagnéticos, y esta característica puede ser utilizada para detectarlos por medio de un espectrómetro de resonancia (ESR).

El  $H_2O_2$  es una fuente de radicales hidroxilos ( $\cdot OH$ ), generando las siguientes reacciones con los iones metálicos de transición (reacciones tipo "Fenton").



También como una reacción con varios agentes (contaminantes del aire como, NO, o,  $NO_2$ ).



Los radicales hidroxilo son agentes oxidantes muy reactivos, que puede reaccionar con una gran variedad de moléculas orgánicas (Younes, M., 1999).

## **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS RADICALES LIBRES**

Los efectos tóxicos hacia los órganos de una gran variedad de compuestos se piensa que son mediados por radicales intermediarios, generados durante su metabolismo. La gran toxicidad de los radicales libres es una consecuencia de su alta reactividad. En principio, los radicales libres pueden reaccionar virtualmente con todas las moléculas vitales de las células. Esto puede dar lugar a alteraciones metabólicas y estructurales, que bajo ciertas condiciones, originan la muerte celular. Los radicales libres también están asociados con procesos tóxicos más complejos, incluidos la toxicidad reproductiva y la tumorigénesis (Younes, M., 1999).

## **INTERACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES CON PROTEÍNAS**

Los radicales libres tienen una gran afinidad a las moléculas con carácter nucleofílico. Los radicales libres orgánicos y metabolitos electrofílicos pueden unirse covalentemente a las proteínas celulares. Esta unión puede dar lugar a una pérdida de la función biológica de la macromolécula, es decir, las enzimas no pueden hacer su función catalítica y los receptores específicos pueden quedar inactivados. Esta unión covalente de la proteína y un metabolito reactivo puede originar reacciones alérgicas, además de que la proteína modificada estructuralmente por un metabolito externo puede tener características antigénicas.

Los amino ácidos pueden sufrir daño oxidativo si llegan a interactuar con radicales libres de oxígeno. Las consecuencias de esas modificaciones proteicas oxidativas, es la pérdida de la función fisiológica. Como los radicales libres son capaces de iniciar reacciones en cadena, se pueden producir entrecruzamientos de proteínas solubles y/o de la membrana, dímeros o largos agregados de proteínas (Younes, M., 1999).

## **INTERACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES CON ÁCIDOS NUCLEICOS**

Los radicales intermediarios producidos durante el metabolismo de xenobióticos orgánicos pueden reaccionar con los ácidos nucleicos. Por ejemplo los radicales de oxígeno pueden dañar los ácidos nucleicos de dos formas. Los radicales hidroxilo pueden reaccionar con la estructura azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos, dando como resultado un corte de hebras y posiblemente el rompimiento del cromosoma. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la oxidación pueden modificar parte del azúcar o de diferentes bases.

El daño oxidativo a los ácidos nucleicos puede producir la muerte celular (principalmente apoptosis). Las modificaciones oxidativas del DNA pueden representar un proceso de iniciación tumoral, además de que los radicales libres de oxígeno y los ROS pueden estar implicados en la promoción tumoral (Younes, M., 1999).

## INTERACCIÓN DE LOS RADICALES LIBRES CON LÍPIDOS

Los radicales libres pueden reaccionar con los lípidos de varias formas, por un lado los radicales libres de los metabolitos, particularmente los lipofílicos, pueden unirse covalentemente a los lípidos; por otro lado, estos pueden ocasionar una reacción oxidativa en cadena. En el caso de membranas fosfolipídicas, la destrucción peroxidativa de sus ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) generalmente resulta en una alteración de la estructura de la bicapa y de la función de las membranas celulares y/o subcelulares. Este no-apareamiento funcional puede dar lugar a la muerte celular (Younes, M., 1999).

## ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos del metabolismo normal. El término ROS implica radicales del oxígeno (superóxido.  $O_2^-$ ; radical hidroxilo. OH; radical peróxilo  $ROO^\cdot$ ; radical alcoxilo  $RO^\cdot$ ) así como otros radicales particulares, algunos que pueden ser convertidos en radicales (ozono  $O_3$ ; peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ ). Las ROS son reactivos fisiológicos. Su producción puede ser incrementado por algunos compuestos, por agentes físicos, o manipulaciones, o por ciertos estados patológicos. Causan modificaciones a las bases (oxidación y desaminación), pérdida de bases (sitios AP), rupturas sencillas y dobles de hebras y entre cruzamientos de DNA. (Ritcher. , 1997). Los ROS no únicamente dañan el DNA sino que también pueden inhibir las reacciones de reparación (Hu et al. , 1995).

## MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA

Las células poseen múltiples agentes protectores que actúan para limitar el daño de los radicales libres. Estos incluyen especies enzimáticas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa; y especies no enzimáticas como el glutatión (GSH), el ascorbato, el  $\beta$ - caroteno, el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido retinoico (Halliwell y Gutteridge, 1985).

Todos los organismos vivos han desarrollado sistemas de protección para minimizar los eventos que resultan de la bioactivación de químicos incluyendo xenobióticos y productos oxidativos del metabolismo celular del oxígeno molecular. El mayor sistema de protección es dependiente del tripéptido GSH.

## DESCUBRIMIENTO DEL GLUTATIÓN

En 1888, De Rey-Pailhade obtuvo evidencia de que las células contienen una sustancia responsable de la reacción para formar ácido sulfhídrico, cuando células de levadura eran sembradas en azufre elemental, estas formaban ácido sulfhídrico (Mannervik, B. et al. 1985). Se demostró que esta sustancia se encuentra presente en músculo e hígado de res, cerebro e intestino delgado del borrego, músculo de pescado, clara de huevo y en la punta de los espárragos( Mannervik, B.). De Rey-Pailhade nombro a esta sustancia *philothion* ( del griego *philos* = amor y *thion* =azufre), además sugirió que *philothion* contenía un hidrógeno lábil y cisteína (De Rey-Pailhade et al. 1888). Esta conclusión fue basada en los experimentos de Heffter, que indicaban la presencia del sulfhidrilo. Se sugería que el resultado positivo se debía a la presencia de cisteína ( Heffter, A. 1908).Hopkins descubrió que el compuesto responsable podía extraerse con agua. Inicialmente pensó que era un dipéptido de glutamato y cisteína; y modifico el nombre de *philothion* a *glutathione*. Hopkins y después Kendall, de manera independiente encontraron que el péptido contenía glicina. La estructura final del glutati6n fue deducida y confirmada después de su síntesis como L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina (Harington, C.R. et al. 1935; Du Vigneaud, V. et al.1936).

## GLUTATI6N

El glutati6n (GSH) es un tripéptido del glutamato, la cisteína y la glicina que contiene una inusual unió6n  $\gamma$ -péptido entre glutamato y cisteína.. Esta unió6n previene que el GSH sea hidrolizado, por la mayoría de las peptidasas. Se oxida menos fácilmente que sus predecesores, cisteína y  $\gamma$ -glutamilcisteína y se encuentra en la mayoría de las células de mamíferos y algunas células de procariontes. Su residuo de cisteína provee el tiol intracelular más abundante (0.2-10mM) que resulta un agente nucleofílico importante para la detoxificación de metabolitos electrofílicos y de agentes oxidativos producidos metabólicamente (Keterer et al., 1983). Este tripéptido puede proteger las macromoléculas del tejido de los metabolitos de la alquilaci6n, arilaci6n, acilaci6n o peroxidados, generados por la bioactivaci6n de metabolitos potencialmente hepatotóxicos.

Si el glutati6n es eliminado o marcadamente reducido en el hígado, la hepatotoxicidad regularmente aumenta.

El GSH tiene muchas funciones celulares importantes como son:

La regulaci6n de actividades enzimáticas

En la síntesis de varias moléculas ( DNA, RNA, y ciertos eicosanoides) (T6züm and Gallon 1979; Dalton et al. 1986; Alsher 1989; Dolphin et al. 1989; Wingate et al. 1988; Hérouart et al. 1993; Kulik and Storz 1994).

Está involucrado en el metabolismo y en mantener la parte tiol de las proteínas y compuestos de bajo peso molecular, como la cisteína y la coenzima A.

Mantener el ácido ascórbico en su forma reducida.

Reacciona enzimáticamente a través de la familia GSH S-transferasa o no enzimáticamente con compuestos tóxicos para formar conjugados de GSH. (Mannervik et al. 1989; Timmerman 1989).

Protege contra el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden ser formadas durante el metabolismo normal.

Dependiendo del tipo celular, la concentración intracelular del glutatión se mantiene en un rango de 0.5-10 mM (Silverblatt, F. et al. 1970). En mamíferos, las concentraciones en el hígado son 4-8mM, se encuentra principalmente reducido en GSH y menos del 5% se encuentra en su forma de glutatión disulfuro (GSSG). Esto es debido al estatus redox del GSH el cual es mantenido por la enzima glutatión reductasa intracelular (GR) que utiliza el NADPH +H<sup>+</sup> como cofactor.

**TABLA 3. -Características del glutatión citosólico que son importantes contra la toxicidad química.** Tomado de: Hodgson, E. and Smart R. C. 2001(3).

- Alta concentración intracelular (0.5-10 mM)
- Síntesis rápida por enzimas citosólicas en respuesta a la disminución química
- Transporte fuera de la mayoría de las células de GSH, glutatión conjugado, y GSSG vía transportadores de membrana plasmática
- Un ciclo redox del glutatión dinámico para mantener un radio GSH/GSSG cerca del 50-100
- Proteína tiol/GSH cerca del 2-4:1
- Alta concentración de glutatión transferasas (cerca del 0.1mM)

**TABLA 4. -Características del glutatión mitocondrial que son importantes contra la toxicidad química.** Tomado de: Hodgson, E. and Smart R. C. 2001(3).

- Compartimiento fisiológico diferente al del glutatión citosólico
- Alta concentración en la matriz (10-12mM)
- Únicamente síntesis de glutatión extramitocondrial
- Transporte de GSH; ausencia de transporte de GSSG dentro y fuera de la membrana mitocondrial interna
- Ciclo redox activo del glutatión que mantiene un radio GSH/GSSG 25-50
- El radio de proteína tiol/GSH es de cerca de 10
- Actividad de la glutatión transferasa

## FORMACIÓN DE BILIS

La bilis es una secreción de los hepatocitos. Es un producto de transporte activo de ciertos compuestos polares y de transporte pasivo de otros solutos y agua el cual sigue una concentración o gradiente electroquímico. Su función principal es la de emulsionar lípidos sin embargo un buen número de sustancias entre las que se encuentran algunos metales pasan a formar parte de la bilis. Los compuestos con un peso mayor a 300 son conjugados y excretados en la bilis. Los conjugados de GSH comúnmente son excretados en grandes cantidades en la bilis, especialmente cuando este es formado en el hígado (Ketterer y Mulder, 1990).

Aproximadamente el 80% de la bilirubina que se almacena en la vesícula biliar proviene de la hemoglobina de los eritrocitos senescentes. En anfibios, reptiles, aves y en algunos peces, la biliverdina es el producto final del hemo metabolismo. Por otra parte los mamíferos y ciertos peces convierten la biliverdina en bilirubina antes de ser excretada (Chowdhury, J. et al. 1994).

## EXCRECIÓN DE LOS METALES

La eliminación de los metales se realiza a través de varias vías.

**Sistema renal:** Esta ruta es la que se encarga de eliminar la mayor cantidad de los metales, se transportan unidos a las proteínas plasmáticas y aminoácidos y son filtrados en el glomérulo dentro del fluido del túbulo renal. (Pounds, J.1985).

**Tracto gastrointestinal:** es una segunda ruta importante para la excreción. Los metales unidos a las células de las paredes del tubo digestivo, son eliminados con las heces fecales. (Pounds, J.1985).

**Circulación entero-hepática:** Los metales absorbidos pueden ser también secretados dentro del tracto intestinal, por medio de la bilis, las secreciones pancreáticas o la saliva. Los metales excretados en la bilis pueden ser reabsorbidos en el torrente sanguíneo durante su paso por el tracto intestinal y regresar al hígado para su re-excreción por medio de la bilis (circulación entero-hepática). La excreción biliar puede verse afectada por sustancias químicas, medicamentos y por daños preexistentes que promueven o reducen la secreción de bilis por el hígado. (Pounds, J.1985).

**Rutas menores:** estas comprenden la eliminación a través del cabello, las uñas, la saliva, la transpiración, el aire exhalado, la lactancia y la exfoliación de la piel. Algunos tejidos pueden secuestrar metales tóxicos en formas que pueden presentar actividad biológica (Pounds, J.1985).

Los carcinógenos metálicos enlistados en la tabla 5 causan daño genético en ensayos a corto plazo, mutagénesis en bacterias, levaduras y en cultivo de células de mamíferos. El significado de estos resultados no es claro porque algunos de los metales considerados como no cancerígenos también inducen daño genético en estos sistemas de prueba.

**TABLA 5. -Metales no radioactivos causantes de tumores en el hombre y animales experimentales. iv= intravenosa; sc=subcutanea; ip=intraperitoneal; im=intramuscular . Tomado de: Douidar S.M. et al. (1992)**

METAL	Ruta de exposición o administración	TIPO DE TUMOR
BERILIO	INHALACION	CARCINOMA PULMONAR
CADMIO	SC, IM,INTRATESTICULAR	SARCOMA, LEYDIGIOMA, TERATOMA
CROMO	SC, IM,IP, INTRAOSEO,INTRAPLEURAL,INTRABRONQUIAL	SARCOMA, CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS
COBALTO	SC, IM,INTRAOSEO	SARCOMA
COBRE	INTRATESTICULAR	TERATOMA
HIERRO	SC, IM	SARCOMA
PLOMO	SC, DIETA	CARCINOMA DE CELULAS RENALES, ADENOMA RENAL, LINFOMA
NIQUEL	SC,IM,INHALACION	CARCINOMA ANAPLASTICO, ADENO CARCINOMA, SARCOMA, CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS
SELENIO	DIETA	HEPATOMA, SARCOMA, ADENOMA TIROIDEO
TITANIO	IM	FIBRO SARCOMA, HEPATOMA, LINFOMA
ZINC	INTRATESTICULAR	LEYDIGIOMA, SEMINOMA, CORIONEFITELIOMA, TERATOMA

## CROMO

El cromo (Cr) es un metal que tiene un peso molecular de 52. Está generalmente presente como un sólido, en donde se encuentra como óxido ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) y combinado con fierro y oxígeno, en el mineral cromita. Se descubrió en 1762, en el cromato de plomo ( $\text{PbCrO}_4$ ) (Albert, L., 1997).

Las propiedades químicas y toxicológicas del cromo difieren marcadamente dependiendo de la valencia del metal. El Cr se encuentra en su estado metálico (valencia 0) y en las valencias +2 hasta +6, pero únicamente las formas trivalente (+3) y hexavalente (+6), son comunes. El cromo +2 se oxida rápidamente a la forma +3, y los estados +4 y +5 son únicamente encontrados como intermediarios en la conversión de +3 a +6.

**TABLA 6. - Compuestos más comunes del cromo en la industria y el medio ambiente. Geller, R.J.(1992).**

ALGUNOS COMPUESTOS COMUNES DE CROMO	
<u>Divalente (<math>\text{Cr}^{+2}</math>)</u>	
Cloruro de Cromo	$\text{CrCl}_2$
Sulfato de Cromo	$\text{CrSO}_4$
<u>Trivalente (<math>\text{Cr}^{+3}</math>)</u>	
Oxido crómico	$\text{Cr}_2\text{O}_3$
Sulfato crómico	$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$
<u>Hexavalente (<math>\text{Cr}^{+6}</math>)</u>	
Trióxido de cromo	$\text{CrO}_3$
Acido crómico	$\text{H}_2\text{CrO}_4$
<u>Anhidridos del ácido crómico:</u>	
Cromato de sodio	$\text{Na}_2\text{CrO}_4$
Cromato de potasio	$\text{K}_2\text{CrO}_4$
<u>Dicromatos:</u>	
Dicromato de sodio	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Dicromato de potasio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Dicromato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

El Cr se utiliza principalmente en tres industrias: metalúrgica, química y de metales refractarios (Tabla 7).

**TABLA7.-Industrias que utilizan el cromo**  
Geller, R.J.(1992).

- Anodización
- Manufactura de cinescopios para televisores
- Grabado del cobre
- Trabajo del vidrio
- Litografía
- Platería, niquelado, cromado



- Trabajo de metales
- Purificación del aceite
- Fotograbado
- Fotografía
- Uso del cemento
- Trituración del acero
- Producción Textil
- Peleteras
- Soldado de acero inoxidable

En Estados Unidos y México se han encontrado zonas con una alta concentración de cromo en las aguas subterráneas (Perlmutter et al. ,1970; Deutsch, M., 1972; Sollenwerk et al. , 1985; Guttierrez et al.1986). En el centro de México en la zona del Valle de León, Guanajuato, se ha detectado contaminación por Cr de las aguas subterráneas (Rodríguez et al.1991), debido a causas antropogénicas y naturales (Armienta et al. 1995). En estas zonas los desechos tóxicos de cromo que se utilizan en las industrias (principalmente peleteras) no tienen un tratamiento adecuado y son desalojadas en el drenaje municipal, las cuales fluyen al río León y de ahí a la presa Mastrazo, en donde las aguas son utilizadas para la agricultura principalmente, así como para otras actividades (Armienta et al. 1993,2000).

## QUÍMICA AMBIENTAL

En general, los efluentes industriales que contienen Cr se incorporan a las aguas y, eventualmente, llegan al océano, la forma química dependerá de la presencia de materia orgánica en las aguas, ya que, si se encuentra presente en grandes cantidades, el Cr(VI), se reducirá a su forma de Cr(III), el cual se podrá absorber en las partículas o formar complejos insolubles. Estos pueden permanecer en suspensión cerca del sitio de entrada al ambiente, ser transportados al océano, o precipitarse y ser incorporados a los sedimentos. El Cr también entra al ambiente a partir de todos los procesos de combustión, incluyendo los incendios forestales (se cree que el Cr que se produce es de forma hexavalente). Para la población en general, las principales fuentes de exposición ambiental al cromo son el aire, el agua potable y los alimentos que contienen este metal.

Los efluentes de industrias que utilizan Cr, pueden ser fuente importante para la contaminación de mantos freáticos. En nuestro país se ha documentado la presencia de niveles importantes de Cr III (Armienta et al. 2000). En teoría, el Cr(VI) puede persistir en este estado, en aguas con bajo contenido de materia orgánica, mientras que, al pH natural de las aguas, el Cr(III) formará compuestos insolubles, a menos que se formen complejos (Albert, L.1997).

## ABSORCIÓN

El Cr puede entrar al organismo humano por tres rutas principales: inhalación, ingestión y por absorción dérmica. El Cr puede absorberse por vía respiratoria, cuando se inhala aire que lo contiene. El Cr (0,II y III) es pobremente absorbido. Si las sales de Cr se depositan

en los pulmones, pueden llegar a la sangre, pero no se ha detectado ningún efecto sistémico (Tambershaw, I.R., et al.1977; Proctor, N.H., et al.1988). Los compuestos de Cr(VI) se absorben más rápido que los compuestos de Cr(III) y pueden distribuirse sistémicamente, (Albert, L.1997). La absorción por vía digestiva ocurre como resultado de la ingestión de alimentos o agua que contengan derivados del metal. En el tracto gastrointestinal de los humanos se absorbe menos del 1% de cromo (III) y cerca del 25% de cromo (IV) (Albert, L.1997; Baselt, R.H., et al. 1989). La forma química, la solubilidad en agua del compuesto y el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal modifican la velocidad de absorción (Albert, L.1997).

El Cr(III) que se encuentra en los alimentos puede unirse a otros compuestos que facilitan su absorción a partir del estómago y los intestinos. El Cr(VI) por otro lado, al ser absorbido, es transformado rápidamente en Cr(III) por los jugos gástricos (Albert, L.1997; De Flora, S., et al. 1987).

El Cr no se absorbe comúnmente a través de la piel (Sawyer, H.J. 1988), aunque algunos estudios han demostrado que sales hexavalentes se absorben a través de la piel intacta (Albert, L.1997). La exposición a Cr(VI) ocurre principalmente a través de su ingestión a través del agua dulce, y la comida. Ciertamente, muchos componentes de la comida tienen propiedades reductoras, por lo que disminuirían la posibilidad de absorción de la forma hexavalente. Ha sido demostrado que el Cr(VI) es eficientemente reducido cuando el agua es utilizada para preparar bebidas (Kerger et al. , 1996). El tracto respiratorio es el único blanco para la carcinogénesis del Cr(VI) en los individuos que realizan alguna actividad en la cual se presentan niveles en el aire más altos de los que se encuentran en la naturaleza (IARC, 1990; De Flora y Wetterhahn. , 1989).

## DISTRIBUCIÓN Y DEPÓSITO

La pequeña fracción de Cr que se absorbe en el intestino pasa a la sangre, de donde se distribuye a los diferentes órganos. El Cr(III) una vez que ha sido absorbido, no pasa fácilmente las membranas celulares, sino que se une a la transferrina (proteína del plasma que transporta fierro). El Cr(VI) después de ser absorbido pasa rápidamente a los eritrocitos en donde se transforma en Cr(III). El Cr(III) es ampliamente distribuido en el organismo, representando la mayor parte del Cr en el plasma y los tejidos.

El complejo proteínico del Cr(III) se deposita principalmente en médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñones e hígado.

## EXCRECIÓN

La excreción del Cr ocurre principalmente a través de la orina y no hay una retención importante en los órganos. En los seres humanos, el riñón excreta aproximadamente el 60% del Cr(VI), en forma de Cr(III). Alrededor del 10% de las dosis absorbidas de cromo se excretan por medio de la bilis. La mayor parte del Cr ingerido en agua y alimentos, nunca se absorbe y es eliminado mediante las heces fecales (Albert, L.1997).(Figura 2).

## EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL CROMO Y SUS COMPUESTOS

De Flora et. al. (1990; 1995) han revisado más de 700 reportes de datos experimentales de por lo menos 32 compuestos de Cr, en al menos 130 sistemas experimentales, con diferentes objetivos o blancos celulares. La gran mayoría de los resultados obtenidos con 17 compuestos de Cr(VI) fueron positivos. La actividad fue menos frecuente con compuestos de Cr(VI) de baja solubilidad. En contraste los 12 compuestos de Cr(III) generaron datos negativos principalmente. Además las cantidades de los compuestos de Cr(III) para generar respuestas positivas, fueron del orden de dos a tres veces la cantidad de Cr(VI) para generar los mismos resultados.

Existe suficiente evidencia que indica que los compuestos con Cr(III) y Cr(VI) son genotóxicos y potencialmente capaces de iniciar el cáncer. Desafortunadamente, los experimentos a corto plazo no contribuyen a elucidar qué compuestos de Cr(VI) poseen estas propiedades en los organismos, ya que depende de la biodisponibilidad del Cr(VI), como una función de la solubilidad de los compuestos y de los mecanismos toxicocinéticos y metabólicos.

La relevancia toxicológica diferencial de estas especies de Cr depende del hecho de que el Cr(VI), en la forma de anión cromato, es fácilmente tomado por el canal general de aniones proteicos o la banda de proteína 3. En contraste, las membranas celulares son normalmente impermeables a los cationes del Cr(III), los cuales pueden penetrar a la célula únicamente bajo condiciones específicas (De Flora y Wetterhahn, , 1989).

Los niveles de Cr en la sangre y orina son biomarcadores de exposición, que reflejan la cantidad de Cr absorbida por el cuerpo.

### Categorización de los compuestos de Cr de acuerdo con su carcinogenicidad

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), el Cr(III) no es considerado carcinogénico (WHO, , 1988). Las evaluaciones de la IARC (Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer) dicen que no hay suficiente evidencia sobre la carcinogenicidad en humanos por Cr (0) y Cr (III). También basados en los resultados de estudios en animales, la evaluación general fue que el Cr (0) y el Cr (III) no eran clasificables como carcinógenos humanos (grupo 3) (IARC, 1990).

En contraste el Cr (VI) ha sido conocido como un carcinógeno ocupacional por más de un siglo (Langard, , 1990). La IARC consideró que existe suficiente evidencia en humanos acerca de la carcinogenicidad de los compuestos de Cr (VI). La evaluación global fue que el Cr (VI) es un carcinógeno para los humanos por lo que se lo colocó en el grupo 1. Estas evidencias son de tipo epidemiológicas y por estudios carcinogénicos en animales experimentales (1). La Agencia de Protección Ambiental de E.U.A.(USEPA) ha clasificado también al Cr (VI) en el grupo A, por ser un carcinógeno humano (USEPA, , 1992).

## *C. auratus* COMO MODELO EXPERIMENTAL



Superclase: Gnathostomata  
Clase: Osteichthyes  
Subclase: Actinopterygii  
Orden: Cypriniformes  
Suborden: Cyprinoidei  
Familia: Cyprinidae  
Especie: *Carassius auratus*

**Características distintivas:** El pez dorado posee una aleta dorsal larga con 15-21 rayos con una espina serrada dura al principio de las aletas dorsal y anal. Su línea lateral es completa, con 25-31 escamas en series laterales. La cuenta de sus dientes faríngeos es: 0,4-4,0 (Robison and Buchanan, 1988; Page and Burr, 1991).

**Especies similares:** La carpa común, *Ciprinuss carpio*, la cual tiene barbas (el pez dorado no tiene). Además la carpa común posee de 32-38 escamas a lo largo de series laterales al contrario del pez dorado que tiene de 25-31. El pez dorado puede ser diferenciado de otros cyprinidos por la presencia de una espina, serrada rígida al inicio de la aleta anal y dorsal. Los cyprinidos no-nativos asiáticos tienen una espina no aserrada, rígida en esta posición (Robison and Buchanan, 1988; Page and Burr, 1991).

**Diferencias sexuales:** durante el celo, los machos están adornados con formaciones perlinas.

**Reproducción y fecundidad:** Los machos son más pequeños que las hembras, y se observan puntos de apareamiento en sus cabezas y costados durante la época de celo (Riehl and Baensch, 1991). El pez dorado tiene muchas épocas de celo. Ellos pueden reproducirse en aguas con temperaturas de 12-13 °C. Las hembras depositan entre 191,000 y 403,000 huevos. El tamaño del huevo es de 1mm, aunque el tamaño puede llegar a variar. El pez alcanza la madurez sexual entre el primer y tercer año (Robinson and Buchanan, 1988).

**Tolerancia a la salinidad:** Generalmente se encuentra en aguas dulces. Murai y Andrews (1977) encontraron que las larvas eran intolerantes a agua con mas de 2ppm.

*Tolerancia a la temperatura:* Generalmente se encuentra en aguas de Asia, puede soportar muy bien temperaturas de agua fría. En USA se encuentra en aguas templadas (Lee et al. , 1980; Robinson and Buchanan, 1988).

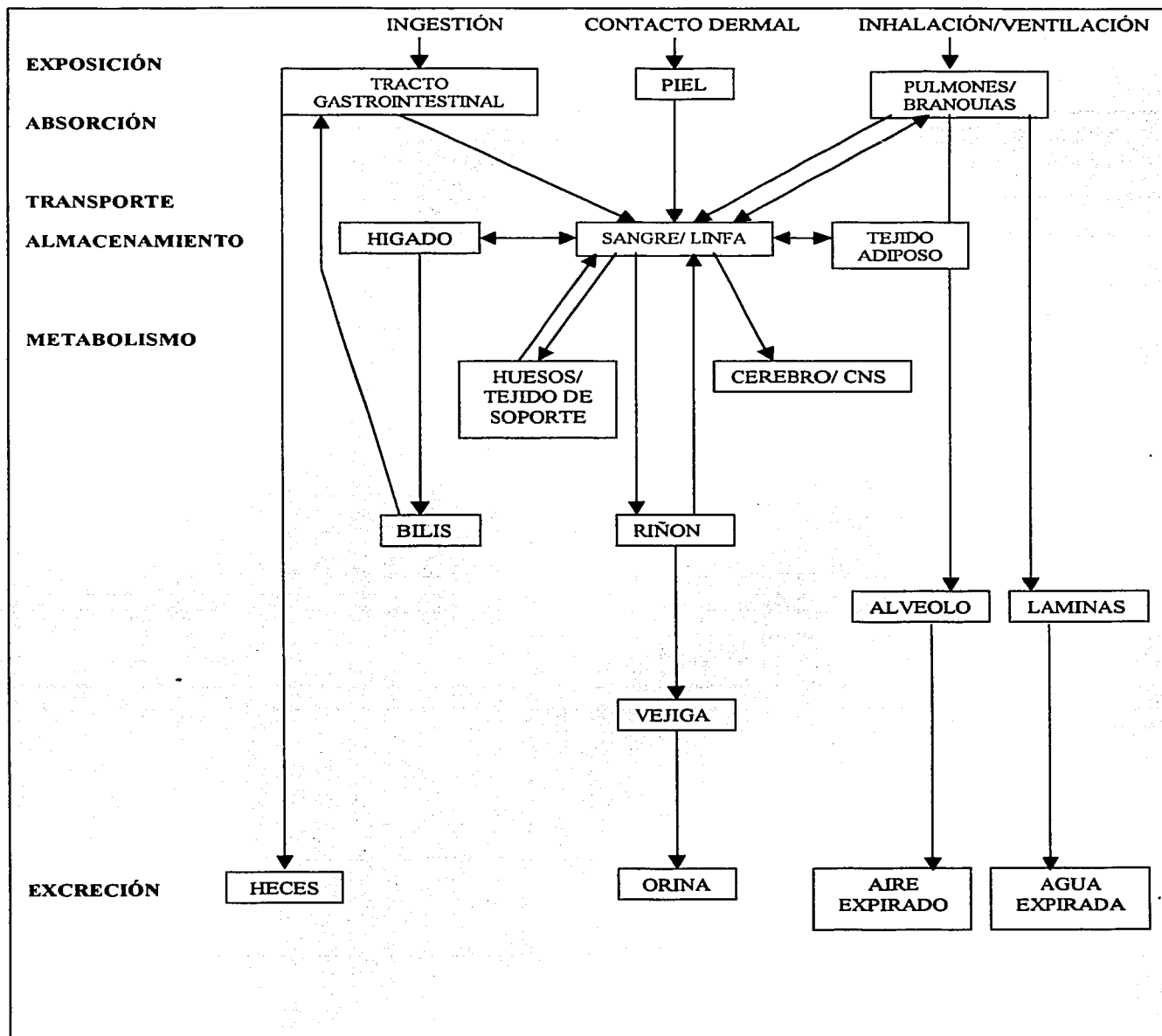
*Interacciones tróficas:* Este pez ha demostrado ser omnívoro, con preferencia por el fitoplancton y macrófitos. Los juveniles se alimentan de zooplancton y larvas de insectos (Lee et al. , 1980). Richardson et al. (1995) describió al pez dorado como un herbívoro bentónico, con especies salvajes alimentándose principalmente de plantas, detritos y chironómidos.

*Talla máxima y edad:* Estas especies generalmente crecen de 120-220 mm, con un máximo de 410mm (Lee et al. , 1980, Page and Burr, 1991). El tiempo de vida es de 6-7 años, con un máximo de 30 años en cautiverio (Robinson and Buchanan, 1988).

*Distribución:* Es nativo de la Republica de China, Taiwan, sur de Manchuria, Corea, Japon, Hainan, y del río Lena del este de Europa hasta la cuenca del río Amur y de los ríos Tim y Poronai de Sakhalin (Berg in Courtney et al., 1984). En Estados Unidos ha sido colectado en todos los estados excepto Alaska (Courtenay et al. , 1984; Courtenay et al. , 1991). Fue el primer pez no nativo en establecerse en América y su presencia se ha comunicado desde finales de 1600 (DeKay in Courtney et al, 1984; Page and Burr, 1991).

*Pesquería:* El pez dorado es uno de los más importantes y populares de los peces de acuario, es utilizado para alimento vivo de otros peces en cautiverio, y como carnada, además como una herramienta de control de algas y pastos acuáticos en pequeños estanques (Robinson and Buchanan, 1988; Matlock, 1990). El pez dorado se encuentra en aguas someras, poco profundas, deficientes de oxígeno, aguas templadas o frías, con poca vegetación y fondos fangosos (Lachner et al. , 1970; Lee et al. , 1980; Page and Burr, 1991). La población varía según la presencia o ausencia de depredadores (Richardson and Whoriskey, 1992). Son muy tolerantes a la contaminación ambiental, más que algunas especies nativas (Robinson and Buchanan, 1988; Page and Burr, 1991). Se puede aparear con la carpa común dando una descendencia fértil (Page and Burr. 1991).

FIG 2. -Rutas de absorción, translocación, y excreción en especies animales.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento en la contaminación de ambientes acuáticos por diferentes desechos industriales ha probado tener efectos en el ecosistema y en la salud humana (Al-Sabti et al. , 1990,1991,1994,1995). Los peces habitantes naturales de estos sitios, responden al nivel celular de manera similar a otros vertebrados (Washburn & Di Giulio, 1989; Yang et al. ,1990; Stegeman & Lech, 1991; Bunton T.E. 1999), por lo que su respuesta ante la presencia de agentes tóxicos permiten predecir efectos en otros niveles de la escala trófica y del ecosistema. Por ejemplo, la trucha de lago (*Salvelinus namaycusk*) es empleada como centinela de efectos acumulativos para los Grandes Lagos, monitoreando sus efectos en el consumo humano y la integridad de los ecosistemas acuáticos.

Nos interesa explorar la posibilidad de desarrollar metodologías de campo que nos permitan evaluar el impacto fisiológico en algunos órganos como el hígado, por su papel en el metabolismo de xenobióticos. Sabemos que la presencia de agentes tóxicos inicia respuestas metabólicas como las de fase I y II provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El glutatión parece representar la primera fase de defensa contra los metales pesados en el ambiente acuático (Canesi L. et al. 1999). Asimismo, las variaciones de los niveles de GSH celular se asocian con estrés oxidativo, el cual inicia el encendido de cascadas enzimáticas en respuesta a este estrés ambiental. Por ello nos interesa investigar si la presencia de distintas concentraciones de cromo VI en el agua, altera los niveles basales de GSH, GSSG y cambios en su relación en una forma relacionada con el nivel de exposición.

## HIPÓTESIS

La relación GSH/GSSG en el hígado de *C.auratus* será afectada por la presencia de dicromato de potasio en el agua. El cambio en la relación GSH/GSSG dependerá de la dosis absorbida de cromo

## OBJETIVOS

- Evaluar los niveles de GSH y de GSSG en el hígado de ejemplares de *C. auratus* expuestos a distintas concentraciones de dicromato de potasio
- Evaluar los niveles de cromo en tejido branquial como indicador de la dosis absorbida.
- Correlacionar los niveles de GSH, GSSG, de glutatión total y de la relación GSH/GSSG con las dosis de dicromato utilizadas
- Correlacionar los niveles de GSH, GSSG, de glutatión total y de la relación GSH/GSSG con el cromo acumulado en las branquias

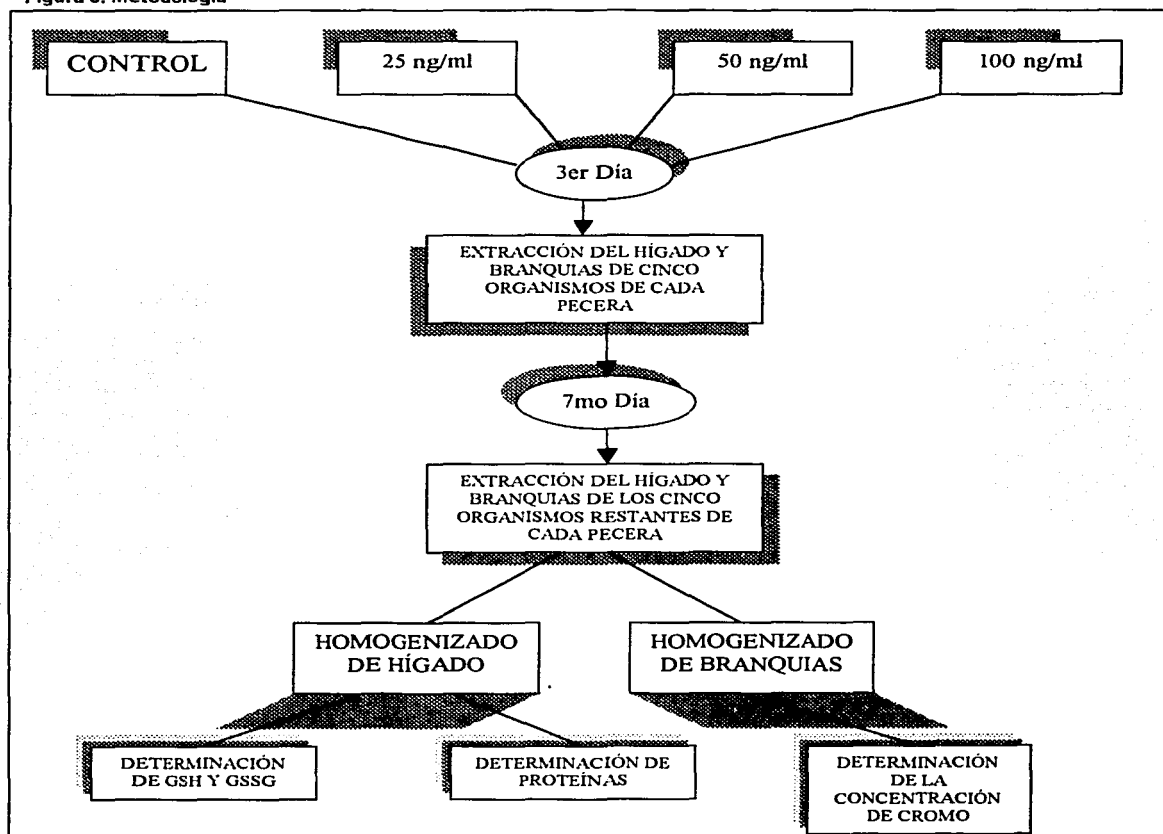
## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 carpas *Carassius auratus* colectadas en el criadero Eugenio Jáuregui de Cuautla, Mor. Los peces se mantuvieron a temperatura ambiente, y con periodos de luz y

oscuridad naturales en peceras de fibra de vidrio con oxigenación constante. No se aclimataron. Las carpas se escogieron de manera aleatoria y se pusieron en 4 peceras de 100 lts. , con 10 animales cada una. Al inicio del experimento se les agregó a tres de las peceras una dosis única de  $K_2Cr_2O_7$  (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración final de 25, 50 y 100 ng/ml. Los peces que no recibieron dicromato se utilizaron como organismos testigos. Estas dosis están dentro del rango de las concentraciones de cromo encontradas por Armienta M. A. (2001) en un monitoreo de aguas residuales en el valle de León, Guanajuato, y por debajo de los límites recomendados en otros países para el agua utilizada en irrigación (0.1mg/l) (Armienta et al. , 2001). A los tres días se sacrificaron 5 animales de cada pecera, removiéndose los tejidos branquiales y hepáticos que se guardaron en nitrógeno líquido. A los siete días se extrajeron las branquias e hígado de los 20 organismos restantes (Figura 3). No se determinó la concentración de cromo en el agua al final del experimento.

Para realizar las determinaciones bioquímicas los tejidos se pesaron (anexo3) y se homogeneizaron en una solución tampón de 0.1 M fosfato de sodio 0.005 EDTA, pH=8. Los homogenizados se separaron en alícuotas de 2 ml que se conservaron en nitrógeno líquido.

Figura 3. Metodología





## DETERMINACIÓN DE GSH

Para esta determinación se tomó una alícuota de los homogenados de hígado y se precipitaron las proteínas con 10% de Ácido Tricloroacético (TCA). Posteriormente, la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada. Se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante que se incubó en 1.85 ml de buffer 0.1 M fosfato de sodio, 0.005 EDTA pH=8 y 100 $\mu$ l de OPT (o-ftalaldehido, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), durante 15 minutos en la oscuridad. El GSH reacciona de manera específica con el OPT en un medio a pH 8, dando origen a un compuesto altamente fluorescente que puede ser activado a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm ( Hissin y Hilf, 1976).

## DETERMINACIÓN DE GSSG

Se tomaron 100  $\mu$ l del sobrenadante anterior que se incubaron para bloquear el GSH, con 40  $\mu$ l N-etilmaleimida (NEM), durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 860 $\mu$ l de NaOH 0.01 M (pH=12.0). Se tomaron 200  $\mu$ l de esta muestra a los que se les añadió 1.7 ml de NaOH 0.01M (pH=12) y 100  $\mu$ l de OPT. La mezcla se agitó y se incubó por 15 min en la oscuridad, para luego hacer la lectura de la fluorescencia a 420nm de emisión con 350nm de excitación. El GSSG reacciona de manera específica con el OPT, dando origen a un compuesto altamente fluorescente que puede ser activado a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm (Hissin y Hilf, 1976).

El valor de GSH y GSSG de las muestras se obtiene por interpolación de la fluorescencia obtenida, con los valores de curvas generadas con valores conocidos de GSH y GSSG.

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente. Se tomaron 5 $\mu$ l de muestra de hígado a los que se le agregaron 99.5  $\mu$ l de NaCl y por último el reactivo de Bradford (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), se dejó incubar por dos minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La concentración de proteínas se determinó por interpolación de los valores de absorbancia obtenida en una curva con valores conocidos de albúmina. (Bradford, M.1976).

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CROMO EN BRANQUIAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATOMICA

Se pesaron las branquias para posteriormente ser homogenizadas en solución tampón de fosfatos. El homogenado se colocó en un vaso de precipitados en donde se digirió con 4 ml de Ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). La muestra se calienta con un mechero hasta evaporación total. El sedimento se resuspendió en 2 ml de ácido clorhídrico (1.5%) y se mezcló para posteriormente aforar a 10ml con HCl, se mezcló y se filtró. El material se puede guardar

en un congelador a  $-20^{\circ}$  C. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro atómico de masas utilizando una flama de óxido nitroso de acetileno a una longitud de 357.9 nm (modificado de C. Veillon & K.Y.Patterson, 1985).

## ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se obtuvieron promedios y desviaciones estándar de los valores obtenidos por lote o concentración. Para comparar el efecto de la exposición entre los diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de una sola vía (KruskalWallis) con una prueba *post hoc* de Dunn. Para la significación se estableció un valor menor o igual al 5%. Además se realizó un análisis de correlación lineal. Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas Sigma Stat (Jandel Scientific, USA, 1994) e Inplot (GrafiPad, USA, 1995).

## RESULTADOS

No se observó mortalidad entre los organismos y todos llegaron vivos al final de la exposición. Durante la disección se pudo observar la presencia de pequeños coágulos de sangre entre los filamentos branquiales de algunos de los ejemplares así como el cambio de coloración de la bilirubina en la vesícula biliar de los peces expuestos a cromo, que pasó de un verde claro en los testigos a un verde oscuro, en los tratados (Tablas 8 y 9).

### DÍA 3

CONCENTRACIÓN DE $K_2Cr_2O_7$ (ng/ml) EN EL MEDIO	Proteínas hepáticas mg/ml	PROMEDIO DE COAGULOS EN BRANQUIAS	COLORACIÓN DE LA VESÍCULA
0	32± 8	0%	VERDE
25	12± 5	60%	OBSCURA
50	35± 15	60%	OBSCURA
100	18± 3	100%	OBSCURA

**TABLA 8.-** Promedio de la concentración de proteínas en homogenado de hígado (Bradford), y observaciones de las características físicas de la vesícula biliar y branquias de 20 individuos después de tratamiento con dicromato de potasio en 3 días

### DÍA 7

CONCENTRACIÓN DE $K_2Cr_2O_7$ (ng/ml) EN EL MEDIO	Proteínas hepáticas mg/ml	PROMEDIO DE COAGULOS EN BRANQUIAS	COLORACIÓN DE LA VESÍCULA
0	18± 4	0%	VERDE
25	19± 4	40%	OBSCURA
50	26± 7	100%	OBSCURA
100	21± 3	40%	OBSCURA

**TABLA 9.-** Promedio de la concentración de proteínas en homogenado de hígado (Bradford), y observaciones de las características físicas de la vesícula biliar y branquias de 20 individuos después de tratamiento con dicromato de potasio en 7 días

En la tabla 10 se observan los valores promedio de la determinación del contenido de glutatión reducido (GSH) en el hígado de los peces expuestos a dicromato de potasio a tres y siete días, en los que se puede observar, especialmente en la gráfica de la figura 5, una ligera disminución de la concentración de GSH a siete días con respecto al control.

<b>GSH (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> de prot.)</b>				
CONCENTRACIÓN DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (ng/ml) EN EL MEDIO	3 DÍAS Prom $\pm$ EE		7 DÍAS Prom $\pm$ EE	
<b>0</b>	0.5	$\pm 0.1$	1.1	$\pm 0.2$
<b>25</b>	0.9	$\pm 0.1$	0.96	$\pm 0.3$
<b>50</b>	1.4	$\pm 0.6$	0.8	$\pm 0.1$
<b>100</b>	1	$\pm 0.3$	0.9	$\pm 0.2$

TABLA 10 . - Relación de GSH observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días (LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)

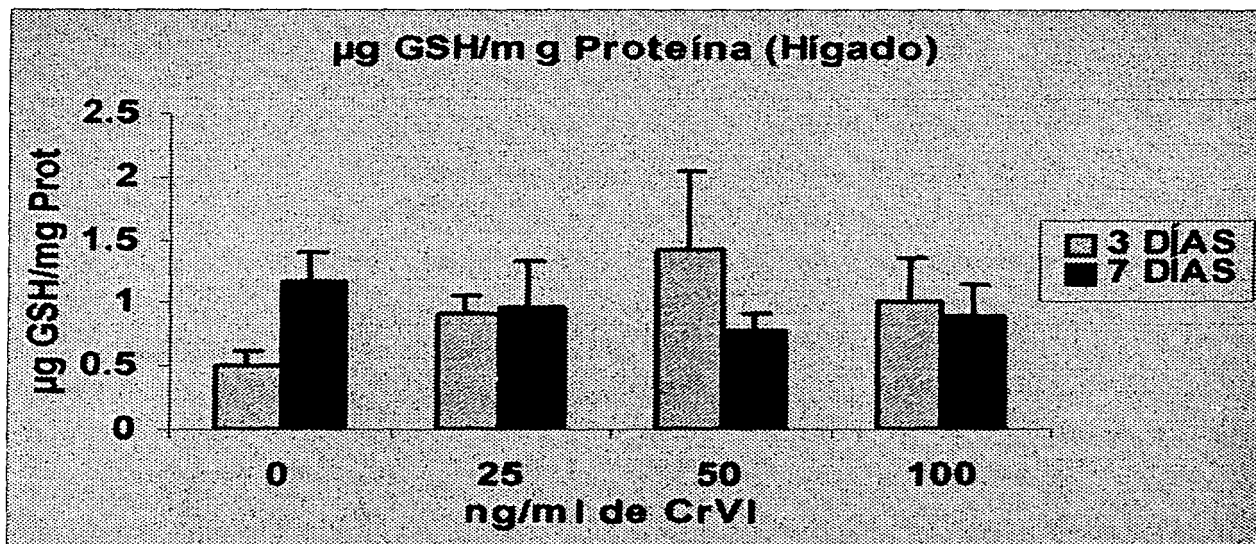


FIG5.- Relación de GSH observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días (LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)

En la determinación del glutatión oxidado (GSSG) se obtuvieron los valores promedio presentados en la tabla 11 y figura 6. Se puede observar que al aumentar la concentración

de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) en el agua tiende a aumentar la cantidad de GSSG a tres días y a siete días tiende a disminuir con respecto al control.

GSSG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de prot.)		
CONCENTRACIÓN DE $K_2Cr_2O_7$ (ng/ml) EN EL MEDIO	3 DÍAS Prom $\pm$ EE	7 DÍAS Prom $\pm$ EE
<b>0</b>	0.0035 $\pm$ .001	0.0111 $\pm$ .002
<b>25</b>	0.006 $\pm$ .001	0.012 $\pm$ .004
<b>50</b>	0.013 $\pm$ .004	0.01 $\pm$ .004
<b>100</b>	0.007 $\pm$ .002	0.0033 $\pm$ .001

TABLA 11.- Relación de GSSG observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días (LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)

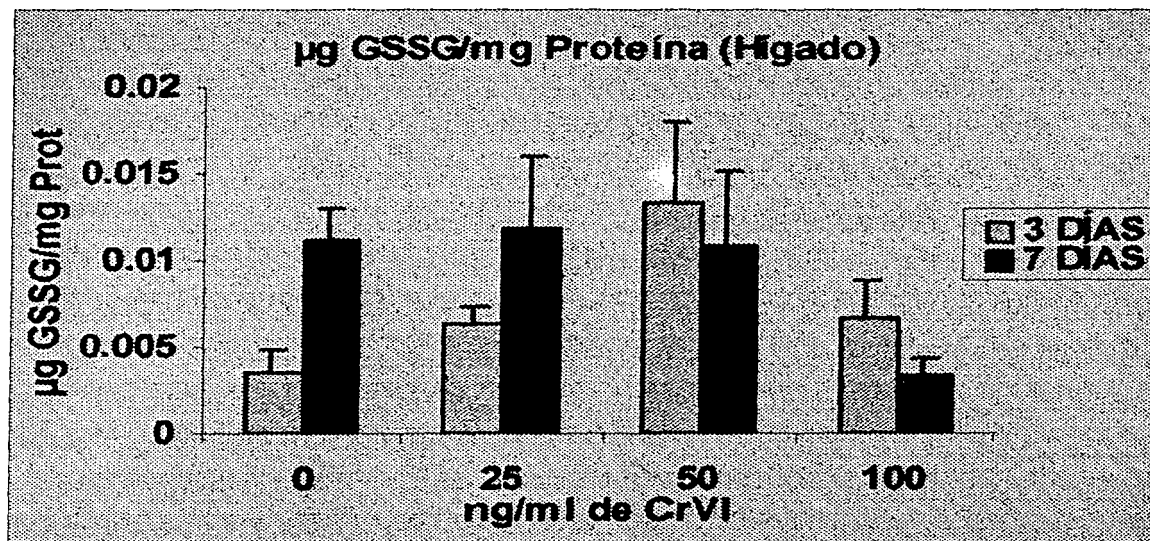


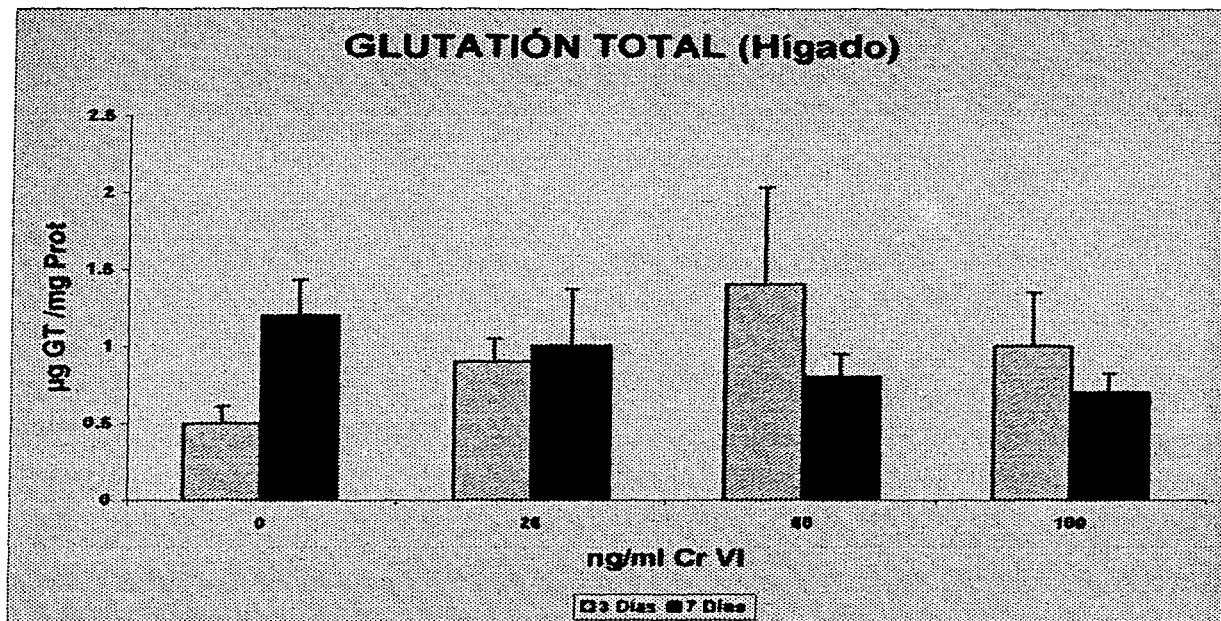
FIG6.- Relación de GSSG observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días (LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)

**TABLA 12 – Relación de la variación porcentual de GSH/GSSG observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días  
(LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)**

En la tabla 13 se observan los valores promedio de los tioles totales calculados como la cantidad de GSH+2\*GSSG, calculado por mg de proteína para conocer (GSH o GSSG) en que proporción se encuentran en las proteínas totales. En la figura 7 se puede observar que la cantidad de glutatión total no parece sufrir modificaciones esenciales en ninguna de las concentraciones ni tiempos de exposición. Aunque se observa una tendencia al aumento en la concentración de glutatión total a tres días, que disminuye a siete días con respecto al control.

<b>GLUTATIÓN TOTAL /mg PROTEÍNA</b>				
<b>CONCENTRACIÓN DE K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (ng/ml) EN EL MEDIO</b>	<b>3 DÍAS Prom±EE</b>		<b>7 DÍAS Prom±EE</b>	
<b>0</b>	0.5	±.11	1.2	±.23
<b>25</b>	0.9	±.15	1.0	±.37
<b>50</b>	1.4	±.63	0.8	±.15
<b>100</b>	1.0	±.35	0.7	±.12

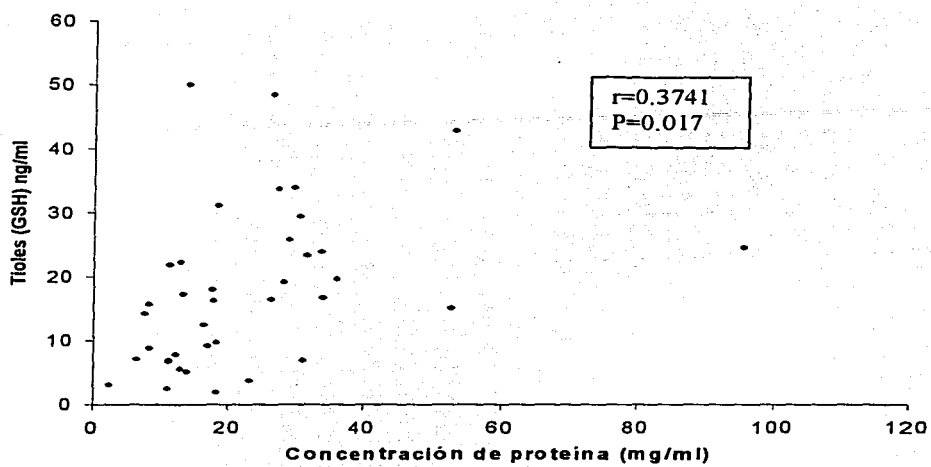
**TABLA 13 . - Glutatión total observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días  
(LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)**



**TABLA 13 Y FIG7.- Glutación total observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días (LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 1)**

No se encontraron diferencias significativas entre los organismos tratados y los controles para ninguna de las dosis ni para los días de tratamiento, aunque a los tres días se observa una tendencia a disminuir la relación GSH/GSSG, ésta no fue significativa cuando se analizaron los datos mediante un análisis de varianza. Cuando correlacionamos los niveles de proteínas con los tioles GSH determinados en el hígado mediante el ensayo de Hissin y Hilf (1976), observamos que existe una correlación significativa entre la cantidad de proteínas y los tioles (Fig. 8A), lo cual sirve de referencia para la sensibilidad de la metodología empleada. Sin embargo no observamos una correlación negativa entre la cantidad de cromo en las branquias y GSH ( Fig. 8B), como esperábamos.

A)



B)

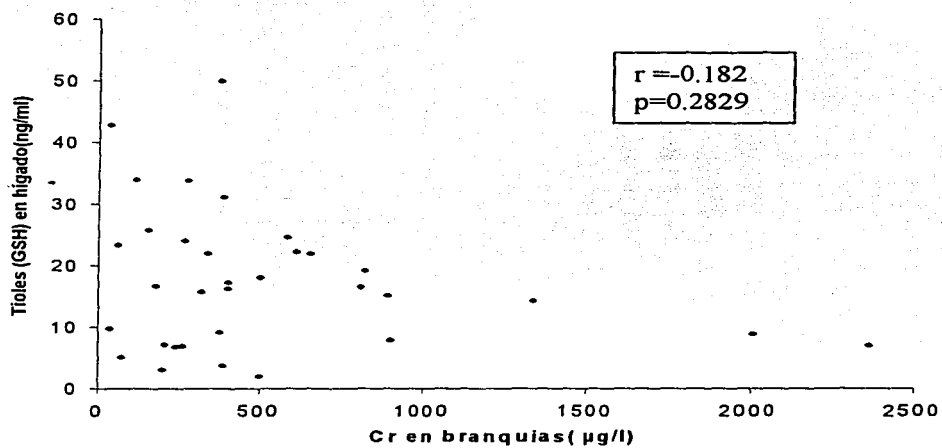


Fig 8. -A) Tioles (GSH) en hígado de *C. auratus* de todos los organismos, contra la concentración de proteínas .B) Tioles (GSH) de Hígado de *C. auratus* de todos los organismos, contra la concentración de cromo en branquias.  
(Los datos del Cromo y del GSH de todos los organismos se encuentran en el anexo 1 y 2)



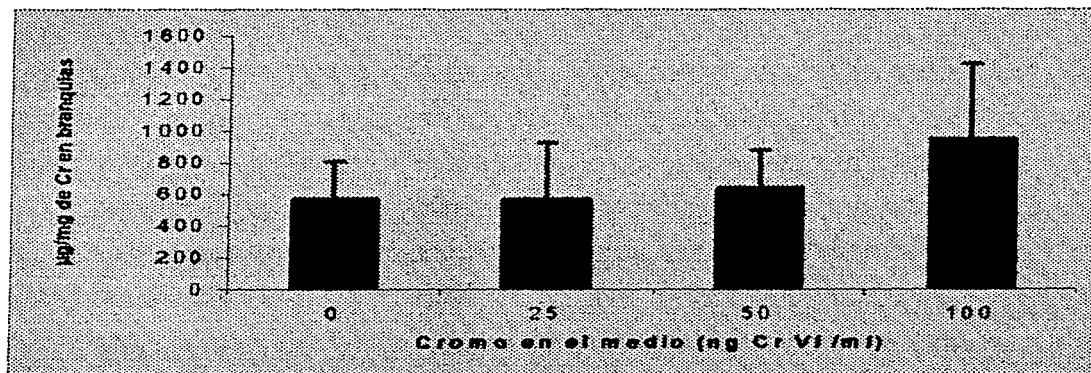
Como se puede observar en la tabla 14, existe una tendencia que sugiere que el cromo en branquias aumentó conforme al aumento en la concentración a 3 días, aunque estadísticamente los datos no fueron significativos. A los siete días la concentración tiene una tendencia a disminuir en comparación con la detectada a los tres días, pero este cambio tampoco es significativo. (Fig 9 (A y B)). Por otro lado encontramos concentraciones de cromo en los organismos controles, posiblemente debido a la presencia de cromo en el alimento o probablemente del pozo de donde fue recolectada el agua que se puso en las peceras. También hay que señalar la sensibilidad del aparato, el cual estaba siendo usado en su límite de detección por lo que pudo afectar nuestros resultados. Además es importante recordar que los alimentos para animales contienen ciertas cantidades de Cr ya que se trata de un micronutriente.

CONCENTRACIÓN DE $K_2Cr_2O_7$ (ng/ml) EN EL MEDIO	Día 3		Día 7	
	PROMEDIO Cr $\pm$ E.E (µg/mg)		PROMEDIO Cr $\pm$ E.E. (µg/mg)	
0	570	$\pm 237$	391	$\pm 139$
25	567	$\pm 361$	456	$\pm 42$
50	638	$\pm 241$	239	$\pm 72$
100	947	$\pm 476$	563	$\pm 115$

TABLA 14.- Concentración de Cr (µg/mg) en branquias observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio a 3 y 7 días

(LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 2)

A)



B)

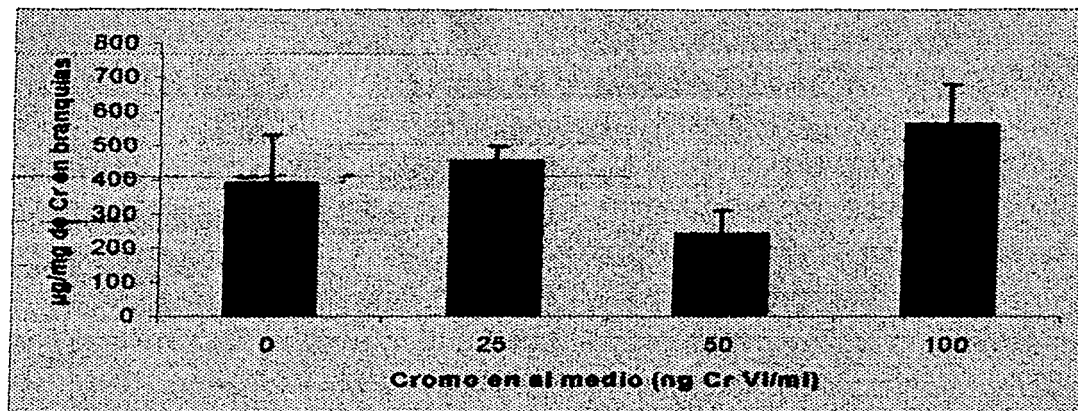


FIG9.-A)Relación de la concentración de Cr en branquias observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio por 3 días. B)Relación de la concentración de Cr en branquias observado en *C. auratus* en tratamiento con dicromato de potasio por 7 días

(LOS DATOS INDIVIDUALES SE ENCUENTRAN EN EL ANEXO 2)

## DISCUSIÓN

El estrés oxidativo, se produce cuando se pierden antioxidantes consumibles como el GSH y se acumula la forma oxidada (GSSG), lo cual provoca un desbalance en la capacidad reductora de la célula (Wallace, K.1997). En este estudio se investigaron este tipo de efectos en un organismo biomonitor que tiene una amplia distribución geográfica y que podría utilizarse para determinar la presencia de agentes que inducen estrés oxidativo, como es el caso de algunos genotóxicos, especialmente los metales que al ingresar a las células sufren procesos de óxido-reducción que generan gran cantidad de radicales libres.

Los peces responden de manera similar a especies de mamíferos usados como modelos en experimentos sobre la actividad de agentes químicos (Yang et al. ,1990; Washburn and Di Giulio, 1989), por lo que pueden ser utilizados para demostrar los efectos que los agentes tóxicos inducen en organismos acuáticos al mismo tiempo que demuestran su biodisponibilidad. Estas consideraciones son importantes, porque si una sustancia no está biodisponible, es decir no se incorpora o es absorbida por los organismos, es probable que no induzca cambios importantes en el ecosistema.

En el análisis de la concentración del Cr en las branquias se observaron mayores concentraciones a los 3 días, mientras que disminuía a los 7 días. Esto podría deberse al secuestro del tóxico por otras rutas de metabolización (como la vesícula biliar) o de absorción (músculo) con relación al tiempo (Williams P. et al. 1985) o también a que el organismo haya excretado parte del cromo. El dicromato se agregó una sola vez al inicio del ensayo, por lo que su biodisponibilidad pudo haber disminuido con el paso del tiempo, porque el Cr VI tiende a reducirse a Cr III por la materia orgánica presente en el medio, la cual es una forma más difícil de ser absorbida (Kerger et al. , 1996b). La similitud de los resultados en las concentraciones de 0 y 25 ng/ml de  $K_2Cr_2O_7$  pudieron haber sido ocasionadas por la sensibilidad del aparato que estaba siendo utilizado en su límite de detección.

Los niveles de GSH encontrados en los hígados de peces expuestos a dicromato de potasio tienden a aumentar a los tres días al igual que el GSSG con respecto al control, lo cual indica un aumento en el glutatión total. De manera contraria en los organismos sacrificados a los siete días ambos indicadores tienden a disminuir con respecto al control, con excepción de las dosis de 25 ng/ml. Cuando analizamos la relación GSH/GSSG, concordando con lo mencionado arriba, el cociente es menor a los 3 días que a 7 días, coincidiendo con la tendencia de acumulación de Cr en branquias en los organismos sacrificados en el día 3, lo cual podría tomarse como una indicación de estrés oxidativo. Esta idea es reforzada por el hallazgo simultáneo de López et al. (2001) que estudió la presencia de daño genotóxico en las branquias de estos mismos organismos, observando una inducción significativa de MN en las branquias de los animales sacrificados a los tres días en todas las dosis estudiadas, pero no a los siete días. Esta tendencia al aumento del estrés oxidativo a los tres días unido al daño genotóxico, nos indica no solo un efecto

biológicamente relevante, sino que nos permite indicar el mecanismo por el cual el cromo está induciendo el daño genético.

En estudios con otras especies acuáticas (Ejemplo: los mejillones; *M. galloprovincialis*) que fueron expuestas a metales pesados se observa una disminución en los niveles de GSH/GSSG, debido a una inhibición de las enzimas relacionadas con la síntesis de GSH, actividad que se recupera, con un aumento gradual del tripéptido (Canesi, L. et al. 1999). Por lo que podríamos suponer que la disminución de la relación GSH/GSSG en los organismos a los tres días podría deberse a la inhibición de estas enzimas o a su consumo, las cuales mantienen elevada su actividad a pesar de que disminuye la biodisponibilidad del tóxico o éste es excretado. Ello podría explicar el aumento en la relación GSH/GSSG a siete días en las concentraciones de 50 y 100 ng/ml de  $K_2Cr_2O_7$  el que llega a ser hasta tres veces mayor que el control.

Se ha observado un nivel bajo de daño oxidativo en diferentes órganos de *C. auratus* sometidos a periodos de anoxia y reoxigenación (Volodimir, I. et al. 2000) por lo que los autores piensan que es un organismo con una alta adaptabilidad a situaciones de estrés oxidativo y podría explicar la moderación en los cambios en la relación GSH/GSSG observada en nuestro trabajo, en donde nuestro interés fue investigar la posibilidad de documentar estos cambios a bajas concentraciones, similares a las que se encuentran en aguas de riego contaminadas con este metal.

Para conocer la sensibilidad de nuestra metodología, correlacionamos (figura 10) la concentración de tioles de GSH con la concentración de proteínas totales del hígado, puesto que se espera que exista una relación directa entre ambas variables, ya que prácticamente todas las proteínas contienen el aminoácido cisteína. Observamos una correlación positiva que confirma que la metodología empleada nos permitía determinar la porción de tioles atribuibles a la presencia de GSH.

Cuando comparamos la cantidad de tioles (GSH) con la concentración de cromo en las branquias para investigar si existía una la relación lineal entre los biomarcadores de exposición y de efecto se observa una tendencia no significativa que nos indica que la concentración de GSH disminuye conforme aumenta la concentración del metal. Esta tendencia puede estar reflejando el consumo del tripéptido por la presencia del Cr en el organismo, aunque hay que tener en cuenta que las mediciones se hicieron en dos órganos diferentes y probablemente su capacidad de acumulación no está relacionadas entre sí. Algo similar ocurre con otros dos tejidos de este pez, Al Sabti et al. (1986) y Flores et al. (2001) encontraron una mayor sensibilidad en las branquias al efecto genotóxico del cromo que en los eritrocitos, lo cual podría deberse al ciclo hematopoyético en el que los eritrocitos dañados son eliminados y excretados en la vesícula biliar.

Estudios en especies acuáticas, demuestran que el hígado es el órgano que contiene la más alta concentración de enzimas de biotransformación, pero cuando un xenobiótico entra por medio del tracto digestivo, la contribución de las enzimas del tracto intestinal son particularmente importantes para la biotransformación de xenobióticos (Landolt et al. 1983) por lo que es más difícil demostrar sus efectos en órganos como el hígado cuando las concentraciones del tóxico son bajas como las utilizadas en este estudio.

Por otro lado la observación del aspecto de los órganos cuando se hicieron las disecciones nos podría servir como una medida cualitativa del estado de la función del hígado y las branquias (Williams P. et al. 1985). El 10% del cromo se excreta mediante la bilis en condiciones normales (Albert, L., 1997). La bilis contiene principalmente conjugados de GSH (Ketterer y Mulder, 1990), por lo que el cambio de color de la bilirubina contenida en la vesícula biliar podría deberse a la acumulación de cromo proveniente de varias partes del organismo (sangre); se podría suponer según lo observado, que si la vesícula tiene una coloración verde claro no hay daño por algún tóxico en el ambiente, no así conforme la vesícula va adoptando una coloración más oscura, dado que puede deberse a la acumulación de bilirrubina o a sus derivados por efecto del cromo. La presencia de coágulos sanguíneos en las branquias de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones de cromatos también nos podrían indicar la presencia de contaminantes en el medio. Curiosamente, en individuos expuestos a cromatos por vía inhalatoria, se observa la presencia de hemorragias nasales y daño en el tabique nasal (Doudar, S., et al. 1992). Estas observaciones pueden ser consideradas como indicadores a nivel de órganos, de la presencia de agentes tóxicos en el medio, antes de un análisis bioquímico o histopatológico más detallado del organismo biomonitor o centinela.

Finalmente, creemos que como trabajamos con organismos silvestres, no endocriados, encontramos una variación en los resultados mayor que la que podría esperarse para animales de laboratorio. Este aspecto puede ser relevante cuando se analiza el riesgo de daño en poblaciones naturales, por lo que se debe de poder estimar adecuadamente la varianza de la muestra, para el cálculo del número de individuos a analizar.

## CONCLUSIONES

Las carpas tratadas con dicromato de potasio acumularon el metal en branquias, pero esta acumulación no se vio claramente reflejada en un aumento del estrés oxidativo en hígado.

Los organismos expuestos a dicromato presentaron un cambio significativo de coloración en su vesícula biliar y un aumento en la cantidad de coágulos sanguíneos en las branquias.

Los tioles hepáticos no se modificaron por la exposición al dicromato, aunque se observa una tendencia a aumentar en los tres primeros días de la exposición y a los siete días tiende a disminuir en comparación a los controles.

El uso de *C. auratus* como modelo experimental para investigar los efectos de agentes tóxicos en cuerpos de agua, requiere de un diseño que tome en cuenta un mayor número de variables como por ejemplo incluir el metabolismo a nivel del tejido branquial.

## PERSPECTIVAS

Para caracterizar la capacidad de *C. auratus* como un organismo biomonitor se requiere:

Realizar experimentos en los que se estudien un mayor número de órganos y de organismos para poder estandarizar respuestas que nos indiquen daño por exposición.

Realizar pruebas en las que el organismo este expuesto a concentraciones constantes (crónicas) del tóxico a diferentes tiempos para poder entender de una mejor forma la manera en la que reacciona a la exposición al tóxico.

Realizar mediciones de estrés oxidativo, MN, acumulación del xenobiótico, metabolismo, etc. en diferentes órganos (branquias, músculo, etc.), que podrían ser utilizados como indicadores de exposición.

Realizar pruebas *in situ* para observar si existen diferencias en los resultados obtenidos en laboratorio.

## LITERATURA CITADA

1. Albert, L. 1997. Introducción a la Toxicología Ambiental. ECO/OPS. México. pp 227-246
2. Al-Sabti, K. 1991. Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes. ISBN 86 80023-17-5. Jozef Stefan Institute, Jamova 39, 61111 Ljubjana. Slovenia. pp 230
3. Al-Sabti, K., M. Franko, B. Andrijanic, S. Knez y P. Stegnar. 1993. Chromium induce micronuclei in fish. Applied Toxicology. pp 333-336.
4. Al-Sabti, K. y J. Hardig. 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products, in the Baltic sea. Sweden. Comp. Bioch. Physiol., 97C: 179-182.
5. Al-Sabti, K. y Metcalfe C. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research. 343:121-135.
6. Al-Sabti, K., M. Franko, B. Andrijanic, S. CNES and P. Stegnar. 1994. Chromium induced micronuclei in fish, J. Appl. Toxicol., 14, 333-336.
7. Al-Sabti, K. 1986 b. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. Cytobios. 47, 147-154.
8. Al-Sabti, K. 1986<sup>a</sup>. Clastogenic effect of five carcinogenic mutagenic chemicals on teh cells of the common carp *Cyprinus carpio* L., Comp. Biochem. Physiol., 85C, 5-6.
9. Alscher, R.G. 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol. Plant. 77:457-464.
10. Anders MW. 1988. Bioactivation mechanisms and hepatocellular damage. En: Arias IM., WB. Jacoby, H. Popper, et al., eds. *The liver : biology and pathobiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York.: Raven Press. pp389.
11. Armienta M.A., Rodríguez, R., A. Queré, F. Juárez, N. Ceniceros and A. Aguayo, 1993. Groundwater pollution with chromium in Leon Valley, México. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 54 :1-13
12. Armienta, M.A., O. Morton, R., Rodríguez, O. Cruz, A. Aguayo y N. Ceniceros. 2001. Chromium in a tannery wastewater irrigated area, León Valley, México. Bull Environ Contam Toxicol 66:189-195.
13. Armienta, M.A., R. Rodríguez, N. Ceniceros, F. Juárez and O. Cruz. 1996. Distribution, origin and fate of chromium in soils in Guanajuato México. Environmental Pollution 3:391-397.
14. Baselt, R.C., R.H. Cravey. 1989. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 3<sup>rd</sup> ed. Chicago: Year book Medical Publishers. pp190-192.
15. 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. 72:248-254.
16. Bromenshenk, J.J., G.C. Smith, y V.J. Watson. 1995. Assessing Ecological Risks in Terrestrial Systems With Honey Bees. En: Butterworth, F. Corkum, L. y Guzmán, J. eds. *BIOMONITORS AND BIOMARKERS AS INDICATORS OF ENVIRONMENTAL CHANGE*. Plenum press. NY, USA. 10-11 pp.



17. Bulkley, J.W., M.J. Donahue, y H.A. Regier. 1989. The Great Lakes Water quality agreements: How to assess progress toward a goal of ecosystem integrity. En: *Post-Audits of Environmental Programs and Projects*, ed. Gunnerson, C.G. American Society of civil Engineers, New York. pp 27-42.
18. Bunton, T.E. 1999. Use of Non-mammalian Species in Bioassays for Carcinogenicity En: D.B. McGregor, J.M. Rice and S. Vanitteds. *The use of Short and Mediumterm Tests for Carcinogen and data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, IARC Scientific Publication No. 146, International Agent for Research on Cancer, Lyon, pp. 151-183.
19. Burns, L.A. y A.E. Munson. 1993. Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25 (IL-2R/p55). *J. Pharmacol Exp. Therapeutics*. 225:178-186.
20. Butterworth, F.M. y R. Hough. 1995. Rehabilitation of the North American Great Lakes watershed: Past and Future. *Landscape Ecology Volume III. Rehabilitation of Rivers*, Eds: L.D. Waal, A. Large, M. Wade and G. Pinay, Jonh Wiley, London.
21. Butterworth, F.M. 1995. Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. En: F.M. Butterworth et al. *Biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change*. Environmental Science Research. Vol.5 pp 1-8.
22. C. Veillon & K.Y. Patterson, 1985. Determination of chromium in human tissues by atomic absorption spectrometry. En: O'Neill et al. *Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis*. IARC.
23. Canesi, L.A. Viarengo, C. Leoncio, M., Filipelli, G., Gallo. 1999. Heavy metals an glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*. 46:67-76.
24. Chowdhury, J. R., A. W. Wolkoff, e I. M. Arias. 1994. Heme and Bile Pigment Metabolism. En: Arias, I. et al. *The Liver: Biology and Pathobiology (3ra)*. Raven Press, New York. pp. 471-504.
25. Dargel R. Lipid peroxidation. 1992. A common pathogenic mechanism?. *Exp. Toxicol. Pathol.* 44:169-181.
26. De Flora S. 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* vol. 21 no. 4: 533-541.
27. De Flora, S., Badolati G.S., Serra, D. et al. 1990. Genotoxicity of chromium compounds: a review. *Mutat Res.* 238:99-172.
28. De Flora, S., G.S., Badolati, D. Serra, et al. 1987. Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutant Res.* 192:169-174.
29. De-Rey-Pailhade J. 1888. *J. Compt. Rend. Acad. Sci.*, 106:1683-1684.
30. Deutsch, M. 1972. *Water Quality in a Stressed Environment*. Ed. Pettyjohn W.A., Burgess Publ. Co., Minneapolis. pp. 149-159.
31. Dolphin D. et. al. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical and medical aspects, vol. III: Coenzymes and cofactors En: D. Dolphin et al. ed., parts A and B. Wiley, New York.
32. Douidar, S. M., C. S. Shaver, y W. R. Snodgrass. 1992. Hepatotoxicity from Hazardous Chemicals. En: Sullivan, J. B. y G. R. Krieger. Eds. *Hazardous Materials Toxicology: Clinical Principles of Environmental Health*. Williams & Wilkins. USA. pp. 109-122.
33. Doull, J. 1980. Factors influencing toxicology; En: Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Doull, J., C.D. Klaassen y M.O. Ambur. Eds. New York, Mac Millan, 2<sup>nd</sup> Ed., pp 70-83.

34. Du Vigneaud, V., and Miller, G.L., J Biol Chem, 116, 469-476, 1936.
35. Elinder, C-G., L.Gerhardsson, y G. Oberdoerster. 1987. Biological monitoring of toxic metals, En : T.W. Clarkson, L. Fiberg, G.F. Nordberg y P.R. Sager (Eds.). *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press. New York. pp. 1-71.
36. Foth, H. 1999. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In:Marquardt, H. et al. Eds. Academic Press. pp. 1067-1085.
37. Fowle, J.R. y K. Sexton. 1992.EPA priorities for biological markers research in environmental health. Environ. Health Perspect.,98: 235-241.
38. Geller, R.J. 1992. Chromium. En: Sullivan, J.B. and G., Krieger Eds. *Hazardous Materials Toxicology: Clinical principles of environmental health*. Williams & Wilkins. pp.891-895.
39. Gonsebatt, M.E. 1994. Marcadores biológicos de exposición a arsenico inorganico. (Tesis Doctoral). Fac. de Ciencias. UNAM.
40. Gonsebatt, M.E., A.M. Salazar, R. Montero, F. Diaz Barriga, L. Yañez, H. Gómez, y P. Ostrosky-Wegman. 1994. Genotoxic monitoring of workers at a hazardous waste disposal site in México. Environ. Health Perspect., in press.
41. Gonsebatt, M.E., L. Vega, L.A. Herrera, R. Montero, E. Rojas, M.E. Cebrián y P. Ostrosky-Wegman. 1992. Inorganic arsenic effects on human lymphocyte stimulation and proliferation. Mutation Res. 283: 91-95.
42. Gutierrez, R.M., G.V. Bocco and S.B. Castillo. 1986. Boletín I. De Geografía UNAM. (Universidad Nacional Autónoma de México)16, 77-125.
43. Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1985.Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurosci.8:22-26.
44. Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2<sup>nd</sup>. Clarendon Press, Oxford.
45. Harden, D.J.1990. The molecular basis for unherited susceptibility to an action of carcinogens, En : G.N. Volans, J. Sims, F.M. Sullivan y p. Turner. Eds. Basic Science in *Toxicology, Proceedings of the V International Congress of Toxicology*, Taylor and Francis, london, Neww York, Philadelphia. pp. 7-21.
46. Harington, C.R., and Mead, T.H., Biochem, J.,29,1602-1611,1935.
47. Heffter, A., Med. Naturwiss Arch, 1,81-103,1908
48. Hérouart,D.,M. van Montangu, and D. Inzé.1993.Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. Proc Natl Acad Sci. 90:3108-3112.
49. Hissin P.J. y R. Hilf. 1976. A Fluorometric method for determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. Analytical Biochemistry. 74:214-226.
50. Hodgson, E. and Smart R. C. 2001(3) . Introduction to Biochemical Toxicology. Wiley Interscience. N.Y. USA. pp:239-253.
51. Horton AA, S. Fairhust. 1987.Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. CRC Crit Rev Toxicol. 18:27-79.
52. Hu JJ., Dubin N., Kurland D., Ma BL., Roush GC. 1995. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. En: Wallace, K.B. et al. Eds.*Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis. 89-113.
53. International Agency for Research on Cancer .1990. Chromium, nickel and welding. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol.49. IARC Scientific Publications, IARC, Lyon.

54. Jakoby, W.B. 1988. Detoxication: conjugation and hidrolisis. En: Arias IM., W.B. Jacoby, H. Popper, et al., eds. *The liver : biology and pathobiology*. 2<sup>nd</sup>. ed. New York.: Raven Press. 375.
55. Jimenez, B. 2002. Manejo de la calidad del agua.. Boletin 104. Instituto de Ingenieria. UNAM.
56. Junqueira, L.C. y J. Carneiro. 1979. *Histologia Basica*. 2ª reimpresión. Salvat ed. Barcelona, Esp. pp 287-298.
57. Kappus H. 1987. Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch Toxicol*. 60:144-149.
58. Kerger, B., Paustenbach, D., Corbett, G., and Finley, B. 1997. Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 141.
59. Ketterer, B.; Coles, B.; and Meyer, D. J. The role of glutathion in detoxication. *Environ. Health Perspect.*, 49:59-69. 1983.
60. Ketterer, B., G. J. Mulder. 1990. Glutathione conjugation, En : Mulder G.J. ed. *Conjugation Reactions in drug metabolism. An Integrated Approach*, London: Taylor & Francis, pp. 307-364.
61. Kraybill H.R. The toxicology and epidemiology of natural hepatotoxin exposure. *Isr J. Med Sci*. 10:416.
62. Kulik, I. And G. Storz. 1994. Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes and eukaryotes. *Redox Rep*. 1:23-29.
63. Lachner, E.A., C.R. Robins, and W.R. Courtenay, Jr. 1970. Exotic fishes and other aquatic organisms introduced into North America. *Smithsonian Contributions to Zoology* 59. 29pp
64. Lopez, Q., B. Solis, M.E. Gonsebatt. 2001. El ensayo de Micronucleos en epitelio. Branquial de peces como un modelo experimental para determinar la presencia de cromatos Genotóxicos en el ambiente acuático. *Science Naturae*. En Prensa.
65. Mannervick, B., I. Carlberg y K. Larson. 1989. Glutathione: General review of mechanism of action. En: Dolphin D. et. al. eds. *Glutathione: Chemical Biochemical and medical aspects*, vol. III: Coenzymes and cofactors. part A, pp 187-242. Wiley, New York.
66. Matlock, G.C. 1990. Ocurrence of goldfish in Texas saltwater. *Texas Parks and Wildlife Data Management Series No. 41*. Austin. 3pp.
67. Murai, T., y J.W. Andrews. 1977. Effects of salinity on the eggs and fry of the golden shiner and goldfish. *Progressive Fish Culturist* 39(3): 121-122.
68. NIEHS (National Institute of Environmental Health) Task Force 3. 1985. *Biochemical and Cellular Markers of Chemical Exposure and Preclinical Indicators of Disease*. Washington, D.C., U.S. Department of Health and Human Services.
69. NRC. 1989. National Research Council. *Biological Markers in Reproductive Toxicology*. Commission on Life Sciences, National Academic Press. Washington, D.C. pp. 15-29.
70. NRC. 1992. National Research Council. Commission on life Sciences. Board on Environmental Studies and Toxicology, Subcommittee on Immunotoxicology Committee on Biological Markers. *Biological Markers in Immunotoxicology*. National Academic Press. Washington, D.C. pp. 68-71.
71. Omenn, G.S. 1986. Susceptibility to occupational and environmental exposure to chemicals. *Prog. Clin. Biol. Res*. 214:527-545.

72. Ostrosky-Wegman P., M.E. Gonsebatt, R. Montero, L. Vega, H. Barba, J. Espinosa, A. Palao, C. Cortinas, G. García-Vargas, L.M. del Razo y M. Cebrián. 1991. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in México. *Mutation Res.* 173:81-87.
73. Page, L.M., y B.M. Burr. 1991. A Field Guide to Freshwater Fishes North America North of Mexico. Peterson Field Guide Series. Houghton Mifflin and Company. Boston. 432 pp.
74. Perlmutter, N.M. and M. Lieber. 1970. U.S. Geol. Surv. Wat. Supp. Pap. 1879-G (U.S. Govt Printing Office, Washington, DC)
75. Pounds, G.J. 1985. The Toxic Effects of Metals. En: Williams, P. & J. Burson. *Industrial Toxicology: Safety and Health Applications in the Workplace.* Van Nostrand Reinhold. New York, USA. pp 197-210.
76. Proctor, N.H., J.P. Hughes, M.L. Fischman et al. 1988. Chromium. En: Proctor, N.H., J.P. Hughes, M.L. Fischman et al. *Chemical Hazards of the Workplace.* 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott. 155-158.
77. Raven, P., L. Berg, G. Johnson. 1997. *Environment.* 2<sup>nd</sup>. Saunders College Publishing. USA. pp. 276-302.
78. Richardson, M.J., y F.G. Whoriskey. 1992. Factors influencing the production of turbidity by goldfish. *Canadian Journal of Zoology* 70:1585-1589.
79. Richardson, M. J., F.G. Whoriskey, y L.H. Roy. 1995. Turbidity generation and biological impacts of an exotic fish *Carassius auratus*, introduced into shallow, seasonally anoxic ponds. *Journal of Fish Biology* 47:576-585.
80. Richter, C., Schweizer, M. 1997. Oxidative stress in mitochondria. En: Wallace, K.B. et al. Eds. *Free Radical Toxicology.* Taylor & Francis. 89-113.
81. Ridder, W.E. y F.W. Oehma. 1974. Nitrates as environmental, animal and human hazard. *Clin Toxicol.* 7:145.
82. Riehl, R., y H.A. Baensch. 1991. *Aquarium Atlas.* Mergus. Melle, Germany. 992pp.
83. Robinson, H.W., and T.M. Buchanan. 1988. *Fishes of Arkansas.* The University of Arkansas Press. Fayetteville. 536pp.
84. Rodríguez, C.R., M.A. Armienta, S.S. Villanueva, G.P. Díaz & M.T. González. 1991. Estudio hidrogeoquímico y modelación matemática del acuífero del río Turbio para definir las acciones encaminadas a proteger de contaminantes la fuente de abastecimiento de la ciudad de León, Gto. IGF-UNAM, CNA-SARH. Technical Report CC-88-306 D, Universidad Nacional Autónoma de México, DF
85. Roullier, C.H. 1964. Experimental toxic injury of the liver. En: Roullier, C.H. ed. *The liver.* New York: Academic Press. 335.
86. Sawyer H.J. 1988. Chromium and its compounds. En: Zens C, ed. *Occupational medicine: principles and practical applications.* 2<sup>nd</sup> ed. Chicago: Year Book Medical Publishers. 531-539.
87. Sevanian, A., L. McLeod. 1997. Formation and Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. En: Wallace, K.B. et al. Eds. *Free Radical Toxicology.* Taylor & Francis. 47-70.
88. Silverblatt, F. M. Turck, R. Bulger. 1970. Nephrotoxicity due to cephaloridine: A light- and electronmicroscopic study in rabbits. *J. Infect. Dis.* 122 :33-44.
89. Stollenwerk, K.G. and D.B. Grove. 1985. *J. Environ. Qual.*, 14, 150-155.

90. Stageman, J.J. y J.J. Lech. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species; carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.*, 90:101-109.
91. Tabershaw, I.R., H.M.D., Utidjian, B.L. Kawahara. 1977. Chromium and its compounds. En: Kay, M.M., et al. eds. *Occupational diseases: a guide to their recognition*. Rev. ed. Washington, D.C.: National Institute of Occupational Safety and Health. 352-354.
92. Timmerman, K.P. 1989. Molecular Characterization of corn glutathione-S-transferase isozymes involved in herbicide detoxification. *Physiol. Plant.* 77:763-782.
93. Tôzüm, S.R.D. and J.R. Gallon. 1979. The effects of methyl viologen on *Gloeocapsa* sp. LB795 and their relationship to the inhibition of acetylene reduction (nitrogen fixation) by oxygen. *J. Gen. Microbiol.* 111:313-326.
94. USEPA. 1992. A cross-species scaling factor for carcinogen risk assessment based on equivalence of mg/kg<sup>3/4</sup>/day. *Federal Register* 57,24152-24173.
95. Volodomyr, I., L. P. Lushchak, A.A. Mota, y M. Hermes-Lima 2001. Oxidative Stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: 100-107.
96. Wallace, K. 1997. *Free Radical Toxicology*, Taylor & Francis. USA. pp.402.
97. Washburn, P.C. y R.T. Di Giulio. 1989. Stimulation of superoxide production by nitrofuraptoin p-nitrobenzoic acid and m-nitrobenzene in hepatic microsomes of three species of freshwater fish, *Environ. Toxicol. Chem.* 8:171-180.
98. Wild, C.P. 1990. Antibodies to DNA Alkylation as Analytical tools in chemical carcinogenesis. *Mutation Res.* 233:219-233.
99. Williams, P. & J. Burson. *Industrial Toxicology: Safety and Health Applications in the Workplace*. Van Nostrand Reinhold. New York, USA. pp 197-210
100. Wingate, V.P.M., M.A. Lawton, and C.J. Lamb. 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.* 87:206-210.
101. World Health Organization. 1988. Chromium. *Environmental Health Criteria*, Vol. 61. WHO, Geneva, Switzerland.
102. Yang, J.H., P.T. Kostecki, E.J. Calabroco y L.A. Baldwin. 1990. Induction of peroxisome proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 104: 476-482.
103. Younes M. 1999. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In: Marquardt, H. et al. Eds. Academic Press. pp.111-125.
104. Ziegler DM. 1988. Detoxication: oxidation and reduction. En: Arias IM., WB. Jacoby, H. Popper, et al., eds. *The liver: biology and pathobiology*. 2<sup>nd</sup>. ed. New York.: Raven Press. 363.
105. Zimmermann, R.J. 1974. Hepatotoxic effects of oncotherapeutic agents. *Prog. Liver Dis.* 1986. 8:621.
106. Zimmermann, R.J. y W.C. Maddrey. 1987. Toxin and drug-induced hepatitis. En: Schiff, L. Schiff, ER. eds. *Diseases of the Liver*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 591.
107. Zimmermann, R.J., B.J. Marafino, Jr., a. Chan, P. Landre, y J.L. Winkelhake. 1989. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. *J. Immunol.* 142:1405-1409.

# ANEXO 1

3DIAS		BRADFORD				
Pez		GSH µg/2ml	GSH/ml	µg/ml	COCIENTE	GSH(1000)
16	C1	30.206	15.103	52698	0.0002866	0.28659532
17	C2	47.878	23.939	33672	0.00071095	0.71094678
18	C3					
19	C4	38.239	19.1195	28064	0.00068128	0.68128207
20	C5	10.239	5.1195	13928	0.00036757	0.36756893
11	(25)1	6.108	3.054	2404	0.00127038	1.2703827
12	(25)2	14.255	7.1275	6512	0.00109452	1.09451781
13	(25)3	13.567	6.7835	11122	0.00060992	0.60991728
14	(25)4	33.419	16.7095	33916	0.00049267	0.49267307
15	(25)5	17.698	8.849	8316	0.00106409	1.06409331
6	(50)1	67.845	33.9225	29662	0.00114363	1.14363495
7	(50)2	49.141	24.5705	95404	0.00025754	0.25754161
8	(50)3	99.94	49.97	13928	0.00358774	3.58773693
9	(50)4	28.485	14.2425	7540	0.00188893	1.88892573
10	(50)5	13.84	6.92	31058	0.00022281	0.22280894
1	(100)1	32.845	16.4225	26256	0.00062548	0.62547608
2	(100)2	43.747	21.8735	11224	0.00194882	1.94881504
3	(100)3	13.911	6.9555	11188	0.00062169	0.62169289
4	(100)4	62.222	31.111	18392	0.00169155	1.69155067
5	(100)5	7.485	3.7425	23248	0.00016098	0.16098159

Pez		GSSG/2ml	GSSG/ml	µg/ml	COCIENTE	GSSG(1000)
16	C1	164.936	0.082468	52698	1.56492E-06	0.001564917
17	C2	474.2275	0.23711375	33672	7.04187E-06	0.007041867
18	C3					
19	C4	163.964	0.081982	28064	2.92125E-06	0.002921251
20	C5	77.136	0.038568	13928	2.7691E-06	0.002769098
11	(25)1	44.977	0.0224885	2404	9.35462E-06	0.009354617
12	(25)2	90	0.045	6512	6.91032E-06	0.006910319
13	(25)3	83.568	0.041784	11122	3.75688E-06	0.003756878
14	(25)4	249.1175	0.12455875	33916	3.67257E-06	0.003672566
15	(25)5	128.59	0.064295	8316	7.73148E-06	0.007731481
6	(50)1	1357.048	0.678524	29662	2.28752E-05	0.022875194
7	(50)2	372.995	0.1864975	95404	1.95482E-06	0.001954818
8	(50)3	699.3375	0.34966875	13928	2.51055E-05	0.025105453
9	(50)4	173.612	0.086806	7540	1.15127E-05	0.011512732
10	(50)5	305.395	0.1526975	31058	4.91653E-06	0.004916527
1	(100)1	170.396	0.085198	26256	3.2449E-06	0.003244896
2	(100)2	196.123	0.0980615	11224	8.73677E-06	0.008736769
3	(100)3	149.9	0.07495	11188	6.69914E-06	0.006699142
4	(100)4	488.766	0.244383	18392	1.32875E-05	0.013287462
5	(100)5	64.273	0.0321365	23248	1.38233E-06	0.001382334

<b>Pez</b>	<b>GSH/GSSG</b>	<b>GSH+(2*GSSG)</b>
16 C1	183.137702	0.289725151
17 C2	100.959982	0.725030515
18 C3		
19 C4	233.215828	0.687124572
20 C5	132.739577	0.373107122
11 (25)1	135.802744	1.28909193
12 (25)2	158.388889	1.108338452
13 (25)3	162.346831	0.617431038
14 (25)4	134.149548	0.500018207
15 (25)5	137.631231	1.079556277
6 (50)1	49.994547	1.189385342
7 (50)2	131.747074	0.261451249
8 (50)3	142.90668	3.637947839
9 (50)4	164.07276	1.911951194
10 (50)5	45.3183582	0.232641992
1 (100)1	192.756872	0.631965874
2 (100)2	223.058999	1.966288578
3 (100)3	92.8018679	0.635091169
4 (100)4	127.304272	1.718125598
5 (100)5	116.456366	0.163746258

PROMEDIO

	<b>GSH(1000)</b>	<b>GSSG(1000)</b>	<b>GSH/GSSG</b>	<b>GSH+(2*GSSG)</b>
<b>0</b>	0.51159827	0.00357428	162.513272	0.51874684
<b>25</b>	0.90631684	0.00628517	145.663849	0.918887181
<b>50</b>	1.42012963	0.01327294	106.807884	1.446675523
<b>100</b>	1.00970325	0.00667012	150.475675	1.023043495

7 dias		BRADFORD				
Pez		GSH µg/2ml	GSH/ml	µg/ml	COCIENTE	GSH(1000)
16	C1	31.468	15.734	8216	0.00191504	1.91504382
17	C2	46.616	23.308	31642	0.00073662	0.73661589
18	C3	15.747	7.8735	12306	0.00063981	0.63980985
19	C4	34.452	17.226	13296	0.00129558	1.29557762
20	C5	67.501	33.7505	27242	0.00123891	1.23891418
11	(25)1	44.436	22.218	12926	0.00171886	1.71886121
12	(25)2	3.813	1.9065	18192	0.0001048	0.10479881
13	(25)3	39.272	19.636	35856	0.00054763	0.54763498
14	(25)4	43.747	21.8735	11376	0.00192278	1.92277602
15	(25)5	18.272	9.136	16954	0.00053887	0.53886988
6	(50)1	32.501	16.2505	17760	0.00091501	0.91500563
7	(50)2	4.96	2.48	11004	0.00022537	0.22537259
8	(50)3	51.55	25.775	28914	0.00089144	0.89143667
9	(50)4	35.944	17.972	17512	0.00102627	1.0262677
10	(50)5	85.517	42.7585	53102	0.00080521	0.80521449
1	(100)1	19.419	9.7095	18192	0.00053372	0.53372361
2	(100)2	24.813	12.4065	16394	0.00075677	0.75677077
3	(100)3	58.895	29.4475	30526	0.00096467	0.96466946
4	(100)4	96.878	48.439	26374	0.00183662	1.8366194
5	(100)5	11.042	5.521	12926	0.00042712	0.42712363

Pez		GSSG/2ml	GSSG/ml µg/ml	µg/ml	COCIENTE	GSSG(1000)
16	C1	261.764	0.130882	8216	1.59301E-05	0.015930136
17	C2	569.088	0.284544	31642	8.9926E-06	0.008992605
18	C3	219.665	0.1098325	12306	8.92512E-06	0.008925118
19	C4	169.146	0.084573	13296	6.36079E-06	0.006360785
20	C5	838.523	0.4192615	27242	1.53903E-05	0.015390261
11	(25)1	425.951	0.2129755	12926	1.64765E-05	0.01647652
12	(25)2	0.749	0.0003745	18192	2.0586E-08	2.0586E-05
13	(25)3	1343.785	0.6718925	35856	1.87386E-05	0.018738635
14	(25)4	468.05	0.234025	11376	2.05718E-05	0.020571818
15	(25)5	114.417	0.0572085	16954	3.37434E-06	0.003374336
6	(50)1	917.025	0.4585125	17760	2.58171E-05	0.025817145
7	(50)2	4.959	0.0024795	11004	2.25327E-07	0.000225327
8	(50)3	800.634	0.400317	28914	1.38451E-05	0.013845092
9	(50)4	152.36	0.07618	17512	4.35016E-06	0.00435016
10	(50)5	1049.02	0.52451	53102	9.87741E-06	0.009877406
1	(100)1	26.009	0.0130045	18192	7.14847E-07	0.000714847
2	(100)2	194.406	0.097203	16394	5.92918E-06	0.005929181
3	(100)3	148.096	0.074048	30526	2.42574E-06	0.002425735
4	(100)4			26374		
5	(100)5	105.997	0.0529985	12926	4.10015E-06	0.004100147



Pez		GSH/GSSG	GSH+(2*GSSG)
16	C1	120.215156	1.94690409
17	C2	81.9135178	0.7546011
18	C3	71.6864316	0.657660085
19	C4	203.682026	1.308299188
20	C5	80.499879	1.269694699
11	(25)1	104.321859	1.75181425
12	(25)2	5090.78772	0.104839985
13	(25)3	29.2249132	0.585112255
14	(25)4	93.46651	1.963919655
15	(25)5	159.696549	0.545618556
6	(50)1	35.4417818	0.966639921
7	(50)2	1000.20165	0.225823246
8	(50)3	64.3864737	0.919126859
9	(50)4	235.914938	1.034968022
10	(50)5	81.520848	0.824969304
1	(100)1	746.626168	0.535153309
2	(100)2	127.63495	0.768629133
3	(100)3	397.681234	0.969520933
4	(100)4		
5	(100)5	104.17276	0.435323921

PROMEDIO

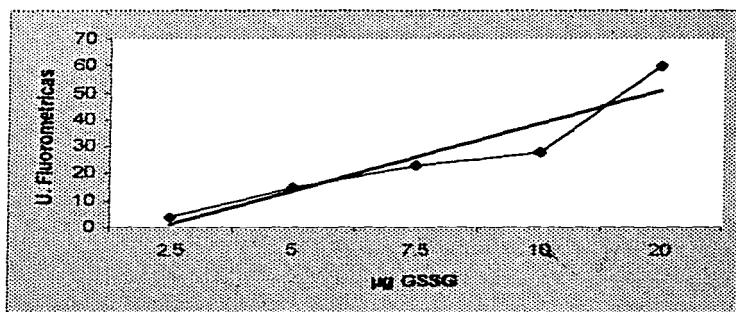
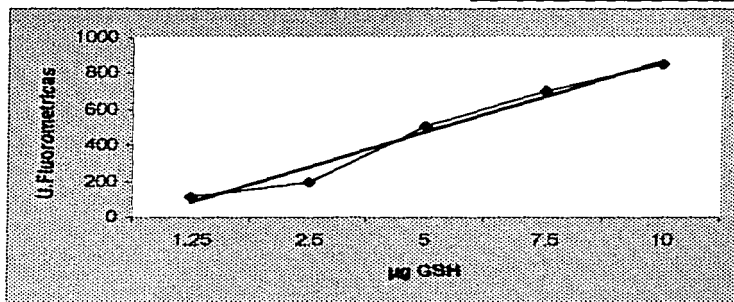
	GSH(1000)	GSSG(1000)	GSH/GSSG	GSH+(2*GSSG)
0	1.16519227	0.01111978	0.00826399	1.18743183
25	0.96658818	0.01183638	0.06127158	0.99026094
50	0.77265942	0.01082303	0.02202472	0.79430547
100	0.90378137	0.00329248	0.01747843	0.67715682

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

Fluorescencia

µg GSH	Fluorometro
10	850
7.5	706
5	505
2.5	198
1.25	118

µg GSSG	Fluorometro
20	60
10	28
7.5	23
5	15
2.5	4



## ANEXO 2

### CROMO EN BRANQUIAS

DIA 3	CONCENTRACION		PESO			ppm/gr SD		RSD
	mg/L	µg/L						
1	0.81		810	0	810	0.81	0.0164	2.02
2	0.62		620	0.95	653	0.65	0.0036	0.59
3	2.56		2560	1.08	2364	2.36	0.0277	1.08
4	0.37		370	0.96	387	0.39	0.0063	1.71
5	0.34		340	0.88	385	0.39	0.0015	0.46
6	0.13		130	1.12	116	0.12	0.0028	2.11
7	0.49		490	0.84	582	0.58	0.0084	1.72
8	0.42		420	1.12	375	0.38	0.0041	0.97
9	1.16		1160	0.87	1335	1.33	0.0103	0.89
10	0.22		220	0.84	261	0.26	0.0035	1.61
11	0.24		240	1.2	200	0.2	0.0041	1.71
12	0.31		310	1.5	207	0.21	0.0034	1.11
13	0.24		240	1	240	0.24	0.0027	1.09
14	0.25		250	1.4	179	0.18	0.0009	0.36
15	2.41		2410	1.2	2008	2.01	0.0157	0.65
16	1.07		1070	1.2	892	0.89	0.003	0.28
17	0.32		320	1.2	267	0.27	0.0032	0.97
18	1.26		1260	1.2	1050	1.05	0.0104	0.82
19	5.35		5350	1.3	4115	4.12	0.013	1.09
20	0.1		100	1.4	71.4	0.07	0.0012	1.21

DIA 7	CONCENTRACION		PESO			SD		RSD
21	0.26		260	0.6	433	0.43	0.0032	1.25
22	0.13		130	0.5	260	0.26	0.0012	0.94
23	0.23		230	0.5	460	0.46	0.0051	2.17
24	0.71		710	0.9	789	0.79	0.0076	1.07
25	0.61		610	0.7	871	0.87	0.0024	0.4
26	0.28		280	0.7	400	0.4	0.0013	0.46
27				1.2				
28	0.14		140	0.9	156	0.16	0.0016	1.13
29	0.25		250	0.5	500	0.5	0.0008	0.3
30	0.22		220	0.6	367	0.37	0.0009	0.44
31	0.61		610	1	610	0.61	0.0041	0.67
32	0.25		250	0.5	500	0.5	0.0066	2.69
33				0.4				
34	0.27		270	0.8	338	0.34	0.0035	1.32
35	0.3		300	0.8	375	0.38	0.0666	2.19
36	0.16		160	0.5	320	0.32	0.0035	2.23
37	0.06		60	1	60	0.06	0.0026	4.3
38	0.54		540	0.6	900	0.9	0.0073	1.36
39	0.28		280	0.7	400	0.4	0.0011	0.41
40	0.22		220	0.8	275	0.28	0.0029	1.34

CONCENTRACION		SD	RSD
4	4	1E-04	0.1
3	2.99	0.028	0.95
1.5	1.5	0.007	0.44
0.5	0.5	3E-04	1.16

PROMEDIO

	dia3	desvest	errorest
0	569.9404762	474.149769	237.074885
25	566.7142857	806.191081	360.539612
50	638.2808111	483.014317	241.507159
100	947.3089822	952.697713	476.348857
	dia7	desvest	errorest
0	391	311.135019	139.14381
25	455.625	85.0857411	42.5428705
50	355.5555556	144.871165	72.4355823
100	562.7301587	257.577684	115.192242

## ANEXO 3

CONCENTRACIÓN	3 DÍAS				7 DÍAS			
	BRADFORD	PROMEDIO	COAGULOS	VESICULA	BRADFORD	PROMEDIO	COAGULOS	VESICULA
0	52698	32090.5	NO	VERDE	8216	18540.4	NO	VERDE
0	33672		NO	VERDE	31642		NO	VERDE
0			NO	VERDE	12306		NO	VERDE
0	28064		NO	VERDE	13296		NO	VERDE
0	13928		NO	VERDE	27242		NO	VERDE
25	2404	12454	SI	OBSCURA	12926	19060.8	SI	OBSCURA
25	6512		NO	OBSCURA	18192		NO	OBSCURA
25	11122		SI	OBSCURA	35856		SI	OBSCURA
25	33916		NO	OBSCURA	11376		NO	OBSCURA
25	8316		SI	OBSCURA	16954		NO	OBSCURA
50	29662	35518.4	SI	OBSCURA	17760	25658.4	SI	OBSCURA
50	95404		NO	OBSCURA	11004		SI	OBSCURA
50	13928		SI	OBSCURA	28914		SI	OBSCURA
50	7540		NO	OBSCURA	17512		SI	OBSCURA
50	31058		SI	OBSCURA	53102		SI	OBSCURA
100	26256	18061.6	SI	OBSCURA	18192	20882.4	SI	OBSCURA
100	11224		SI	OBSCURA	16394		NO	OBSCURA
100	11188		SI	OBSCURA	30526		SI	OBSCURA
100	18392		SI	OBSCURA	26374		NO	OBSCURA
100	23248		SI	OBSCURA	12926		NO	OBSCURA