



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto subletal del Cadmio en el ajolote Ambystoma  
mexicanum: Ritmicidad diaria del metabolismo  
aerobio y respuestas al estrés oxidante

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

Sebastian Vadillo Gonzalez



DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez  
2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Vadillo  
Gonzalez  
Sebastian  
56 88 16 51  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306535099

### 2. Datos del Tutor

Dra  
Ruth Cecilia  
Vanegas  
Pérez

### 3. Datos sinodal 1

Dr.  
Manuel  
Miranda  
Anaya

### 4. Datos sinodal 2

Dra.  
María Eugenia  
Gonsebatt  
Bonaparte

### 5. Datos sinodal 3

Dr.  
Luis  
Zambrano  
González

### 6. Datos sinodal 4

M. en C.  
Sebastián Ricardo  
Zuñiga  
Lagunes

### 7. Datos del trabajo escrito

Efecto subletal del Cadmio en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: Ritmicidad diaria del metabolismo aerobio y respuestas al estrés oxidante  
72 p  
2015

## **DEDICATORIA**

La ecotoxicología es una rama biológica que requiere el uso de organismos vivos para entender procesos de suma relevancia para la biota en su medio natural, altamente contaminado por el hombre. Por esta razón, este trabajo lo dedico a los 324 ajolotes juveniles que fueron representantes esenciales para este estudio. La información generada a partir de este proyecto sin duda da cuenta de la situación de impacto que tiene la contaminación ambiental sobre los organismos en Xochimilco y por ello el acercamiento con estos animales, pudo demostrar daños subletales a niveles de respuestas biológicas relevantes y a la fecha muy poco evaluadas en anfibios (ritmos biológicos). De todo corazón espero que la información de este trabajo pueda ser un fundamento importante para la recuperación de esta especie endémica de México.



## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no podría haberse realizado sin la ayuda y el apoyo de múltiples personas que contribuyeron tanto con el trabajo como sustentaron mi vida cotidiana durante toda su realización. De forma principal quiero agradecer a la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez por su confianza, su capacidad de manejar el tiempo con los estudiantes, su siempre buena disposición y por supuesto su apoyo constante incluso para llevar este trabajo a un congreso internacional y a uno nacional donde fue premiado. Para mí fue un privilegio haber trabajado con ella y haber aprendido lo que significa ser un verdadero científico e investigador. El producto final de este trabajo sin duda dependió de la labor constante entre la doctora y yo; sin embargo, de manera muy importante quiero recalcar la participación del M. C. Sebastian R. Zuñiga Lagunes sin cuyo apoyo y gran paciencia durante todo el desarrollo del trabajo, estoy seguro que nunca se hubiera concluido.

De manera adicional, quiero agradecer a todos mis compañeros estudiantes del Laboratorio de Ecotoxicología de Organismos Acuáticos, a mis compañeros y maestros de la Unidad de Análisis Ambiental y a todo el gran e invaluable apoyo de los estudiantes que realizaron su servicio social durante las fases de mantenimiento y experimental. Entre todos ellos, mi especial agradecimiento a Dulce Jocelyn Bustamante por su participación activa en todo el trabajo y su amistad incondicional. A la vez agradezco a Celeste Hernández de la Rosa, Adriana García Ávila, Yazmin Valenzuela Velazquez, Haydee Rodríguez Alfaro, Liliana González Caballero, al maestro Julio Prieto Sagredo y al maestro Manuel Hernández Quiroz por su apoyo e importante contribución al trabajo. Sin estas personas el esfuerzo para hacer realidad este proyecto hubiera sido 10 veces mayor.

Por otro lado, agradezco al Dr. Manuel Miranda Anaya, a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y al Dr. Luis Zambrano González, miembros del jurado, por los comentarios y correcciones sugeridas para este texto. De manera importante, agradezco el apoyo económico otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto, "Marcadores del estrés oxidante por la exposición al cadmio en el ajolote *Ambystoma mexicanum*: respuestas antioxidantes y regulación de metales esenciales" (IN217014, DGAPA, UNAM).

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que durante 6 años en la Facultad de Ciencias me apoyaron de forma incondicional y, aunque no participaron directamente en el trabajo, sin su cariño esto no podría haber sido posible. Entre estas personas se encuentra mi familia y todos los buenos amigos que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas. En especial agradezco a mis queridas "víboras" y "poderosas" por nunca dejar de estar en contacto a pesar de que no nos veamos todos los días: gracias a Grabis, Josue, Marcorleans, Bere-nice, el compañero, Toño, Fátima, Sandra, Alejandra y Montse, Iván, Karla y Xochilt. Porque los amigos de los primeros semestres sigan siéndolo a pesar de la distancia. Hay muchas personas más que merecen este cálido agradecimiento; sin embargo, el espacio no es suficiente para mencionarlas a todas.

**EFFECTO SUBLETAL DEL CADMIO EN EL AJOLOTE *Ambystoma mexicanum*:  
RITMICIDAD DIARIA DEL METABOLISMO AEROBIO Y RESPUESTAS AL  
ESTRÉS OXIDANTE**

**ÍNDICE**

**Pag.**

---

<b>RESUMEN</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Ritmicidad biológica del metabolismo aerobio en anfibios	1
1.2. Acople del metabolismo aerobio y el balance redox celular	4
1.3. Ritmicidad biológica del balance redox celular en anfibios	7
1.4. Toxicidad del cadmio: alteración de respuestas bioquímicas y fisiológicas	8
1.5. Marco de referencia ambiental: el ajolote <i>Ambystoma mexicanum</i> como modelo experimental	10
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>11</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos particulares	12
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
6.1. Obtención de organismos experimentales	13
6.2. Mantenimiento de organismos experimentales	15
6.3. Exposición subletal al cadmio	16
6.4. Evaluación del efecto tóxico del cadmio	
6.4.1. Ritmicidad diaria de respuestas biológicas	
6.4.1.1. Ritmicidad del balance redox celular- Nivel bioquímico	17
6.4.1.2. Ritmicidad del consumo de oxígeno- Nivel fisiológico	18
6.4.2. Crecimiento e Índices de condición- Nivel fisiológico	20
6.4.3. Concentración de cadmio	
6.4.3.1. Determinación del metal en la solución Holtfreter	20
6.4.3.2. Determinación hepática del cadmio	21
6.4.3.3. Determinación de cadmio en el alimento ( <i>Artemia salina</i> )	21
6.4.4. Análisis estadístico	22

<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1. Parámetros fisicoquímicos	23
7.2. Concentración del cadmio	
7.2.1. Acumulación del cadmio en el hígado	23
7.2.2 . Acumulación del cadmio en el alimento (adultos de <i>Artemia salina</i> )	24
7.2.3 . Concentración del cadmio en el medio externo (Solución Holtfreter)	24
7.3. Efecto tóxico subletal del cadmio	
7.3.1. Nivel Bioquímico: Sistema Glutación	
7.3.1.1. Ritmicidad diaria y alteración de la concentración de Glutación Total (GSH-T), oxidado (GSSG), reducido (GSH) y la razón GSH/GSSG	25
7.3.2. Nivel Fisiológico: Consumo de oxígeno	
7.3.2.1. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno	27
7.3.2.2. Condición Energética	32
7.3.3. Nivel Fisiológico: Tasa de crecimiento e Índices de condición fisiológica	
7.3.3.1. Índices de condición fisiológica	34
7.3.3.1. Tasa de crecimiento	34
<b>8. DISCUSION</b>	
8.1. Parámetros fisicoquímicos y concentración del Cd	36
8.2. Toxicidad del cadmio	
8.2.1. Efecto del cadmio en el balance redox: Nivel bioquímico	
8.2.1.1. Ritmicidad diaria del sistema glutación	37
8.2.2. Efecto del cadmio en el metabolismo aerobio: Nivel fisiológico	
8.2.2.1. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno	42
8.2.2.2. Condición energética	44
8.2.3. Efecto del cadmio en el crecimiento e índices de condición: Nivel fisiológico	45
<b>9. CONCLUSIONES</b>	47
<b>10. LITERATURA CITADA</b>	49
<b>11. ANEXOS</b>	
11.1. Acumulación del cadmio en hígado y alimento (adultos <i>Artemia salina</i> )	59
11.2. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno y del sistema glutación	60
11.3. Periodogramas: Ritmicidad del sistema glutación	62
11.4. Nivel fisiológico: Índices de Condición Fisiológica	63
11.5. Nivel fisiológico: Tasa de crecimiento	64

## RESUMEN

El ajolote *Ambystoma mexicanum* es un anfibio endémico de la cuenca central del valle de México con una distribución restringida en el humedal periurbano de Xochimilco, al sur de la Ciudad de México que además se encuentra en un estado crítico de extinción. La contaminación por metales es reconocida como uno de los factores responsables de la reducción de sus poblaciones. Entre ellos, el cadmio es uno de los metales de mayor importancia dadas sus altas concentraciones ambientales, sobrepasando los límites de la protección a la vida acuática y su conocida toxicidad que incluye, la inducción de estrés oxidante y su efecto neurotóxico. Sin embargo, existen pocos estudios en anfibios que analicen la alteración de respuestas biológicas clave como son los ritmos biológicos, ante conocidos neurotóxicos como el cadmio. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del cadmio sobre la ritmicidad diaria del balance redox celular y el consumo de oxígeno de juveniles de *A. mexicanum*. Los organismos fueron expuestos en un bioensayo semi-estático durante 15 días a 16.8 y 164  $\mu\text{g Cd/L}$ , concentraciones relevantes en su medio natural; un grupo control sin exposición al metal fue considerado. Al término de los ensayos se determinó cada 3 h durante un ciclo de 24 h, los niveles de glutatión a nivel hepático (glutatión total GSH-T; glutatión reducido GSH y oxidado GSSG; razón GSH/GSSG), el consumo de oxígeno de los ajolotes y la concentración hepática de cadmio. Los resultados obtenidos en el grupo control demuestran el patrón unimodal esperado para el metabolismo aerobio, con un periodo de 23.42 h y una acrofase de 10:00 h. No obstante, la exposición subletal al cadmio modificó el ritmo diario del consumo de oxígeno a un patrón bimodal, con periodos de 12.12 y 11.54 h, y acrofases a las 3:00/15:00 y 1:00/11:00 en animales expuestos a 16.8 y 164  $\mu\text{g Cd/L}$  respectivamente. Más aún, en relación a los grupos control, los organismos expuestos al metal presentaron alteraciones notorias en la amplitud metabólica y en el campo de actividad metabólica reflejo de las alteraciones energéticas producto de la exposición al metal. A nivel del balance redox hepático, se registró en el grupo control una ritmicidad diaria similar en GSH-T, GSH, GSSG y GSH/GSSG, sugiriendo además el acople con el patrón diurno del metabolismo aerobio. Sin embargo, la exposición subletal al cadmio alteró la ritmicidad diaria (tanto la magnitud como cambios de fase) y la concentración del sistema glutatión. Los resultados obtenidos confirman el efecto neurotóxico del cadmio en los juveniles de *A. mexicanum* que se expresa en la alteración de la ritmicidad biológica normal del sistema antioxidante del glutatión y del metabolismo aerobio con consecuencias en el estado energético de los organismos debido probablemente a procesos de regulación, compensación y desintoxicación al metal. Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la cronotoxicidad del cadmio en *A. mexicanum* y aportan conocimiento valioso para futuros planes de manejo y conservación de la especie o de la restauración ecológica de su ambiente, la zona lacustre de Xochimilco.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Ritmicidad biológica del metabolismo aerobio en anfibios

Desde el surgimiento de la vida han existido eventos geofísicos con un patrón estable y repetitivo que ejercen una presión selectiva para los organismos. Estos patrones incluyen el fotoperiodo diario, el cambio en las mareas, los ciclos lunares y el movimiento de translación terrestre. Bajo este escenario, los organismos han desarrollado mecanismos bioquímicos, fisiológicos y conductuales que actúan como respuestas adaptativas anticipatorias ante patrones geofísicos constantes. El proceso evolutivo ha permitido la selección de diferentes programas temporales en los organismos para “medir el tiempo” y sincronizar cambios internos con periodos geofísicos externos. La organización temporal de distintas variables internas sincronizadas al medio externo se denominan ritmos biológicos (Pittendrigh, 1981).

Dentro de los ritmos biológicos, el ritmo circadiano asociado al fotoperiodo diario, consecuente del movimiento rotacional terrestre, es uno de los más importantes en la supervivencia de los organismos. Los ritmos circadianos tienen un periodo cercano a las 24 h y poseen propiedades únicas como es su persistencia en condiciones de oscuridad constante, su compensación a la temperatura y su sincronización a la luz. Estas características han demostrado que la organización interna temporal de los organismos tiene un componente genético y es ubicuo en todos los organismos. Sin embargo de manera estricta, un ritmo que ocurre de manera diaria no puede ser reconocido como un ritmo circadiano sin antes haberse evaluado las propiedades anteriormente mencionadas (Vitaterna *et al.* 2001).

Todo el programa temporal circadiano de los organismos se basa en un sistema multioscilariorio con órganos o estructuras específicas capaces de mantener en fase al programa temporal interno y que estas respuestas se mantengan constantes en subsecuentes ciclos (Pittendrigh, 1981). En vertebrados, los osciladores incluyen regiones cerebrales y oculares como son el hipotálamo, la retina y la glándula pineal entre otras estructuras. En los mamíferos, el sistema de osciladores es jerárquico con el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) como oscilador central, el cual impone fase y periodo a osciladores periféricos ubicados en todo el cuerpo (Vitaterna *et al.* 2001). En los vertebrados no mamíferos la organización circadiana ha sido poco estudiada y menos aún en anfibios.

En anfibios existen pocos trabajos donde se registra la presencia de ritmos circadianos y ritmos diarios así como su importancia ecológica como respuestas adaptativas

(Oishi *et al.* 2004). La mayoría de los trabajos realizados en este grupo de vertebrados se ha concentrado en el estudio de la ritmicidad biológica circadiana y diaria a un nivel conductual, más que en los mecanismos que los regulan (Oishi *et al.* 2004). Dolmen (1983) registró los cambios en la actividad diaria de salamandras europeas (*Tritus vulgaris* y *T. cristatus*), dependiendo de la especie, el sexo y la temporada; los resultados que demuestran un patrón bimodal con una mayor actividad en las horas crepusculares. El cambio en los patrones de actividad diaria según la etapa ontogénica, ha sido evaluado en el anuro *Xenopus laevis* y su implicación como programa temporal que favorece la ocupación de nichos distintos entre formas adultas y larvales (Rusak, 1981). Actualmente en anfibios se reconoce un sistema multioscilar circadiano que se compone de distintas estructuras de fotorecepción y modulación de señales nerviosas como son los ojos, el complejo pineal y el hipotálamo. La participación sincrónica de cada una de estas estructuras permite la manifestación de los ritmos circadianos en sus diferentes tipos de salidas (Yoshikawa, 1998). La organización circadiana en anfibios ha sido fundamentalmente analizada en anuros; particularmente se ha establecido en la *Rana catesbiana* que las células retínales actúan como moduladores del ritmo, mientras que estructuras hipotalámicas y del complejo pineal (homólogas al NSQ de mamíferos) actúan como centros de fotorecepción extraoculares de suma importancia para la expresión de la ritmicidad diaria y circadiana (Cadusseau y Galand, 1980).

La actividad diaria es una manifestación temporal de la conducta que involucra diferentes procesos que ocurren a nivel metabólico, asociados a un gasto energético diario (Frisard y Ravussin, 2006). La ritmicidad diaria de múltiples procesos del metabolismo aerobio está acoplada con los ritmos de actividad locomotora diaria que a su vez es regulada por el oscilador central. En mamíferos se ha comprobado que la producción de ATP diaria, la biosíntesis de  $\text{NAD}^+$  y la respiración mitocondrial global tienen una modulación circadiana que está relacionada con el gasto energético y alimentación diaria del organismo (Simon *et al.* 2003; Peek *et al.* 2013). En roedores se ha comprobado que existe un acople muy estrecho de las variables fisiológicas del metabolismo, como es el consumo de oxígeno y el coeficiente respiratorio, con una regulación circadiana (Nagai *et al.* 1985). De manera similar, se ha observado en otros organismos una organización temporal diaria de variables metabólicas que están involucradas con un componente diario de actividad locomotora (Jacopo, 2004). Estas evidencias indican que existe una regulación circadiana que modula la ritmicidad diaria de los procesos relacionados con el metabolismo aerobio desde el nivel

bioquímico hasta el nivel conductual. En anfibios, la ocurrencia de este acople entre la actividad locomotora y variables del metabolismo aerobio aún no está comprobada; sin embargo, se tienen evidencias de la presencia de un ritmo diario en el consumo de oxígeno en *Rana pipiens* (Douglas-Tourney y Hutchinson, 1974).

El consumo de oxígeno representa la cantidad de oxígeno que un animal obtiene de su medio por unidad de tiempo. Esto equivale a la tasa de gasto energético en un tiempo dado y es un indicador de la condición metabólica del organismo (Prosser, 1991). La medición de este indicador metabólico permite evaluar el estado energético del animal y cómo puede verse alterado por la presencia de estresores ambientales. A pesar del número reducido de estudios al respecto, la ubicuidad de la ritmicidad del metabolismo aerobio en muchas especies, lleva a plantear en anfibios la existencia de estas respuestas con una expresión diaria y su vínculo con una organización circadiana.

La presencia de una ritmicidad diaria o circadiana en múltiples niveles de la organización biológica, tiene una importante relevancia en las adaptaciones en un ambiente dinámico y en muchas ocasiones alterado. Estos ritmos permiten un mejor aprovechamiento de espacios para la búsqueda de refugios, forrajeo y evasión de competidores y depredadores, tanto con otras especies como con diferentes estados ontogenéticos de la misma (Morgan, 2004). Las adaptaciones temporales mencionadas permiten una anticipación a cambios ambientales regulares, compartimentalización temporal de ciertas conductas (i.e. actividad locomotora), anticipación de ciertos eventos ontogénicos, selección de nichos e incluso en la contribución de variación fenotípica (De Montaigne *et al.* 2015; Morgan, 2004). En la actualidad, el efecto del deterioro de hábitats y cambios en los ecosistemas producidos por factores antropogénicos, han generado una alteración de distintas variables biológicas esenciales para los organismos que tienen asociado un probable componente de regulación circadiana. En ambientes acuáticos, la introducción de especies exóticas con fines de cultivo, la descarga de contaminantes inorgánicos (i.e. metales) y orgánicos (i.e. compuestos nitrogenados, plaguicidas) y la reducción de hábitats por el crecimiento de zonas urbanas, son variables que pueden incidir en la alteración de respuestas biológicas con una ritmicidad diaria, de suma importancia adaptativa para los organismos.

De tal manera, la evaluación de la ritmicidad diaria de variables relacionadas al metabolismo aerobio será una importante herramienta que pueda vincular un proceso esencial como son los ritmos biológicos y el impacto de alteración por la presencia de

contaminantes en ambientes alterados. Un cambio en la ritmicidad diaria del metabolismo aerobio pudiera generar un efecto directo en los procesos relacionados con la capacidad energética diaria, la síntesis de ATP y en un desacople global de los procesos metabólicos a diferentes niveles de organización biológica (i.e. desacople entre ritmos bioquímicos, fisiológicos y conductuales, relacionados con el metabolismo aerobio).

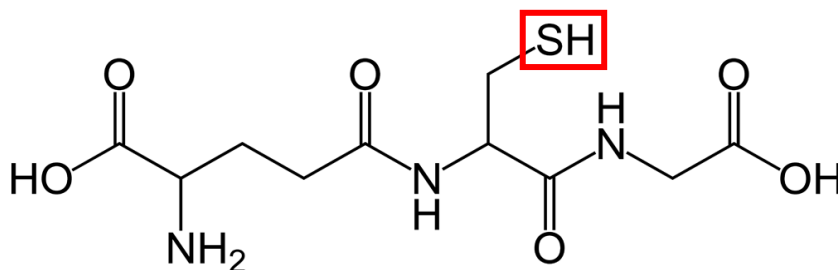
## **1.2. Acople del metabolismo aerobio y el balance redox celular**

El metabolismo aerobio constituye el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren a nivel celular en la mitocondria para la obtención de energía en forma de ATP a partir de la oxidación de las principales biomoléculas como son carbohidratos, lípidos y proteínas (Nelson, 2000). Este sistema metabólico utiliza como último aceptor de electrones al oxígeno y opera con una eficiencia del 98-99%. Durante el proceso metabólico aerobio se generan de manera natural de 1-2% de especies reactivas de oxígeno (ROS), utilizadas en distintas funciones de señalización celular o eliminadas rápidamente por el sistema antioxidante debido a su carácter reactivo (Circu y Aw, 2010).

Los ROS son importantes moléculas que participan en mecanismos de transducción celular ante cambios en el estado oxidante y metabólico del organismo. Las vías de señalización reguladas por los ROS incluyen la proliferación celular (de células normales y cancerígenas), senescencia y migración celular, además de vías de señalización en el sistema inmune y en la respuesta de inflamación (Schieber y Chandel, 2014; Frisard y Ravussin, 2006). Los ROS pueden dividirse en dos grupos según sus propiedades de reactividad: radicales y no radicales. Un ROS radical tendrá al menos un electrón desapareado que podrá reaccionar con otras moléculas donando o robando electrones para obtener una forma estable. En contraste, los ROS no radicales tendrán menor reactividad al tener una restricción de spin que no permita el robo o donación de electrones. Ejemplos de ROS radicales incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ) y al radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), mientras que ROS con baja reactividad del tipo no radical incluye al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Kohen y Nyska, 2002). Los ROS producidos en el metabolismo aerobio suelen formarse como producto de una reducción parcial del oxígeno molecular en la mitocondria para formar el anión superóxido, precursor de otros ROS como el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo. En la mitocondria, la producción de ROS en el metabolismo aerobio ocurre principalmente durante la transferencia de electrones en el complejo III de la cadena transportadora de electrones. Sin embargo existen otros procesos metabólicos celulares que

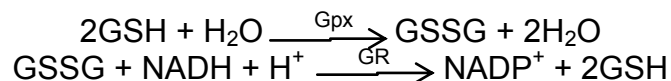
son fuente de ROS como la inducción de NADPH oxidasas y la producción de ROS por complejos enzimáticos del ciclo de Krebs y por reacciones en peroxisomas (Circu y Aw, 2010; Cuypers *et al.* 2010; Frisard y Ravaussin, 2006).

Dentro de la célula, el balance redox es un proceso dinámico que depende directamente de la cantidad de ROS generadas por el metabolismo aerobio y de su regulación y eliminación por el sistema antioxidante (Kohen, 2007). Los antioxidantes son moléculas que tienen como función retardar, prevenir o remover el daño oxidante a una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 1999). La defensa antioxidante incluye moléculas de bajo peso molecular no enzimáticos, enzimas y proteínas quelantes de iones metálicos de transición que se distribuyen en la célula. Dentro de los mecanismos antioxidantes enzimáticos se incluyen las enzimas de participación directa como son la superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y peroxidasas (i.e. glutathionperoxidasa, Gpx) así como enzimas de soporte que proveen equivalentes reductores para reacciones antioxidantes (i.e. G6PD, Xantina oxidasa) (Kohen y Nyska, 2002). El segundo grupo de antioxidantes integra moléculas de bajo peso molecular que interactúan de forma directa e indirecta con los ROS. Dentro de este grupo se incluyen moléculas quelantes como las metalotioneínas que disminuyen el efecto reactivo de los ROS de forma indirecta al enlazar iones metálicos libres que pudieran entrar a reacciones de Fenton y Haber Weiss o bien acoplarse a los grupos SH de otras proteínas alterando su estructura y función (Bell y Valle, 2009). De igual manera se incluyen moléculas de bajo peso molecular que reducen de manera directa el efecto de los ROS al tener la capacidad de donar electrones al radical de oxígeno y cambiar su grado de reactividad (Kohen y Nyska, 2002) como es el caso de glutatión, antioxidante no enzimático de bajo peso molecular que actúa de forma directa como primera línea de defensa contra los ROS en varios tipos celulares (Dickinson y Forman, 2002). Su estructura se basa en la unión de tres aminoácidos esenciales: el glutamato, la cisteína y la glicina (Dickson y Forman, 2002). En el esquema 1 se puede apreciar la estructura del glutatión reducido, la forma química más abundante en las células en balance redox.



Esquema 1. Estructura química del Glutati6n en su forma reducida (GSH). En el recuadro rojo se se~ala el dominio funcional que forma un puente disulfuro durante el ciclo redox con otras mol6culas de GSH (reproducido de Forman *et al.*, 2008).

El glutati6n como antioxidante participa de forma activa en diversos procesos que incluyen la remoci6n de ROS, la reducci6n de per6xidos, la quelaci6n de compuestos electr6filos, la modulaci6n del estado tiol-disulfuro de prote6nas, la regulaci6n de prote6nas transportadoras de ATP y como modulador de la expresi6n g6nica (Beyersman y Hechtenberg, 1997). De entre estas funciones, la reducci6n de per6xidos es la m6s importante l6nea de defensa antioxidante en 6rganos de alta producci6n energ6tica como es el h6gado y bajo condiciones de alta liberaci6n de ROS (Forman *et al.*, 2008; Deneke y Fanburg, 1989). Dos mol6culas de glutati6n en su forma reducida (GSH) son utilizadas como sustrato de la Glutati6n peroxidasa (Gpx) para la reducci6n del  $H_2O_2$ . El resultado de esta reacci6n es la formaci6n de 2 mol6culas de agua y la forma oxidada de la mol6cula de glutati6n (GSSG). En consecuencia a la alta producci6n de ATP y ROS que se genera en 6rganos como el h6gado, el GSSG es reciclado mediante la participaci6n de la enzima Glutati6n Reductasa (GR) y un donador de electrones, el NADPH. En esta reacci6n el GSSG es reducido a su forma GSH y contin6a su funci6n como sustrato de la Gpx. Esta serie de reacciones del glutati6n es conocido como un ciclo redox y tiene una importante funci6n como primera l6nea de defensa antioxidante en condiciones de incremento de ROS (esquema 2). De manera adicional, la funci6n antioxidante del GSH y GSSG est6 acoplado con prote6nas redox como las tiorredoxinas (Trx) que catalizan pasos clave en su ciclo redox. El sistema Tiorredoxina (Trx) es un importante factor de regulaci6n de la funci6n antioxidante del glutati6n al catalizar la reducci6n y rompimiento de las cadenas disulfuro de GSSG a GSH (Circu y Aw, 2010).



Esquema 2. Reacciones dentro del ciclo redox del glutatión (tomado de Forman *et al.*, 2009)

El sistema antioxidante es un factor fundamental para el mantenimiento de un balance redox celular. Sin embargo, múltiples factores pueden alterar este balance y ocasionar una condición de estrés oxidante la cual es definida como la alteración del balance redox por el incremento en la concentración celular de moléculas prooxidantes y la alteración de la capacidad antioxidante celular (Kohen y Nyska, 2002). La condición de estrés oxidante puede surgir tanto por un incremento de ROS que supere la capacidad compensatoria del sistema antioxidante o por el decremento en la concentración celular de moléculas antioxidantes (Luschak, 2011). Entre los estresores reconocidos que inducen una condición de estrés oxidante por la formación directa o indirecta de ROS, destacan los metales (Valko *et al.*, 2005), la luz (Foyer *et al.*, 1994), los pesticidas (Abdollahi *et al.*, 2004) y como producto natural del envejecimiento (Finkel y Holbrook, 2000). Las principales consecuencias que ocurren a nivel celular bajo una condición de estrés oxidante incluyen daños a proteínas (inhibición funcional o daño estructural), daño a lípidos de membranas (lipoperoxidación) y daños al DNA (Frisard y Ravussin, 2006). Los lípidos son las biomoléculas más sensibles al daño oxidante al reaccionar los ROS principalmente con ácidos grasos de membrana (Halliwell y Chirico, 1993). Por otra parte, algunos ROS pueden reaccionar con proteínas para producir fragmentación de cadenas polipeptídicas, peróxidos de amino ácidos, carbonilación de proteínas y la generación de uniones proteína-proteína (Stadtman, 2006). Asimismo, el efecto sobre el DNA del estrés oxidante es consecuencia de la oxidación de azúcares, purinas, pirimidinas por los radicales hidroxilo y su efecto en los sistemas de reparación del DNA (Barzilai y Yamamoto, 2004).

### 1.3. Ritmicidad biológica del balance redox celular en anfibios

La ritmicidad biológica del balance redox celular ha sido estudiada fundamentalmente en vertebrados mamíferos en los que se ha descrito la ritmicidad diaria en la producción de ROS en distintos tejidos, la ritmicidad en el daño celular asociado a estos ROS, en la expresión de genes relacionadas con la respuesta antioxidante y en la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En roedores, insectos, crustáceos, aves,

protozoarios y angiospermas, se ha corroborado a su vez la ritmicidad en la expresión de las principales enzimas antioxidantes, ligada al oxígeno generado por el metabolismo aerobio (Xu *et al.*, 2012; Harderland *et al.*, 2003). De manera particular, en mamíferos roedores se ha evaluado la ritmicidad diaria de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, involucradas en la regulación de la producción de ROS (Agapito *et al.* 1999; Hodoğlugil *et al.*, 1995; Cipolla-Neto *et al.*, 1993; Díaz-Muñoz *et al.*, 1983) así como de moléculas antioxidantes no enzimáticas ligadas con el sistema redox del glutatión como la Gpx y la GR en estructuras cerebrales, el corazón y el hígado (Barlow–Walden *et al.*, 1995; Lapenna *et al.*, 1992; Davies *et al.* 1983; North *et al.*, 1981). En el acocil *Procambarus clarkii* se ha descrito la ritmicidad diaria y circadiana del GSH, GSSG y de la actividad enzimática de GR así como su relación con variables fisiológicas y conductuales como son el consumo de oxígeno y la actividad locomotora, sugiriendo el acople del balance redox celular con respuestas metabólicas y conductuales (Durán-Lizárraga *et al.*, 2001; Fanjul-Morales *et al.*, 1998).

En anfibios, los estudios realizados a la fecha abordan el comportamiento diario de la actividad locomotora en el anuro *X. laevis* (Oishi, 2004) y en los urodelos *Triturus vulgaris*, *T. cristatus* (Dolmen, 1983) y *Cynops pyrrhogaster* (Nagai y Oishi, 1998). La ritmicidad diaria en procesos de reproducción y alimentación han sido abordados en especies de *Triturus* en los que también se ha reportado la ritmicidad diaria de la frecuencia respiratoria (Spurway y Haldane, 1953). No obstante, a la fecha no se han abordado estudios sobre la ritmicidad biológica del balance redox celular, del metabolismo aerobio y de su probable relación y/o acople. Al igual que el comportamiento descrito en otros grupos de vertebrados e invertebrados, es probable que en anfibios también se exprese una ritmicidad del balance redox acoplada al metabolismo aerobio.

#### **1.4. Toxicidad del cadmio: Alteración de respuestas bioquímicas y fisiológicas**

El balance redox celular es modificado por múltiples factores internos y externos como son la temperatura, el deterioro metabólico causado por el envejecimiento y la exposición a xenobióticos como son los fármacos, plaguicidas y metales (Kültz, 2005). Los metales, en específico, se han caracterizado como altamente nocivos para las comunidades acuáticas y, dependiendo de la magnitud y el tiempo de exposición, pueden ocasionar numerosas alteraciones a diferentes niveles de organización biológica. Los metales se definen como compuestos que comparten características como son la densidad, estructura cristalina y su



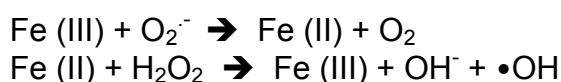
peso molecular. Los metales a su vez pueden subdividirse en metales esenciales y los metales sin una función biológica reconocida (“no esenciales”) que incluyen metales con un elevado potencial tóxico en muy bajas concentraciones (Boyd, 2010).

Los principales metales descritos como de mayor toxicidad para la biota acuática son el Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Ni y Zn (Boyd, 2010). Entre estos, el Zn, Fe y Cu son metales que forman parte de las funciones vitales para la célula como grupos prostéticos de numerosas enzimas o complejos enzimáticos, reguladores de la síntesis de ciertas moléculas (i.e. síntesis de glutatión o proteínas con grupos Fe-S) y como factores clave en la comunicación celular. Sin embargo en elevadas concentraciones, se pierde la regulación homeostática de estos metales y pueden ejercer una acción tóxica (Bleackley y MacGillivray, 2011; Crichton *et al.* 2002). En contraste, metales como el Cd sin una función biológica conocida pueden competir con metales esenciales de la misma valencia debido a su estructura iónica ( $\text{Cd}^{2+}$ ) e inhibir ciertos procesos vitales de la célula (Moulis, 2010).

La elevada toxicidad del cadmio ha sido asociada a su efecto teratogénico, genotóxico, carcinogénico, neurotóxico e inductor de estrés oxidante (Mátovic, 2011). De manera general, la bioacumulación del Cd en organismos en ambientes acuáticos obedece a su concentración, su forma química específica, disponibilidad en el medio (principalmente en forma de ion  $\text{Cd}^{2+}$ ) y a su incorporación por superficies permeables al metal (i.e. branquias, piel, intestino) (Newman y Jagoe, 1996). En un medio acuoso, diversos factores influyen la biodisponibilidad de los metales como la temperatura, el pH, la dureza, la materia orgánica y la competencia con otras moléculas, entre otros (DiToro, 2001). Una vez incorporado el metal es transportado a través de la sangre asociado a proteínas del plasma sanguíneo para posteriormente acceder a órganos blanco donde ocasionan el efecto tóxico (Zalups y Ahmad, 2003).

La alteración del balance redox celular por efecto del cadmio involucra mecanismos directos e indirectos que inducen un desequilibrio en la regulación redox por el incremento en la producción de ROS y la generación de una condición de estrés oxidante celular. Entre los mecanismos de toxicidad directa destaca la competencia del cadmio con metales de valencia semejante (e.g.  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ ), constitutivos estructurales y/o funcionales de moléculas, y una consecuente inhibición de actividades enzimáticas, de señalización o cambio estructural celular en componentes del sistema antioxidante. Esta competencia puede ocasionar a su vez la disrupción en la homeostasis de metales esenciales y el desplazamiento de metales reactivos como Fe y Cu que pueden a su vez ocasionar la

producción directa de ROS por medio de reacciones de Fenton o Haber-Weiss (esquema 3). Por otra parte el cadmio tiene una alta afinidad a moléculas con grupos tioles tales como el glutatión, fundamental en el balance redox celular, y su interacción puede ocasionar un decremento en su concentración y por ende en su rol como antioxidante celular (Eroglu *et al.* 2104). Los efectos tóxicos indirectos del cadmio se asocian con la inhibición de la cadena transportadora de electrones y por la alteración de los niveles de ATP celular (Cuypers, 2010; Moulis, 2010; Frisard y Ravussin, 2006; Wang *et al.*, 2004). De tal manera, la condición de estrés oxidante ocasionada por la alteración del balance redox afecta la estructura y función celular, efectos que repercuten a nivel bioquímico y fisiológico.



Esquema 3. Vía directa de formación de ROS a través de reacciones de Fenton por metales esenciales como el hierro (Stohs y Bagchi, 1995).

El efecto de la exposición al cadmio sobre el balance redox celular en anfibios ha sido poco estudiado aunque se reconoce su participación en la alteración de la concentración de antioxidantes como el glutatión y la inducción de metalotioneínas, una molécula importante en los procesos de desintoxicación de metales (Drobovoljic *et al.* 2012; Sura *et al.* 2006).

Los trabajos dirigidos al estudio del efecto de tóxicos ambientales como el cadmio sobre la ritmicidad biológica se reconocen bajo el estudio de la cronotoxicología (Cambar *et al.* 1992). No obstante son limitados los estudios que abordan el efecto de tóxicos ambientales sobre la expresión circadiana de respuestas funcionales y nulos los estudios efectuados en anfibios. En roedores y en humanos, se plantea el efecto disruptor neuro-endocrino del cadmio sobre el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (Lafuente, 2013; Jiménez-Ortega *et al.*, 2012), donde particularmente el hipotálamo y la hipófisis son regiones relacionadas con la señalización neuronal (Lafuente, 2013). La acción disruptora del cadmio altera la ritmicidad de la expresión de numerosas respuestas funcionales como la reproducción y el metabolismo, (Lafuente, 2013) así como la expresión rítmica de numerosas enzimas involucradas en el balance redox celular y de la peroxidación lipídica en roedores (Jiménez-Ortega *et al.*, 2012). Dado que muchas de las funciones ligadas con el metabolismo aerobio (i.e. consumo de oxígeno) (Jacopo, 2004) y el mantenimiento del balance redox están sujetas a una organización circadiana (Harderland *et al.* 2003) resulta posible sugerir que el

cadmio altere la expresión de la ritmicidad biológica de estas respuestas también en anfibios.

### **1.5. Marco de referencia ambiental: el ajolote *Ambystoma mexicanum* como modelo experimental**

El ajolote *Ambystoma mexicanum* es un anfibio endémico de la cuenca del valle de México con una distribución actualmente restringida al Lago de Xochimilco. Esta especie de urodelo es reconocida principalmente por su capacidad de regeneración de extremidades, cola, células nerviosas y cardíacas, además de su condición neoténica (Robles-Mendoza, 2011). Su hábitat natural se compone de una extensión de humedales constituidos por una serie de canales e islas artificiales llamadas chinampas. Desde 1989 el lago de Xochimilco es considerada por la UNESCO como patrimonio mundial cultural y natural, y en 2004 como un sitio RAMSAR por su importancia como región de mantenimiento y sustento de biodiversidad (Rodríguez-Evangelista, 2011). A la fecha el ajolote es considerado una especie en peligro crítico de extinción y protegido por la norma mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001.

La reducción de las poblaciones del ajolote es consecuencia de múltiples factores relacionados con el crecimiento urbano no regulado de la ciudad de México, la introducción de especies exóticas que actúan como depredadores y competidores, y la tecnificación de las actividades agrícolas de la zona. La descarga de aguas residuales y el aporte de agroquímicos por escorrentía contribuye a la recepción en la zona lacustre de múltiples contaminantes entre los que destacan residuos de nitrógeno amoniacal, cloro residual libre, nitratos, trihalometanos, fármacos, coliformes totales y fecales, estreptococos, organofosforados y metales (Díaz-Torres *et al.*, 2013; Robles-Mendoza *et al.*, 2011; Rodríguez-Evangelista, 2011; González-Rendón, 2006; Zambrano, 2004; Mazari-Hiriart *et al.*, 2001;).

Estudios recientes en la zona lacustre de Xochimilco denotan que las concentraciones de metales (incluido el cadmio) en agua, sedimento y ajolote, sobrepasan los niveles de protección para la biota acuática (González Rendón, 2006). Asimismo, se ha demostrado en estudios *in situ* que los ajolotes están sometidos a un severo estrés oxidante ocasionado en parte, por la exposición crónica a metales (Rodríguez-Evangelista, 2011). Dadas las concentraciones de metales registradas en el hábitat natural del ajolote y en

particular del cadmio, es justificable considerar la posibilidad del efecto tóxico que pudiera generar este metal sobre respuestas relevantes como son los ritmos biológicos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto tóxico del cadmio altera múltiples funciones fisiológicas a través de su interacción con los componentes de la célula. La toxicidad del metal se relaciona con la generación de ROS por mecanismos indirectos y directos que inducen un estrés oxidante celular. De manera directa el Cd puede afectar las vías que regulan el estado redox celular y la síntesis de los múltiples antioxidantes (Moulis, 2010). Uno de los principales órganos blanco del Cd es el hígado el cual desempeña un papel esencial en el metabolismo de los organismos y por ello posee la concentración más alta de antioxidantes como el glutatión. Diversos estudios han demostrado que existe una ritmicidad circadiana asociada a componentes del ciclo redox del GSH (Duran-Lizárraga *et al*, 1998) y con ello una probable organización circadiana que depende de una señalización desde estructuras cerebrales hacia osciladores periféricos como es el hígado (Lafuente, 2013).

El cadmio es reconocido como un importante neurotóxico que puede estar involucrado en la inhibición de la señalización que permite la ritmicidad biológica circadiana (Lafuente, 2013). Un efecto a éste nivel puede determinar una alteración de importantes funciones biológicas como es la locomoción o el gasto energético diario. Adicionalmente el cadmio es un importante inductor de estrés oxidante. De tal manera, en organismos acuáticos, el cadmio puede ocasionar alteraciones a nivel hepático en el estado redox celular y un cambio en las concentraciones de antioxidantes como el glutatión. A su vez, el cadmio puede jugar un papel importante como disruptor de la ritmicidad biológica y ocasionar una alteración en los procesos de asignación energética global en los individuos. Una alteración en la ritmicidad biológica de los organismos conlleva una desventaja adaptativa y una probable reducción de su desempeño en su medio natural.

De tal manera, si las concentraciones de cadmio en Xochimilco, el hábitat natural del ajolote *Ambystoma mexicanum* son responsables de la inducción de estrés oxidante en tejidos hepáticos (Rodríguez-Evangelista, 2011), es probable que en una exposición subcrónica estos efectos sean perceptibles bajo la alteración de procesos rítmicos a nivel fisiológico. El presente trabajo plantea evaluar en juveniles de *A. mexicanum* el efecto subletal del cadmio sobre variables bioquímicas y fisiológicas relacionadas con el balance

redox celular y el metabolismo aerobio que expresan una ritmicidad biológica (diaria o circadiana) en otros organismos.

### 3. HIPÓTESIS

El consumo de oxígeno utilizado en el metabolismo aerobio diario de *A. mexicanum* presentará una ritmicidad diaria como ha sido descrito en otros organismos acuáticos (i.e. peces y anfibios).

Si el metabolismo aerobio genera ROS con una periodicidad diaria y su concentración se encuentra regulada por el sistema antioxidante, entonces se espera que exista una ritmicidad cercana a las 24 h en las respuestas antioxidantes del balance redox celular.

Si la exposición subletal al cadmio ocasiona una condición de estrés oxidante en *A. mexicanum*, entonces se espera una alteración en la ritmicidad diaria del glutatión, un biomarcador del balance redox celular.

Si el ajolote se encuentra en una situación de estrés oxidante ocasionada por la exposición subletal al Cd, entonces se esperan cambios en su metabolismo diario de rutina a partir de alteraciones en los parámetros de ritmicidad diaria y de parámetros energéticos.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto subletal del cadmio sobre la ritmicidad del metabolismo aerobio y respuestas al estrés oxidante en juveniles de *Ambystoma mexicanum*.

#### 4.2. Objetivos Particulares

- Caracterizar la ritmicidad diaria del balance redox celular del ajolote *A. mexicanum* a través de la determinación de indicadores bioquímicos del estado redox como son Glutatión total (GSH-T), reducido (GSSG), oxidado (GSH) y la relación GSH/GSSG.
- Evaluar la ritmicidad diaria del metabolismo aerobio de *A. mexicanum* a través de la determinación del consumo de oxígeno en un ciclo de 24 h.
- Evaluar en *A. mexicanum* el efecto subletal del cadmio sobre la ritmicidad diaria del metabolismo aerobio y biomarcadores de estrés oxidante.
- Analizar probables relaciones de causalidad entre las alteraciones biológicas evaluadas y la bioacumulación hepática del cadmio.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El estudio de los ritmos biológicos en animales se ha centrado principalmente en delimitar oscilaciones que están ligadas a patrones conductuales (e.j. locomoción), alimentación, secreciones hormonales o la expresión genética de proteínas relacionadas con el metabolismo (Oishi *et al.*, 2004; Harderland *et al.*, 2003; Rutler *et al.* 2002). Los organismos modelo han sido por lo general mamíferos, en específico roedores, dada su fácil disponibilidad, manejo y el interés filogenético que les vincula con el hombre. En contraste, pocos estudios se han realizado en otros organismos vertebrados no mamíferos como son los anfibios. Conocer el comportamiento de distintas variables fisiológicas en anfibios en un contexto de ritmicidad biológica permite obtener información valiosa de sus adaptaciones en ambientes altamente deteriorados por las actividades humanas. Adicionalmente el estudio en formas juveniles permitirá a la vez conocer si estas variables adaptativas difieren dependiendo del estado de desarrollo.

Los estudios de esta naturaleza en anfibios adquieren importancia ya que estos organismos son particularmente sensibles a tóxicos ambientales y han sido categorizados como indicadores y/o monitores idóneos de contaminación acuática. No obstante, a la fecha no se han realizado estudios en anfibios que aborden el efecto de los metales sobre los ritmos biológicos, particularmente del balance redox celular y su probable relación con el metabolismo aerobio. Una visión más clara del efecto cronotxicológico de los metales es necesaria para conocer el impacto de las actividades humanas en estos grupos, altamente susceptibles a cambios ambientales y con una importancia ecológica relevante.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de organismos experimentales

Los juveniles de *Ambystoma mexicanum* utilizados en las pruebas experimentales se obtuvieron a partir de dos puestas de reproductores de la colonia de la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, UNAM. Los ajolotes reproductores son mantenidos en condiciones de cultivo bajo un fotoperiodo 12:12 L:O, en un sistema de recirculación cerrado, termoregulado (Marine Biotech®, X-MOD system; Lifeguard Heater module Modelo AF-9252), acondicionado con filtros mecánicos (de 5 a 20 µm) y químicos (carbón activado), esterilizador de UV y un biofiltro. Este sistema permite mantener una calidad de agua idónea para el mantenimiento de los organismos. En este sistema se mantienen controlados y en valores óptimos los niveles de amonio, oxígeno disuelto (OD), salinidad y pH. El medio de mantenimiento de los ajolotes es la solución Holtfreter (SH), constituida por diversas sales que proveen a los organismos de un medio isosmótico ideal para su crecimiento, desarrollo y/o mantenimiento (Armstrong *et al.*, 1989). El agua del sistema de mantenimiento recircula a peceras de 30 L en las que se alberga un adulto por pecera.

Durante el mantenimiento de los reproductores la alimentación se basa en charales (*Chirostoma sp.*), *Tubifex sp.*, pavo orgánico y adultos de *Artemia salina*, alimento obtenido con distribuidores comerciales y el cual aporta un contenido nutrimental y energético adecuado para su mantenimiento y reproducción (Robles-Mendoza *et al.*, 2009). El alimento vivo (charales y tubifex) es desinfectado 48 h antes de alimentar a los ajolotes con una solución de azul de metileno (All Blue, Biomaa®) y verde de malaquita (Green Bac, Biomaa®) para evitar una probable transmisión a través del alimento de parásitos que ponga en riesgo la salud de los organismos (Robles-Mendoza *et al.*, 2009). El proceso de reproducción de los ajolotes fue realizado acorde a lo descrito por Armstrong *et al.* (1989). Se acondicionaron dos acuarios de 80 L y en cada uno de los cuales se colocaron 2 machos y una hembra. En cada acuario se colocaron rafias de color verde para simular la vegetación acuática donde la hembra pueda ovopositar. La temperatura se redujo a 15 °C para promover la reproducción y los acuarios fueron cubiertos con plásticos negros para evitar cualquier disturbio externo. Se realizó el seguimiento de los reproductores durante 4 d observando su conducta general y reproductiva, el tamaño y enrojecimiento de la cloaca de las hembras, la deposición de espermátóforos por los machos y su incorporación por parte de las hembras; cada día se realizaron cuatro revisiones de 2 h cada una. Durante el periodo de reproducción no se alimentó a los ajolotes para evitar su distracción con el

alimento o que pudieran interrumpir el proceso reproductivo. Una vez que la hembra incorporó los espermatozoides, los machos se transfirieron a los acuarios de mantenimiento. De igual manera, una vez que las hembras ovopositaron se transfirieron a los acuarios de mantenimiento.

Dado el procedimiento experimental se requirió realizar dos eventos reproductivos (Serie 1 y Serie 2), con dos meses de diferencia entre ellos. La ovoposición de la Serie 1 ocurrió el 15 de febrero de 2013 con una duración de 10 a 12 h; al término de esta se realizó el conteo de huevos y se determinó el porcentaje de huevos viables. De 471 huevos ovopositados, 448 lograron eclosionar mientras que 23 presentaron arresto en algún estadio del desarrollo que no permitió su correcta formación; así la viabilidad fue del 95.11%. La ovoposición de la Serie 2 se llevó a cabo el 26 de abril de 2013 con una duración de 8 h aprox. Se obtuvieron 299 huevos de los cuales 166 eclosionaron (viabilidad del 68.31%). Los huevos inviables de ambas series fueron desechados y los viables fueron colocados en acuarios de eclosión.

## **6.2. Mantenimiento de organismos experimentales**

Los huevos de cada serie se mantuvieron en acuarios de eclosión con solución Holtfreter (SH) al 100% (Robles-Mendoza, 2009), aeración constante suave, sin flujo de agua, a 19°C y con recambio diario del 80% de SH. Diariamente se monitoreó el desarrollo embrionario de los huevos a partir de la revisión de 5 huevos seleccionados al azar y analizados bajo el microscopio estereoscópico (Iroscope MOD.N2-14). Cada día se estimó el estadio de desarrollo de los embriones de acuerdo a las características morfológicas embrionarias propuestas por Schreckenber y Jacobson (1975) para *Ambystoma mexicanum*. La eclosión de las primeras larvas de las dos series se presentó a los 10-13 d; de tal manera el periodo de desarrollo embrionario de *A. mexicanum* fue similar al señalado por Schreckenber y Jacobson (1975). Cabe señalar que el proceso de eclosión no ocurrió en un solo evento sino de forma escalonada con eclosión progresiva de larvas durante 5 días.

Las larvas eclosionadas se transfirieron a acuarios de crecimiento, integrados al sistema de mantenimiento de flujo continuo de los adultos. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron similares a los descritos previamente para el mantenimiento de los adultos de la especie. La densidad de larvas se mantuvo en un máximo de 16 organismos por acuario de 30 L con el fin de evitar el canibalismo propio de la especie y el efecto de la densidad



sobre la tasa de crecimiento. Las larvas se alimentaron diariamente con nauplios de *Artemia salina* (500 nauplios/larva) de acuerdo a los requerimientos energéticos del estadio (Robles-Mendoza *et al.*, 2009; 2011).

Durante el periodo de crecimiento de las larvas se realizaron múltiples eventos de separación para reducir la densidad de los organismos en los acuarios y disminuir el canibalismo propio del estadio y de la especie. A los 53 (serie 1) y 60 d (Serie2) de edad de los organismos se observó el desarrollo de las extremidades anteriores y posteriores que caracteriza el inicio de la etapa juvenil (Nye *et al.* 2003). Los ajolotes juveniles se mantuvieron en acuarios de 30 L en una densidad de 10 a 12 organismos por acuario. La alimentación diaria consistió en una dieta a base de Artemia adulta (*Artemia salina*, 300 artemias/ajolote) y tubifex *ad libitum* (*Tubifex* sp.) (Robles-Mendoza *et al.*, 2009). Durante todo el periodo de crecimiento y mantenimiento de las larvas y juveniles, cada semana se registraron parámetros morfométricos de una submuestra de 12 organismos por acuario incluyendo el peso (g PH), la longitud patrón (región bucal hasta cloaca; LP, mm) y la longitud total (región bucal a punta posterior de cauda; LT, mm) utilizando una balanza analítica (Sartorius® CP224 S) y un vernier digital, respectivamente. Cabe señalar que durante el periodo de mantenimiento de los organismos, los parámetros fisicoquímicos del medio se mantuvieron similares a los descritos previamente para el mantenimiento de los adultos de la especie.

### **6.3. Exposición subletal al cadmio**

La determinación del efecto subletal del cadmio sobre la ritmicidad diaria de indicadores del estado redox celular (nivel bioquímico) y del consumo de oxígeno (nivel fisiológico) se realizaron en los organismos provenientes de las Series 1 y 2, respectivamente. En estos últimos, se evaluó además la acumulación hepática del metal.

La exposición subletal al cadmio se efectuó en juveniles de 131 d de edad (Serie 1) y 132 d de edad (Serie 2). En ambas series, los organismos fueron expuestos durante 15 días a dos concentraciones subletales de cadmio, relevantes en su medio natural: 20 y 200 µg Cd/L (Rodríguez-Evangelista, 2011; Mouchet *et al.*, 2006). Un grupo sin exposición al metal se consideró como grupo control. Por cada concentración experimental se expuso el siguiente número de organismos (Tabla 1):

Tabla 1. Condiciones experimentales (concentraciones nominales;  $\mu\text{g Cd/L}$ ) y número total de muestras por serie experimental.

	0 $\mu\text{g Cd/ L}$	20 $\mu\text{g Cd/ L}$	200 $\mu\text{g Cd/ L}$	N Total
<b>Serie 1</b> (Nivel Bioquímico)	90	90	90	270
<b>Serie 2</b> (Nivel Fisiológico)	18	18	18	54

Para la serie 1 los 90 organismos por condición experimental fueron divididos en 5 acuarios de 16 L ( $n=18$  organismos/16L). Para la serie 2, los 18 organismos por condición experimental se dividieron en 2 acuarios de 16 L. En cada caso, los organismos fueron seleccionados al azar del sistema de mantenimiento, se transfirieron a los acuarios experimentales respectivos con solución Holtfreter y se mantuvieron 24 h sin alimento previo a la exposición.

Para la exposición al Cd se utilizó una solución madre de  $\text{CdCl}_2$  correspondiente a 640 mg Cd/L. En los acuarios de exposición, 24 h posteriores a la transferencia de los organismos, se adicionó el volumen requerido de la solución madre de  $\text{CdCl}_2$  para obtener las concentraciones experimentales del metal. Durante el periodo de exposición subletal al cadmio de 15 d, cada 2 d se efectuó el recambio del 50 o 75% del volumen del agua de los acuarios para eliminar la acumulación de productos de excreción que pudieran resultar tóxicos para los organismos y se adicionó el volumen correspondiente de la solución madre de  $\text{CdCl}_2$  para mantener las concentraciones experimentales del metal deseadas.

A lo largo del bioensayo subcrónico de 15 d, diariamente se registraron y mantuvieron constantes los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y oxígeno disuelto (Hanna Instruments® modelo HI83141; YSI® modelo 54A); además, se tomaron muestras de agua antes y después de los recambios del medio para determinar las concentraciones de amonio por el método de azul de Indofenol (Rodier, 1981). Los juveniles fueron alimentados *ad libitum* cada 2 o 3 d con *Artemia salina* adulta (300 artemias por ajolote); las artemias no consumidas se removieron y se desecharon. El periodo de alimentación fue de 2 h para controlar la probable incorporación del metal a través de la dieta. Durante el periodo de exposición se tomaron muestras de agua de los acuarios experimentales para determinar la concentración real del cadmio (ver 6.4.3.1). Paralelamente se realizaron pruebas de acumulación de Cd en las artemias suministradas

como alimento a los juveniles para determinar la concentración del cadmio potencialmente incorporado por los ajolotes a través de la dieta (ver 6.4.3.3.).

## **6.4. Evaluación del efecto tóxico del cadmio**

### **6.4.1. Ritmicidad diaria de respuestas biológicas**

#### **6.4.1.1. Ritmicidad del balance redox celular - Nivel Bioquímico**

El efecto subletal del cadmio sobre el balance redox celular se evaluó mediante la determinación hepática del sistema glutatión como biomarcador de efecto oxidante del cadmio. Al término del periodo de exposición al cadmio se diseccionaron organismos de la serie 1 cada 3 h a lo largo de un ciclo de 24 h. Se seleccionaron al azar 10 ajolotes de cada condición experimental para la disección del hígado. Las disecciones se realizaron en los tiempos zeitgeber (ZT) de: ZT0=14h, ZT3=17h, ZT6=20h, ZT9=23h, ZT12= 2h, ZT15= 5h, ZT18= 8h, ZT21=11h y ZT24=14h. Los registros en la fase de oscuridad (19:00 a 7:00 h) se realizaron bajo luz roja para evitar alteraciones en la actividad normal de los ajolotes. A lo largo del ciclo de 24 h se tomaron los parámetros morfométricos de peso (g PH), longitud total (LT, mm) y longitud patrón (LP, mm) previos a la disección. Posteriormente los organismos fueron sacrificados mediante un corte cefálico después de un periodo de inmovilización en hielo para anestesiarse al organismo. El hígado se disectó en frío, se pesó (g PH), se enjuagó con solución fisiológica para anfibios y se congeló a -60°C (Thermo Forma - 86C ULT Freezer) para el posterior análisis de la concentración hepática de glutatión.

El contenido de Glutatión oxidado (GSH) y reducido (GSSG) se realizó de acuerdo a Griffith (1980) y Baker (1990) en un mínimo de 0.01 g PH de hígado, procedimiento que se describe ampliamente en Vanegas *et al.* (2015). La prueba se basa en la reacción del GSH con la solución de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro benzoico (DTNB)) reduciéndolo a TNB; la velocidad de reducción es proporcional al contenido de GSH donde el producto puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 412 nm. La concentración de Glutatión Total (GSH-T = GSH + GSSG) se evalúa determinando la velocidad de reducción del DTNB por el Glutatión en un sistema donde hay constante reducción del GSSG a GSH por la Glutatión reductasa (GR). Para determinar el Glutatión oxidado (GSSG) se debe derivatizar (bloquear) el GSH con el compuesto 2-vinilpiridina (2-VP) quedando sólo el GSSG con lo cual la velocidad de reducción del DTNB es menor. La diferencia entre el Glutatión total (GSSG + GSH) y el GSSG evaluado permite calcular la concentración de GSH.

Brevemente, para la evaluación del glutatión, las fracciones de hígado se homogenizaron en frío (Daigger® Bio Vortexer Mixer 1083-MC) con Ácido Sulfosalicílico (ASS) al 5% en una dilución 1:5. Posteriormente se incubaron en el mismo ASS durante 20 min y se centrifugaron (Eppendorf® centrifuge 5417 R) a 20000 G por 10 min a 5°C. Se separó el sobrenadante en tubos eppendorf y se tomó una alícuota que se diluyó a 1:40 con agua desionizada, dilución para el análisis de GSH y GSSG.

Para la evaluación del contenido de GSH-T y GSSG, se preparó una curva patrón a partir de un estándar de 4 µg GSSG/ml (0 a 3.265 µM GSSG; 0 a 6.529 µM GSH). Para la cuantificación de GSSG, previamente se efectuó una derivatización del GSH con (2-VP) durante 60 min a temperatura ambiente en las submuestras experimentales y de la curva patrón de GSH. Tanto las muestras experimentales y las curvas estándar (con y sin derivatización del GSH) se colocaron por triplicado en una microplaca de 96 pozos y se les adicionó la mezcla de reacción (DTNB 1mM, NADPH 1 mM, Buffer fosfatos, GSH reductasa). Las muestras fueron leídas a 412 nm (BIORAD, modelo xMark). La concentración de Glutatión reducido (GSH) se obtuvo por la diferencia del GSH-T y su correspondiente GSSG. Los resultados de GSH-T, GSH y GSSG se expresaron en µmoles/mg PST. La concentración de proteína soluble total (mg PST/ml) en el tejido se realizó por el método de Bradford (1976).

#### *6.4.1.2. Ritmicidad del consumo de oxígeno – Nivel Fisiológico.*

El metabolismo aerobio de rutina se evaluó a través del consumo de oxígeno ( $V_{O_2}$ ) en un ciclo de 24h, en sistemas respirométricos de flujo semicontínuo, un sistema por concentración experimental de cadmio (0, 20 y 200 µg Cd/ L). Cada sistema constó de 10 cámaras de 700 ml conectadas a un sistema de distribución de agua con flujo regulado y constante de agua independientes entre sí. En cada sistema respirométrico se mantuvieron las mismas características del medio de exposición de los ajolotes. Por condición experimental, en nueve cámaras se colocó un organismo; la cámara restante sin organismo se utilizó como control para corregir el probable consumo de oxígeno de otros organismos (i.e. microorganismos) que pudieran estar suspendidos en el agua.

Al término de la exposición al cadmio de 15 d, se transfirieron al azar 9 organismos de cada condición experimental a cada sistema respirométrico. Los organismos permanecieron 2 h previas de aclimatación. El consumo de oxígeno se evaluó cada 3 h

durante un ciclo de 24 h. En cada periodo de medición, la concentración del oxígeno disuelto (OD) en el medio se determinó con un electrodo polarográfico (YSI® Modelo 5000), mediante la diferencia en la concentración de OD antes y después del cierre de las cámaras. Ente el cierre y apertura de cámaras se dejó un periodo de 1 h y se restableció el flujo del agua antes de la siguiente medición. Los registros se efectuaron en los ZT de: ZT0=14 h, ZT3=17 h, ZT6=20 h, ZT9=23 h, ZT12= 2 h, ZT15= 5 h, ZT18=8 h, ZT21=11 h y ZT24=14 h. Los registros en la fase de oscuridad (19:00 a 7:00 h) se realizaron bajo luz roja para evitar alteraciones en la actividad normal de los ajolotes. La tasa del consumo de oxígeno se calculó de acuerdo a la fórmula (Cech, 1990):

$$VO_2 = ((OD_f - OD_i) * V) * h / P$$

donde:

**VO<sub>2</sub>** = tasa del consumo de oxígeno de cada ajolote; mg O<sub>2</sub>/h/g PH

**OD<sub>f</sub>, OD<sub>i</sub>** = concentración del oxígeno disuelto en las muestras de agua al inicio (i) y término (f) del cierre de las cámaras; mg O<sub>2</sub>/L

**h**= horas

**V** = volumen de la cámara respirométrica; L

**P** = peso de los organismos; g PH

Al término del ciclo de 24 h se tomaron los parámetros morfométricos de peso (g PH), longitud total (LT, mm) y longitud patrón (LP, mm). Posteriormente se disectó el hígado de los ajolotes de manera similar a la descrita previamente (6.4.1.) y se congelaron a -60°C para el análisis posterior de la concentración de cadmio (ver 6.4.3.1).

#### 6.4.1.3. Condición energética

A partir de los resultados obtenidos del consumo de oxígeno de los organismos en un ciclo de 24 h se calcularon los parámetros de amplitud metabólica y campo de actividad metabólica los cuales dan cuenta de la condición energética de rutina de los organismos (Rosas *et al.* 1991). Para ello, los resultados obtenidos del consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/h/g PH) se transformaron en Joules/h/g PH (14.3 J/mg O<sub>2</sub>) (Randall *et al.* 2002). La amplitud metabólica (AM; J/h/g PH) representa el uso energético diario de los organismos y se calculó por la diferencia entre los valores menores y superiores del consumo de oxígeno de los organismos en un ciclo de 24 h. El campo de actividad metabólica (CAM; J/g PH) denota

la capacidad energética global de los organismos en un ciclo de 24 h y se calculó por la integración de los resultados obtenidos de la tasa metabólica (área bajo la curva) en un ciclo de 24 h (Rosas *et al.*, 1991).

#### **6.4.2. Crecimiento e Índices de condición – Nivel Fisiológico**

El efecto de la exposición al cadmio se evaluó a través de indicadores integrales del desarrollo de los organismos como son el crecimiento y los índices de condición de Foulton (IF) y el Hepatosomático (IH) (González Rendón, 2006; Nash *et al.* 2006).

La tasa de crecimiento de los ajolotes expuestos en las diferentes condiciones experimentales se obtuvo mediante valores obtenidos al inicio y al término del periodo de exposición. Para ello se consideró al peso como principal indicador del crecimiento. El procedimiento se realizó para las dos series experimentales y los resultados se expresaron en mg PH/d.

El Índice de Foulton (IF, %) describe la condición global fisiológica del organismo. Se calculó a partir de la relación del peso (mg PH) y la longitud patrón (mm LP) de los organismos ( $IF = \text{peso}/\text{longitud}^3$ ). El Índice Hepatosomático (IH, %) se calculó mediante la relación entre el peso del hígado (mg PH) y el peso (mg PH) del organismo ( $IH = \text{peso hígado}/\text{peso organismo} \times 100$ ).

#### **6.4.3. Concentración del cadmio**

##### **6.4.3.1. Determinación del metal en la Solución Holtfreter**

Para corroborar que la concentración de cadmio en cada condición experimental se mantuviera constante durante los 15 d de exposición, se tomaron muestras de 15 ml del medio (Solución Holtfreter) en tubos plásticos de 20 ml, antes y después del recambio de agua del medio. En cada caso se tomaron muestras completas (sin filtrar) y muestras filtradas por membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore®), para determinar la concentración total y la fracción soluble biodisponible del metal en el medio, respectivamente. Todas las muestras se acidularon con 100  $\mu\text{l}$  de ácido nítrico al 70% redestilado (CAS 7697-37-2) y se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis.

La determinación de cadmio en el medio se realizó en muestras seleccionadas al azar por condición experimental a partir del análisis multielemental por medio de la técnica de espectrofotometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (Thermo Scientific™

iCAP<sup>TM</sup> QICP-MS), en el Laboratorio de ICP-MS en el Instituto de Geofísica UNAM. Para el análisis se empleó al indio como estándar interno y el ácido nítrico como blanco reactivo. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g Cd/L}$ .

#### 6.4.3.2. Determinación hepática de cadmio

Las muestras de hígado disectadas de los organismos provenientes de la serie 2 se procesaron para la determinación de la concentración de cadmio acumulada. Cada muestra se colocó en tubos plásticos de 15 ml y se les adicionó 5 ml de ácido nítrico al 70% redestilado para su digestión en frío durante 15 d a temperatura ambiente. Tras este periodo, los tejidos digeridos fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millipore®) en tubos plásticos de 5 ml; se tomó una alícuota de  $700 \mu\text{l}$  del filtrado y se diluyó en 10 ml de agua desionizada (modificado de Pazos-Mandujano *et al.*, 2012). La cuantificación hepática del cadmio se realizó a partir del análisis multielemental por medio de la técnica de ICP-MS. Se utilizó como material de referencia el DORM4 (National Research Council Canada, 2012), el Indio como estándar interno y el ácido nítrico como blanco reactivo. Los resultados obtenidos se expresaron como  $\mu\text{g Cd/ g PH}$ .

#### 6.4.3.3. Determinación de cadmio en el alimento (*Artemia salina*)

Para analizar la probable incorporación del cadmio a través del alimento se evaluó la concentración del metal en muestras de *Artemia salina* expuestas durante 2 h (periodo de alimentación de los ajolotes) en las diferentes condiciones experimentales. Se mantuvieron condiciones similares de manejo, mantenimiento y exposición al cadmio que las realizadas durante los bioensayos descritos previamente. Las artemias se colocaron en acuarios de aclimatación de 3 L en una densidad de 8139.99 artemias/ 2 L de agua marina (35 ppm) a  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente las artemias se transfirieron a las condiciones experimentales (0, 20, 200  $\mu\text{g Cd/L}$ ) en acuarios de 3 L previamente preparados con solución Holtfreter y dosificados con la concentración de Cd requerida. La densidad en cada acuario experimental fue de 1100 artemias/ 3 L similar a la suministrada a los ajolotes durante el periodo de exposición. Al término de 2 h los organismos fueron removidos, enjuagados con solución salina para crustáceos y pesados (g PH; Sartorius® CP224S). Cada grupo se dividió en 2 submuestras en tubos de 10 ml y procesados para la cuantificación de metales. A cada tubo se le agregaron 10 ml de ácido nítrico al 70%

redestilado, se digirió la muestra en frío durante 15 d y se filtraron posteriormente a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 $\mu$ m (Millipore®). Se tomó una alícuota de 1.50 ml del filtrado y se diluyó con 18.50 ml de agua desionizada. Las muestras finales se analizaron por medio de la técnica de ICP-MS previamente descrita. Los resultados se expresaron en  $\mu$ g Cd/ g PH.

#### **6.4.4. Análisis Estadístico**

La ritmicidad diaria del balance redox y del consumo de oxígeno evaluados en un ciclo de 24 horas, se determinó mediante un Análisis de COSINOR que se basa en un análisis parcial de series de Fourier (COSANA ver. 3.1, 1996). El análisis determina el mejor ajuste de oscilación para los datos observados y permite la obtención de un porcentaje de ritmicidad (R%) y su significatividad ( $p < 0.05$ ), parámetros utilizados para la selección del mejor periodo de ajuste a los datos obtenidos. Se utilizó de manera complementaria el programa Chronosfit (ver. 1.06) para corroborar la presencia de patrones de ritmicidad obtenidos por el algoritmo de COSANA. Previo a los análisis de COSANA y Chronosfit se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis de análisis de rangos para determinar diferencias significativas entre los tiempos evaluados en el ciclo de 24 h (STATISTICA ver. 8.0 Statsoft Inc, 2007).

Para evaluar diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los ajolotes entre las condiciones experimentales de la exposición al cadmio se realizó una prueba de ANCOVA. El efecto significativo del cadmio sobre los Índices de Condición evaluados (IF, IH) se analizó por un ANOVA seguido de un análisis post hoc de Tukey (STATISTICA ver. 8.0 Statsoft Inc., 2007).

Para determinar las diferencias significativas entre las concentraciones de Cd de cada condición experimental para las muestras del medio, tejido hepático y alimento; se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis seguido de un análisis de Tukey para muestras desiguales (STATISTICA ver. 8.0 Statsoft Inc., 2007).



## 7. RESULTADOS

Durante el periodo de exposición subletal al cadmio de 15 d, la sobrevivencia de los juveniles de *A. mexicanum* en todas las condiciones experimentales (0, 20 y 200 µg Cd/L) para la serie 1 fue de 96.66% y para la serie 2 de 98.14%.

### 7.1. Parámetros Fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y amonio total en los acuarios de las series 1 y 2 se mantuvieron constantes durante el periodo de exposición al cadmio. No se observaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales ( $p > 0.05$ ) ni entre las series ( $p > 0.05$ ) por lo cual se agruparon los datos y se obtuvo el valor global promedio y de error estándar (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos durante los 15 d de exposición al Cd. Se señalan valores promedio y de error estándar ( $\pm$  ES).

Condición (µg Cd/L)	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mg O <sub>2</sub> /L)	Amonio Total (mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L)
0	16.40 $\pm$ 0.12	8.17 $\pm$ 0.01	6.71 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.11
20	16.16 $\pm$ 0.10	8.08 $\pm$ 0.04	6.40 $\pm$ 0.04	1.17 $\pm$ 0.17
200	16.07 $\pm$ 0.09	8.09 $\pm$ 0.03	6.43 $\pm$ 0.05	1.09 $\pm$ 0.16

### 7.2 Concentración del cadmio

Los resultados obtenidos a partir del ICP-MS fueron procesados y corregidos para su análisis. Para ello se hizo una primera corrección por el blanco reactivo (agua desionizada + ácido nítrico) y en el caso de los organismos (ajolote y artemia) por la dilución realizada en la digestión fría, por el peso del tejido y finalmente por el material de referencia DORM4 (NRC-Canada). En el caso de las muestras de agua, los resultados obtenidos fueron a su vez corregidos por el material de referencia CRM TMDW-A (High Purity Standard<sup>®</sup>, 26 element ICP Trace Metals in Drinking Water Standard in 2% HNO<sub>3</sub>+TrHF).

#### 7.2.1. Acumulación del cadmio en el hígado

La concentración del cadmio en los organismos del grupo testigo (µg/g PH), refleja los niveles basales del metal (0.0104  $\pm$  0.001 µg Cd/g PH). En los organismos expuestos al metal, los resultados obtenidos demuestran una acumulación hepática significativa del cadmio mayor al incrementarse la concentración del metal en el medio externo (Tabla 3,

Figura 1 de anexos). En los organismos expuestos a 20 y 200  $\mu\text{g Cd/L}$  (concentraciones nominales), la acumulación hepática promedio fue de 0.184 y 0.381  $\mu\text{g Cd/ PH}$ , 17.7 y 36.6 veces mayor respectivamente, que la observada en los organismos del grupo testigo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

### 7.2.2. Acumulación del cadmio en el alimento (adultos de *Artemia salina*)

La concentración del cadmio en las artemias suministradas a los ajolotes del grupo control, denotan los niveles base del metal incorporado en el alimento ( $0.079 \pm 0.016 \mu\text{g Cd/g PH}$ ). Sin embargo en las artemias suministradas a los ajolotes expuestos a 20 y 200  $\mu\text{g Cd/L}$  los resultados obtenidos demuestran la acumulación significativa del cadmio ( $p < 0.05$ ), acumulación mayor al incrementarse la concentración externa del metal (ver anexo Figura 2). En las concentraciones experimentales de 20 y 200  $\mu\text{g Cd/L}$  la concentración promedio del cadmio en las artemias fue 6.34 y 30.9 veces mayor ( $0.501$  y  $2.44 \mu\text{g Cd/g PH}$ , respectivamente) que la registrada en las artemias del grupo testigo ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

### 7.2.3. Concentración de cadmio en el medio externo (Solución Holtfreter)

En el grupo testigo sin exposición al metal la concentración de cadmio en el medio experimental fue de  $0.067 \pm 0.059 \mu\text{g Cd/L}$ , considerados niveles base. En los acuarios experimentales con exposición al metal y con niveles nominales de 20 y 200  $\mu\text{g Cd/L}$ , las concentraciones reales promedio del metal fueron de 16.71 y 162.99  $\mu\text{g Cd/L}$ , valores 8.4 a 8.5% menores a los valores nominales ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3). Cabe señalar que en la información subsiguiente, se hará referencia a los valores reales del cadmio en el medio externo experimental.

Tabla 3. Concentración del cadmio en el medio experimental ( $\mu\text{g Cd/L}$ ), en el alimento suministrado a los juveniles de *A. mexicanum* ( $\mu\text{g/g PH}$ ) y en el hígado de los ajolotes ( $\mu\text{g/g PH}$ ) expuestos a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Se señalan valores promedio  $\pm$  error estándar. En cada matriz, letras superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre las concentraciones experimentales del cadmio ( $p < 0.05$ ).

Condición ( $\mu\text{g Cd/L}$ )	0.07	16.7	163.0
Hígado	$0.010 \pm 0.001^a$	$0.184 \pm 0.125^b$	$0.381 \pm 0.132^c$
Alimento ( <i>A. salina</i> )	$0.079 \pm 0.016^a$	$0.501 \pm 0.039^b$	$2.441 \pm 0.057^c$
Medio (Sol. Holtfreter)	$0.067 \pm 0.059^a$	$16.709 \pm 3.600^b$	$162.987 \pm 6.570^c$

### 7.3. Efecto tóxico subletal del cadmio

#### 7.3.1. Nivel Bioquímico: Ritmicidad diaria del sistema Glutación

##### 7.3.1.1. Ritmicidad diaria de la concentración de Glutación Total (GSH-T), oxidado (GSSG), reducido (GSH) y razón GSH/GSSG

En los juveniles de *A. mexicanum*, la ritmicidad del estado redox celular a nivel hepático y el efecto del cadmio evaluado a través de la determinación en ciclos de 24 h del glutación total (GSH-T), oxidado (GSSG), reducido (GSH) y razón GSH/GSSG se analizó a través del programa COSANA y su significatividad se corroboró además a través del programa Chronosfit (ver anexos Figura 3). Los resultados obtenidos denotan una clara alteración ante una exposición subcrónica de 15 d al cadmio, tanto por los cambios en la periodicidad como en la magnitud de las respuestas analizadas.

Los resultados obtenidos para el **pool total de glutación** (GSH-T) en los organismos del grupo control demuestran la expresión de un ritmo trimodal con un periodo significativo de 8.00 h con acrofases a las 20, 5 y 11 h ( $p < 0.05$ ) (Figura 1A; Tabla 4). Este comportamiento trimodal se insertó en un ritmo diario significativo de 24 h (ver anexo Figura 3A). La exposición subletal al cadmio modificó significativamente el comportamiento diario del GSH-T ( $p < 0.05$ ). La alteración más severa se observó en los organismos expuestos a la menor concentración subletal del metal (16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ ) donde se perdió la ritmicidad diaria de la respuesta y se registró, adicionalmente, un drástico decremento en los niveles globales del pool de GSH-T (Figura 1B; Tabla 4). En la condición experimental de mayor exposición al cadmio (163  $\mu\text{g Cd/L}$ ), las concentraciones de GSH-T son similares a las del grupo control ( $p > 0.05$ ); sin embargo, no se restablece la ritmicidad diaria de la respuesta (Figura 1C; Tabla 4).

Un patrón semejante se observó en el comportamiento del **glutación reducido (GSH)**, la fracción mayoritaria del pool total celular de la molécula. En el grupo control se registró un ritmo trimodal con un periodo de 8.00 h, acrofases a las 20, 5 y 11 h y una ritmicidad diaria de 24 h (Figura 2A; Tabla 4; ver anexo Figura 3C). La exposición subletal al cadmio, modificó significativamente la ritmicidad de esta respuesta ( $p < 0.05$ ). Si bien en el grupo expuesto a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  se registró una ritmicidad diaria similar al grupo control (periodo de 8.00 h, acrofases a las 20, 5 y 11 h; ritmicidad de 24 h) (Figura 2B; Tabla 4; ver anexo Figura 3E), se observó una drástica reducción de la concentración de GSH. De manera similar a lo observado para GSH-T, en los organismos expuestos a 163  $\mu\text{g Cd/L}$  las

concentraciones de GSH fueron similares a las del grupo control ( $p > 0.05$ ); sin embargo, se perdió la ritmicidad diaria de la respuesta (Figura 2C; Tabla 4).

Los resultados obtenidos para el **glutati3n oxidado (GSSG)**, la fracci3n minoritaria del pool total del glutati3n hep3tico, denotan a la vez el efecto significativo de la exposici3n subletal al cadmio ( $p < 0.05$ ). En los organismos del grupo control se observ3 un ritmo unimodal con periodo aproximado de 24 h (23.54 h), acrofase en la fotofase (8.00 h) y batifase al final de la misma (17.00 h) (Figura 3A; Tabla 4; ver anexo Figura 3B). La mayor alteraci3n se observ3 en los organismos expuestos a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  donde se registr3 la p3rdida de la ritmicidad de la respuesta y la reducci3n dr3stica de las concentraciones hep3ticas de GSSG (Figura 3B; Tabla 4). En contraste, en la mayor exposici3n al metal (167  $\mu\text{g Cd/L}$ ) se registr3 un patr3n unimodal en el ritmo diario de GSSG, periodicidad de 23.06 h y concentraciones similares al grupo control. No obstante, en relaci3n al grupo control se observ3 una clara alteraci3n en las horas de registro de la acrofase y la batifase (Figura 3C; Tabla 4; ver anexo Figura 3F). La batifase se observ3 a las 11.00 h y la acrofase a las 23.00 h a diferencia del comportamiento del grupo control, con registros a las 8:00 y 17:00 h, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos de GSH y GSSG se calcul3 el **raz3n GSH/GSSG** que interpreta el estado redox celular. Los resultados calculados del grupo control denotan un ritmo unimodal, con un periodo aproximado de 24 h (23.42 h), acrofase a las 17.00 h y batifase a las 06.00 h (Figura 4A; Tabla 4; ver anexo Figura 3D). Conforme a lo esperado, la exposici3n al cadmio alter3 significativamente tanto la expresi3n r3tmica como la magnitud de la respuesta. En los organismos del grupo expuesto a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ , se perdi3 la ritmicidad de la raz3n GSH/GSSG aunado al hecho de que se registr3 una severa reducci3n en los valores de la raz3n (Figura 4B; Tabla 4). En los organismos expuestos a la mayor concentraci3n de cadmio (167  $\mu\text{g Cd/L}$ ), se registr3 un comportamiento r3tmico unimodal, con periodicidad de 23.24 h, similar a lo observado en el grupo control. De igual manera, los niveles de la raz3n son similares a los registrados en el grupo sin exposici3n al metal. Sin embargo, se observaron alteraciones significativas a nivel de la acrofase y batifase, con un adelanto en la acrofase a las 8.00 h y en la batifase a las 23.00 h (Figura 4C; Tabla 4; ver anexo Figura 3G).

Tabla 4. Parámetros de la ritmicidad del sistema Glutación a nivel hepático en juveniles de *A. mexicanum* expuestos a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Se incluyen los parámetros para glutatión total (GSH-T), oxidado (GSSG), reducido (GSH) y razón GSH/GSSG (SR=Sin ritmo, RT=Ritmo Trimodal, RB=Ritmo Bimodal y RU=Ritmo Unimodal)

Biomarcador	0.07 $\mu\text{g Cd/L}$			16.7 $\mu\text{g Cd/L}$			163.0 $\mu\text{g Cd/L}$		
	Ritmo	Periodo (h)	Acrofase (h)	Ritmo	Periodo (h)	Acrofase (h)	Ritmo	Periodo (h)	Acrofase (h)
GSH-T	RT	8:00	20/5/11	SR	SR	SR	SR	SR	SR
GSSG	RU	23:54	8:00	SR	SR	SR	RU	23:06	23:00
GSH	RT	8:00	20/5/11	RT	8:06	20/5/11	SR	SR	SR
GSH/GSSG	RU	23:42	14:00	SR	SR	SR	RU	23:24	8:00

### 7.3.2. Nivel Fisiológico - Consumo de oxígeno

#### 7.3.2.1. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno

En los organismos del grupo testigo, sin exposición al cadmio (0.07  $\mu\text{g Cd/L}$ ), la tasa metabólica medida a través del consumo de oxígeno en un ciclo de 24 h, denotó un ritmo diario unimodal significativo ( $p < 0.05$ ) de 23:42 h con la acrofase en la fase de luz (11:00 h) y la batifase en la fase oscura (20:00 h), comportamiento corroborado por el análisis de Kruskal Wallis entre los tiempos evaluados. Al exponer los organismos a niveles subletales del cadmio, se observaron alteraciones significativas ( $p < 0.05$ ) en la ritmicidad del consumo de oxígeno. En los organismos expuestos a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  se registró un ritmo bimodal con periodo significativo ( $p < 0.05$ ) de 12:12 h, acrofases a las 3:00 y 15:00 h y, batifase a las 8:00h y 20:00 h. En los organismos expuestos a 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ , si bien el modelo COSINOR denotó una ritmicidad bimodal, este modelo no fue significativo ( $p > 0.05$ ). Al efectuar el análisis de los resultados por la prueba de Kruskal Wallis no se detectaron diferencias significativas entre los tiempos evaluados ( $p > 0.05$ ) por lo cual no se pudo corroborar un comportamiento rítmico en el consumo de oxígeno en esta condición experimental (Tabla 5; Figura 5). Todos los valores promedio del consumo de oxígeno en cada hora de muestreo se integran en anexos (Tabla1).

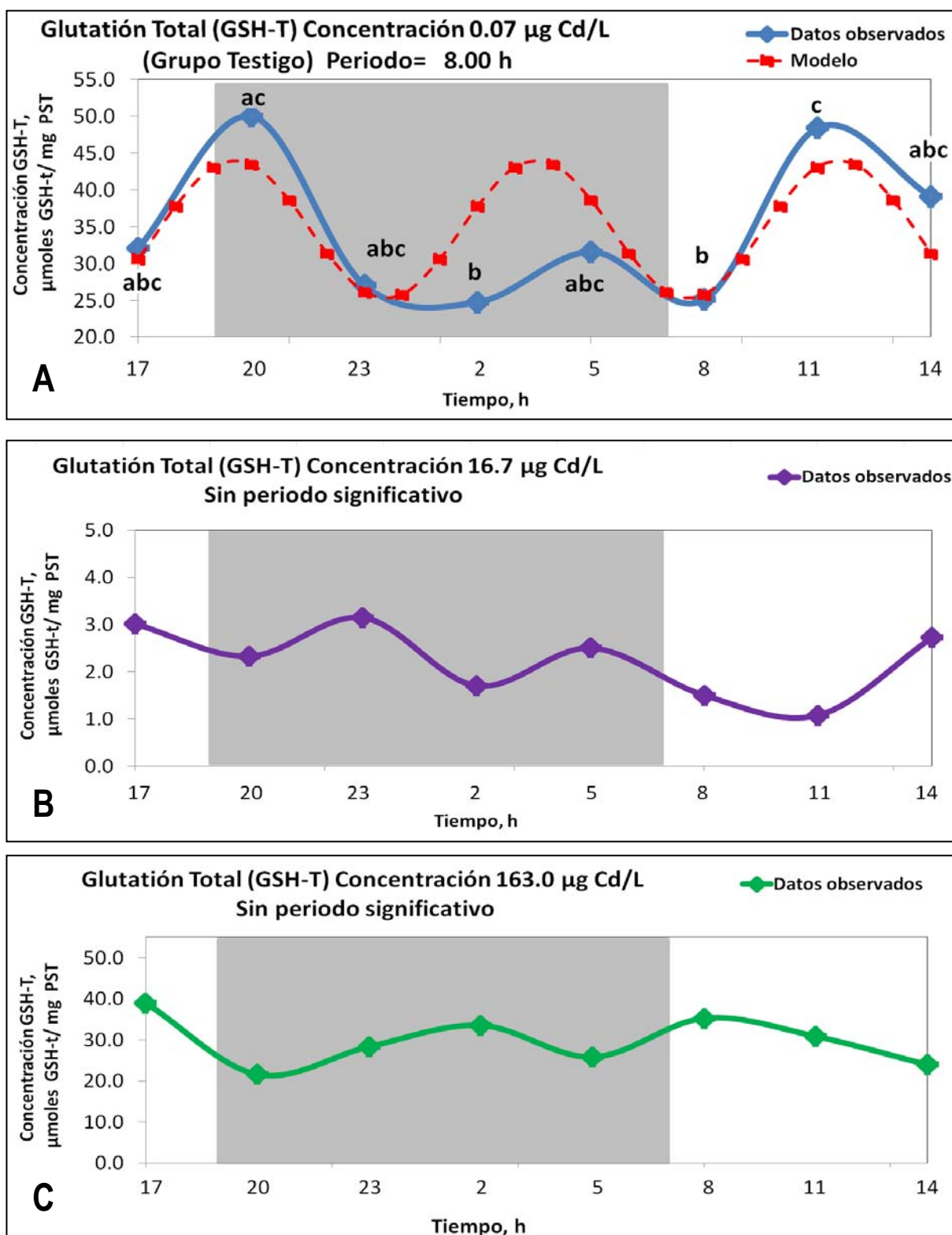


Fig. 1. Ritmicidad diaria del Glutación Total (GSH-T) hepático de juveniles *A. mexicanum*. (A) Grupo control, 0.07 (B) 16.7 y (C) 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las horas de muestreo durante ciclo de 24 h.

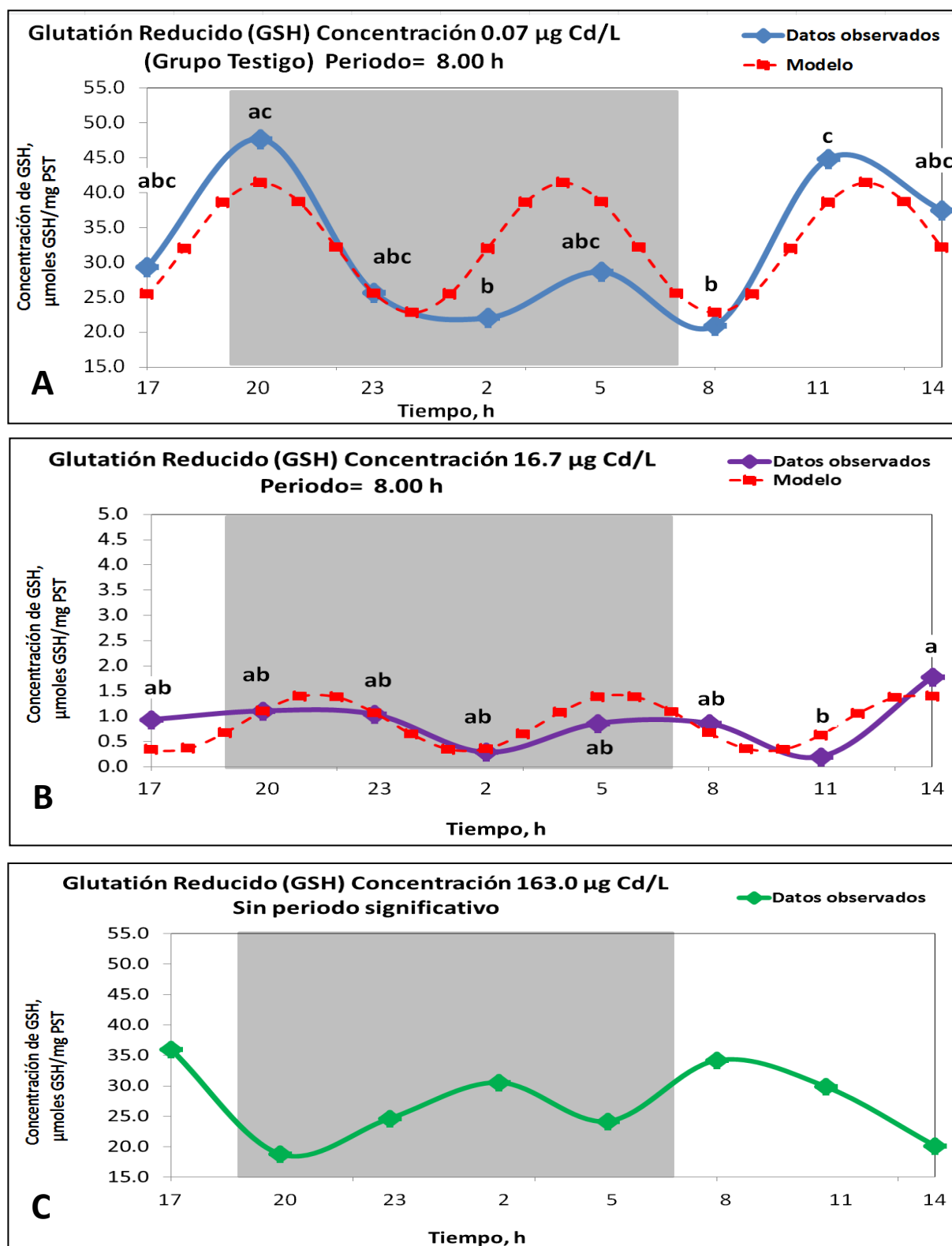


Fig. 2. Ritmicidad diaria del Glutación Reducido (GSH) hepático de juveniles *A. mexicanum*. (A) Grupo control, 0.07 (B) 16.7 y (C) 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las horas de muestreo durante ciclo de 24 h.

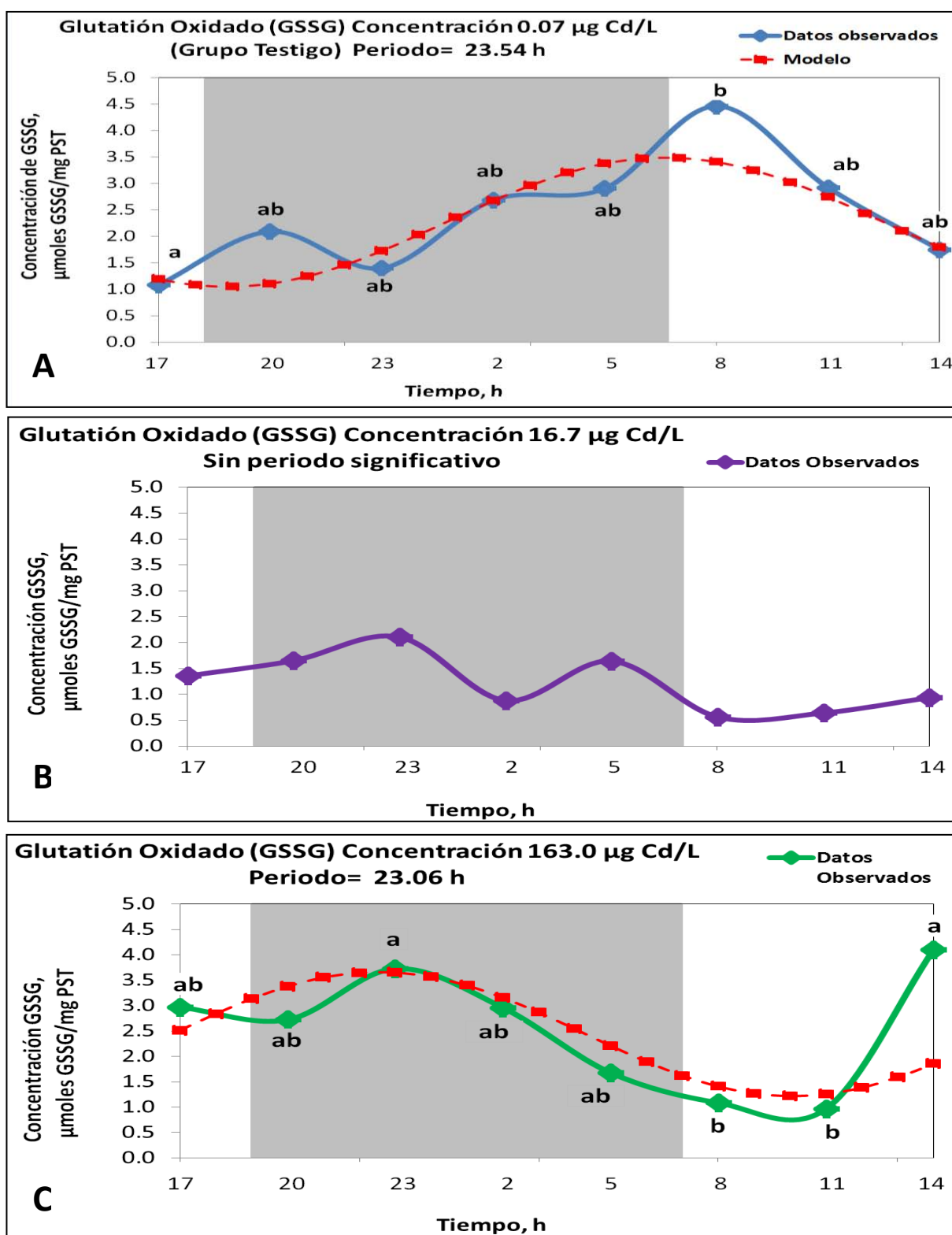


Fig. 3. Ritmicidad diaria del Glutación Oxidado (GSSG) hepático de juveniles *A. mexicanum*. (A) Grupo control, 0.07 (B) 16.7 y (C) 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las horas de muestreo durante ciclo de 24 h.



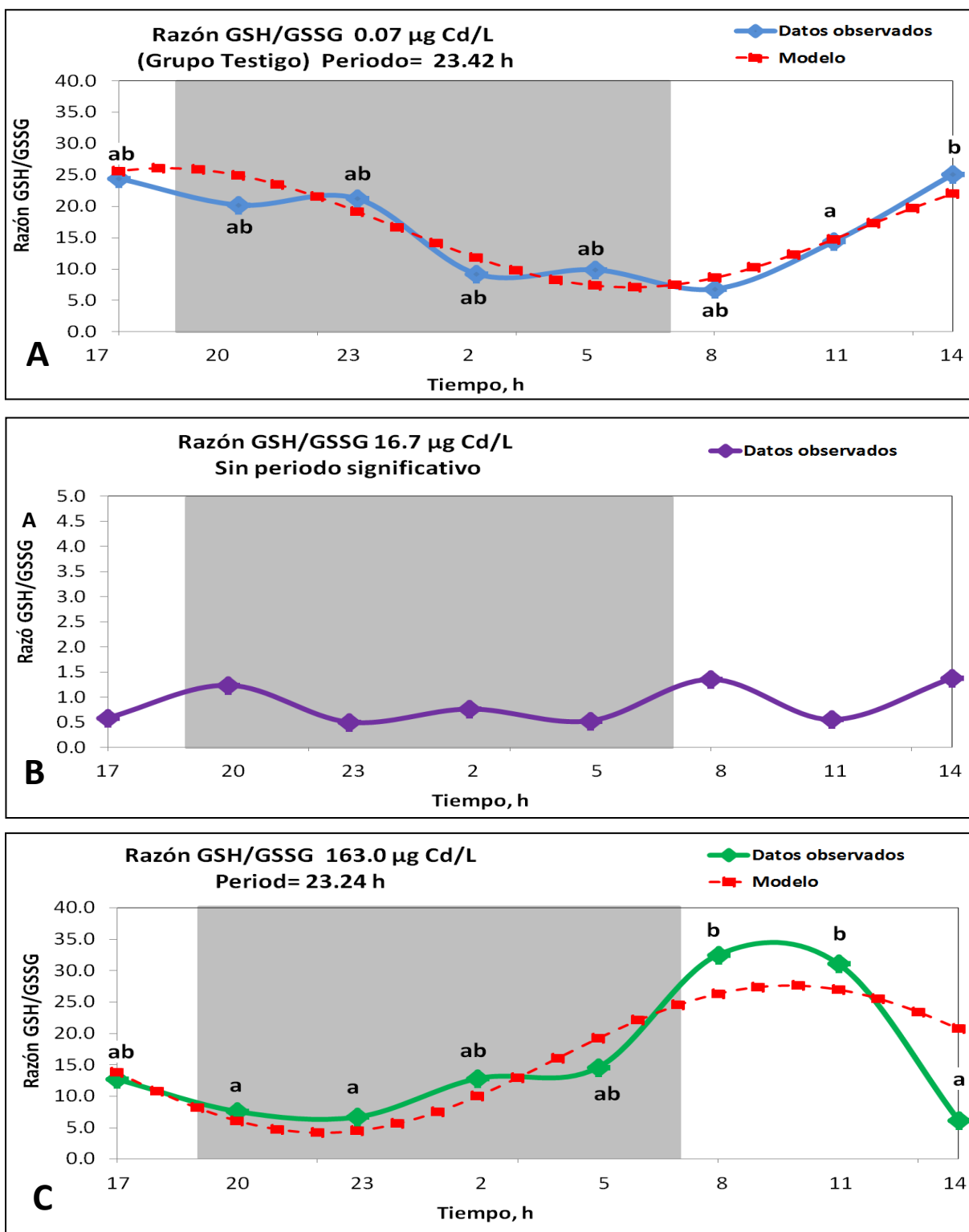


Fig. 4. Ritmicidad diaria de la razón GSH/GSSG hepático de juveniles *A. mexicanum*. (A) Grupo control, 0.07 (B) 16.7 y (C) 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las horas de muestreo durante ciclo de 24 h.

### 7.3.2.2. Condición energética

Las alteraciones observadas en la ritmicidad diaria del consumo de oxígeno por la exposición subletal al cadmio modificaron a su vez el estado energético global de los organismos el cual fue evaluado mediante la amplitud metabólica y el campo de actividad metabólica (Tabla 5). Los organismos del grupo testigo, sin exposición al cadmio, presentaron una amplitud metabólica de 16.4 mg O<sub>2</sub>/h/g PH (229.3 J/h/g PH) y un campo de actividad metabólica de 196.7 mg O<sub>2</sub>/g PH (2733.9 J/g PH). En los organismos expuestos a 16.7 µg Cd/L, tanto la amplitud metabólica como el campo de actividad metabólica se incrementaron 32 y 13 %, respectivamente respecto al grupo testigo. En contraste, en los organismos expuestos a 163.0 µg Cd/L, tanto la amplitud metabólica como el campo de actividad metabólica se redujeron 25 y 3%, respectivamente, en comparación al grupo testigo (Figura 5; Tabla 5).

Tabla. 5. Parámetros de la ritmicidad del consumo de oxígeno y la condición energética en juveniles de *A.mexicanum* expuestos 15 d a 0.07, 16.7 y 163.0 µg Cd/L.

Parámetros	Unidades	µg Cd/L		
		0.07	16.7	163.0
<b>Ritmicidad</b>		Unimodal	Bimodal	Bimodal
<b>Periodo</b>	h	23:52	12:12	No ritmo
<b>Acrofase</b>	h	10:00	3:00/15:00	No ritmo
<b>Amplitud Metabólica</b>	mg O <sub>2</sub> /h/g PH	16.4	21.81	12.71
	Joules/ h/ g PH	229.3	303.12	176.59
<b>Campo de Actividad Metabólica (Área bajo la curva)</b>	mg O <sub>2</sub> / g PH	196.71	262.74	147.83
	Joules/ g PH	2733.88	3651.52	2654.56

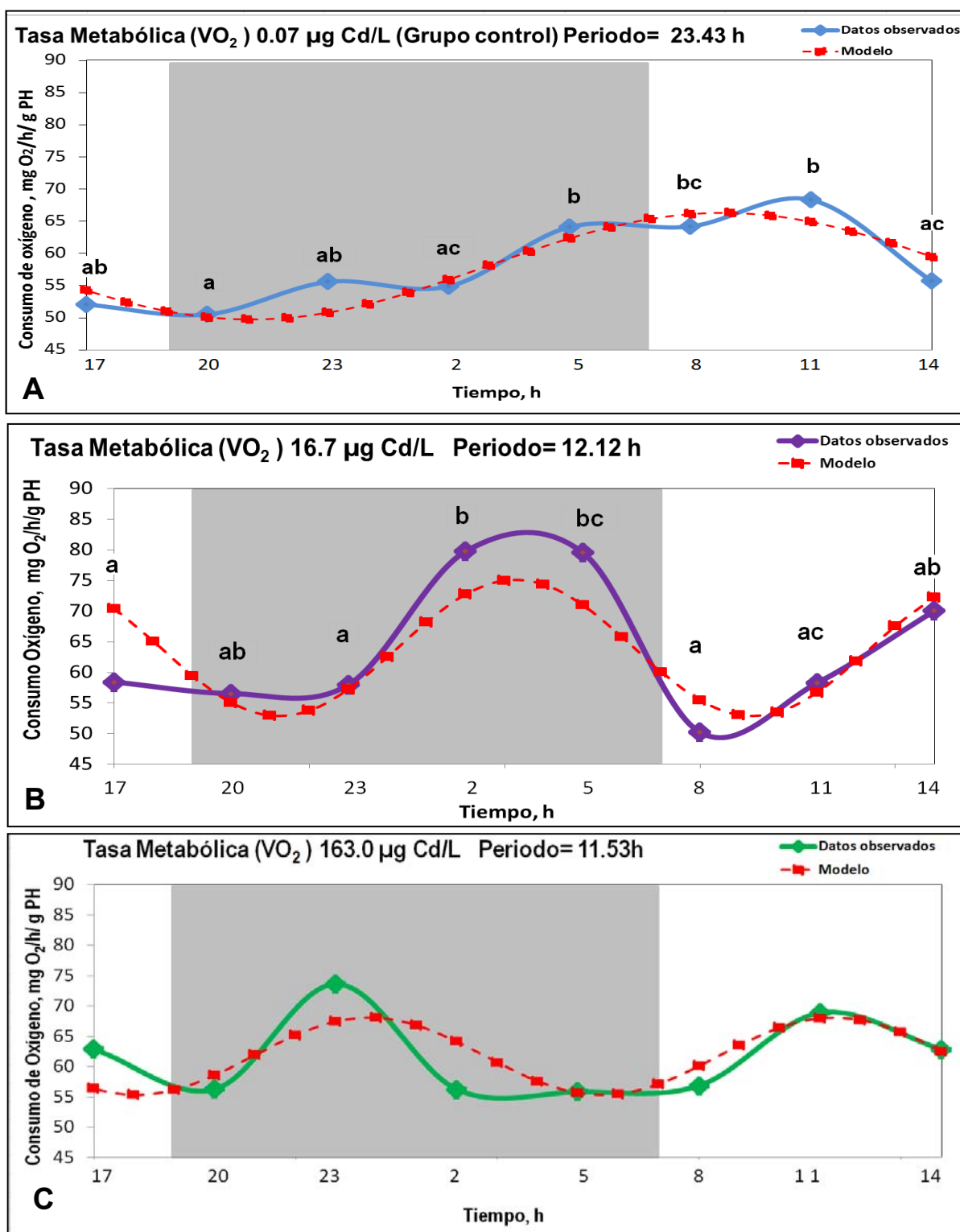


Fig. 5. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno de juveniles de *A. mexicanum* en el grupo control A), 0.07  $\mu\text{g Cd/L}$  y expuestos subletalmente a B) 16.7 y C) 163  $\mu\text{g Cd/L}$  durante 15 días. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las horas de muestreo en un ciclo de 24 h.

### **7.3.3. Nivel Fisiológico- Tasa de Crecimiento e Índices de Condición fisiológica**

El efecto de la exposición subletal al cadmio sobre el estado fisiológico global de los organismos se analizó tomando en consideración tres diferentes parámetros: 1) Índice de Foulton, 2) Índice Hepatosomático y 3) Tasa de crecimiento.

#### *7.3.3.1. Índices de Condición Fisiológica*

En anexos (Tabla 2) se incluyen los resultados obtenidos de la longitud patrón (LP, mm), peso húmedo hepático (PHh, g PH) y de los organismos (PHo, g PH) a partir de los cuales fueron calculados los Índices de Condición de Foulton y Hepatosomático. Los resultados obtenidos denotan que el índice de Foulton (IF) fue similar en los organismos de las Series 1 y 2 ( $p > 0.05$ ) y no fue modificado por la exposición subletal al cadmio ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6). En contraste, el Índice Hepatosomático (IH) fue diferente entre los organismos de la Serie 1 y la Serie 2 ( $p < 0.05$ ). De manera global, el IH de los organismos de la Serie 2 fue de 1.4 a 1.6 veces mayor que el de los organismos de la Serie 1 ( $p < 0.05$ ). No obstante, en ninguna de las series la exposición al cadmio modificó el IH ( $p > 0.05$ ) (Tabla 6).

#### *7.3.3.2. Tasa de crecimiento*

Los pesos iniciales de los organismos de las Series 1 y 2 del grupo control y de los grupos experimentales difirieron significativamente ( $p < 0.05$ ). Esto es, a pesar de que las condiciones de mantenimiento de los organismos experimentales de las Series 1 y 2 fueron similares y con la misma edad, los organismos de la Serie 2 presentaron un peso (g PH) significativamente mayor que los organismos de la Serie 1 ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la exposición al cadmio no ejerció ningún efecto en el peso final de los ajolotes de ambas series ( $p > 0.05$ ) (Tabla 7). Durante el periodo de exposición al metal, de 15d, el incremento en peso de los organismos fue mínimo y por lo tanto las tasas de crecimiento observadas fueron bajas y similares en todas las condiciones experimentales ( $p > 0.05$ ). Las tasas de crecimiento oscilaron de 0.01 a 27.3 mg PH/d (ver anexos; Figuras 3 y 4).

Tabla. 6. Índices fisiológicos de juveniles *A. mexicanum* expuestos a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre condiciones dentro y entre cada serie son denotadas por letras superíndices diferentes. Se señalan valores promedio  $\pm$  error estándar.

Índice de Foulton (K)			
Condición	0.07 $\mu\text{g Cd/L}$	16.7 $\mu\text{g Cd/L}$	163.0 $\mu\text{g Cd/L}$
Serie 1	0.004 $\pm$ 0.004	0.004 $\pm$ 0.003	0.004 $\pm$ 0.003
Serie 2	0.005 $\pm$ 0.006	0.005 $\pm$ 0.008	0.004 $\pm$ 0.006
Índice Hepatosomático (IH)			
Serie 1	1.262 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.099 $\pm$ 0.054 <sup>a</sup>	1.381 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Serie 2	2.075 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	1.814 $\pm$ 0.015 <sup>d</sup>	1.917 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>

Tabla. 7. Tasa de crecimiento de juveniles *A. mexicanum* expuestos a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de las series, dentro y entre cada serie, son denotadas por letras superíndices diferentes. Se señalan valores promedio  $\pm$  error estándar.

Tasa de crecimiento						
	Serie 1	Serie 2	Serie 1	Serie 2	Serie 1	Serie 2
Peso inicial (g, PH)	3.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00	4.98 <sup>b</sup> $\pm$ 0.31	3.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00	4.70 <sup>b</sup> $\pm$ 0.25	3.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00	4.96 <sup>b</sup> $\pm$ 0.26
Peso Final (g, PH)	3.10 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	4.98 <sup>b</sup> $\pm$ 0.31	3.28 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	4.74 <sup>b</sup> $\pm$ 0.22	3.40 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09	4.98 <sup>b</sup> $\pm$ 0.26
Tasa de crecimiento (g PH/ d)	0.077	0.00007	0.254	0.043	0.378	0.014

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Parámetros fisicoquímicos y acumulación de Cd

Durante el periodo de exposición subletal al cadmio, los parámetros fisicoquímicos de temperatura, salinidad y pH se mantuvieron estables en todas las condiciones experimentales. Dado que estas variables modulan la especiación química de los metales en ambientes acuosos (DiToro, 2001), es posible afirmar que bajo las mismas condiciones fisicoquímicas de exposición, la biodisponibilidad del cadmio fue similar para los ajolotes juveniles. Cabe señalar que las concentraciones reales promedio de exposición (16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ ) fueron similares a las concentraciones nominales, con variaciones del 16 y 18%, respectivamente.

Al término de la exposición al cadmio, se observó en los ajolotes una acumulación hepática significativa del metal, mayor al incrementarse la concentración del metal en el medio, lo cual confirma que este órgano es blanco de la acción tóxica del metal como ha sido ampliamente descrito en organismos acuáticos, incluidos los anfibios (Boyd, 2010). Cabe señalar que la acumulación del cadmio en el tejido hepático de los juveniles de *A. mexicanum*, de 0.184 y 0.381  $\mu\text{g Cd/g PH}$  en los organismos expuestos a 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ , fueron similares a los valores reportados por González-Rendón (2006) en juveniles de la misma especie en estudios de exposición *in situ* de 21 d en canales de la zona lacustre de Xochimilco, impactados por el aporte de metales. Al igual que en otros organismos acuáticos (Newman y Jagoe, 1996), es probable que la incorporación del cadmio en los juveniles de *A. mexicanum* ocurra por superficies permeables (i.e. branquias y superficie corporal). No obstante, los resultados obtenidos de la concentración del Cd acumulado en el alimento vivo suministrado a los ajolotes (*Artemia salina*), sugiere que la absorción intestinal del metal a través del alimento ingerido constituyó a la vez una ruta importante de incorporación del cadmio.

### 8.2. Toxicidad del cadmio

El cadmio es un metal sin función biológica conocida y de elevada toxicidad para los organismos acuáticos, incluidos los anfibios. La toxicidad del cadmio involucra efectos directos e indirectos que ocurren a nivel bioquímico celular y tienen repercusiones a nivel fisiológico (Moulis y Thévenod, 2010). Dentro de los efectos directos se incluye la alteración de enzimas y moléculas que poseen un grupo funcional metálico por la competencia y

desplazamiento de estos por el cadmio al tener una valencia electrónica equivalente (Souza-Arroyo, 2012), así como la inactivación proteica por el enlace del Cd a los grupos SH por los que presenta elevada afinidad (Kültz, 2005), lo cual conduce a una alteración de su función celular. Uno de los procesos consecuentes de la alteración funcional de enzimas y moléculas antioxidantes es la producción de ROS, ya sea por la inhibición de su papel en la defensa antioxidante o por las reacciones de Fenton o Haber Weiss de los metales funcionales libres, lo cual conduce a la alteración del balance redox y a una condición de estrés oxidante celular (Mátovic, 2011). La producción no regulada de ROS ocasiona la oxidación de moléculas y componentes celulares como proteínas, lípidos y DNA lo cual conduce en última instancia a la apoptosis celular (Frisard y Ravussin, 2006). De tal manera, el daño ocasionado por el cadmio puede ocurrir a distintos niveles y altera importantes funciones del organismo como son el balance redox celular, la obtención de energía o la regulación de su ritmicidad biológica interna, aspectos que se abordan y discuten en el presente estudio.

### **8.2.1. Efecto del cadmio en el balance redox: Nivel bioquímico**

#### **8.2.1.1. Ritmicidad diaria del sistema glutatión**

Los resultados obtenidos en el grupo control de *A. mexicanum* demostraron la ritmicidad diaria del sistema antioxidante de glutatión a nivel hepático, evaluado a través de la medición del glutatión total (GSH-T), reducido (GSH), oxidado (GSSG) y la razón GSH/GSSG, en un ciclo de 24 h. Todos los parámetros evaluados del sistema glutatión presentaron una ritmicidad diaria significativa cercana a 24 h. Cabe señalar que el periodo ultradiano de 8 h registrado en el GSH-T y GSH se asoció con el apagado de luces (19:00 h) y con el periodo de alimentación (12:00 a 14:00 h). Bajo condiciones celulares normales, al ser el GSH la forma más abundante del pool de glutatión (igual o mayor al 90%) (Circu y Aw, 2010; Dickinson y Forman, 2002), la expresión diurna unimodal registrada en el GSSG fue modulada por las diferencias obtenidas entre las concentraciones de GSH-T y GSH. De igual manera, la ritmicidad diaria observada en la razón GSH/GSSG obedece al comportamiento individual de la expresión rítmica del GSH y GSSG.

Diversos autores aportan evidencia de la ritmicidad circadiana en la expresión de genes y en las concentraciones de moléculas antioxidantes. Xu *et al.* (2012) demostraron en ratones la variación diaria en la expresión de los genes que codifican para la síntesis de GSH, GPx, y GST, como Nrf2 y Keap1 importantes mecanismos de regulación del estado

redox celular. De igual manera, demostraron la ritmicidad circadiana a nivel hepático de las moléculas antioxidantes de glutatión (GSH), de las actividades enzimáticas de GSH-S-transferasa (GST), catalasas (CAT) y Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD), así como de la peroxidación lipídica. Estudios realizados en el hepatopáncreas del acocil *Procambarus clarkii* y *P. diguetii*, denotaron a su vez el comportamiento circadiano del sistema antioxidante (GSH, GSSG, GR) (Fanjul-Moles *et al.*, 2003; Durán-Lizárraga *et al.*, 2001). A la fecha, no se han abordado estudios de la ritmicidad circadiana de los sistemas antioxidantes en anfibios. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio de la ritmicidad diurna del sistema antioxidante glutatión dan cuenta de una temporalidad diaria del estado redox celular a nivel hepático y sugiere su probable expresión circadiana en los juveniles de *A. mexicanum*. Sin embargo se requieren realizar más estudios relacionados para corroborarlo.

En anfibios, se ha descrito un sistema multioscilar circadiano que se compone de distintas estructuras de fotorecepción y modulación de señales nerviosas como son los ojos, el complejo pineal y el hipotálamo, así como osciladores periféricos como el hígado, cuya participación sincrónica permite la manifestación de ritmos circadianos en sus diferentes tipos de salidas, incluida la expresión circadiana del estado redox celular (Yoshikawa, 1998; Cadusseau y Galand, 1980). Tanto el cerebro, como el hígado, que son estructuras centrales que participan en la ritmicidad circadiana, demandan un alto requerimiento energético lo cual determina una producción celular constante de ROS (Luschack, 2011). En el cerebro, la baja concentración de enzimas antioxidantes en relación a otros órganos (i.e. hígado), determina su elevada susceptibilidad al estrés oxidante. De tal manera, el glutatión desempeña en este órgano una función central en el mantenimiento de la homeostasis redox ante una situación de estrés oxidante, condición bajo la cual pueden verse alterados procesos relacionados con la organización circadiana (Jiménez-Ortega *et al.*, 2012; 2011; Fanjul-Moles *et al.*, 2009; Dringen, 2000).

En los juveniles de *A. mexicanum*, la exposición subletal al cadmio, demostró tanto su acción oxidante como su efecto disruptor sobre la ritmicidad diaria del sistema glutatión. Las alteraciones significativas en el patrón diurno del glutatión (total, reducido y oxidado) fueron consecuencia tanto de la atenuación del ritmo (perdida del ritmo) como de los cambios de fase (acrofase y batifase). Las mayores alteraciones se registraron en los organismos expuestos a la menor concentración del cadmio (16.7 µg Cd/L) en los que se registró una reducción promedio del 94% del pool total de glutatión y la pérdida de su



expresión rítmica; patrones semejantes se observaron en el comportamiento de GSH y GSSG. A excepción de los niveles de GSH en los ajolotes expuestos a 16.7 µg Cd/L y de GSSG, en los organismos expuestos a 163 µg Cd/L se registró una pérdida de la ritmicidad diaria en los demás casos de los parámetros del sistema glutatión a pesar de las fluctuaciones observadas durante el día. A la vez, los niveles promedio de GSH-T se mantuvieron 20% por debajo de los niveles máximos del grupo control, patrón similar a lo observado para GSH. Bajo esta condición de exposición, los niveles de GSSG presentaron niveles similares a los del grupo testigo si bien fue evidente el cambio y la inversión de la acrofase (11:00 h) en relación a los ajolotes del grupo control (8:00 h).

La cronotoxicidad producto del estrés oxidante ocasionado por la exposición al cadmio ha sido descrita en roedores. Lafuente (2013) evaluó la disrupción neuroendócrina por efecto del cadmio en el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HHG) y la consecuente alteración de patrones diarios y circadianos en la actividad de la HHG, entre ellos el comportamiento de GSH y la expresión del balance redox. Resultados similares del papel disruptor endócrino del cadmio y la alteración de los mecanismos involucrados en el reloj circadiano fueron obtenidos por Jiménez-Ortega et al. (2010); los autores señalan el efecto de bajas concentraciones de Cd sobre la expresión circadiana de enzimas redox y genes reloj en la región medio basal del hipotálamo. Dado que el cerebro es el órgano de mayor consumo energético, esencial para los procesos esenciales que desempeña (Schmutz *et al.* 2012), la producción de radicales libres y ROS es mayor que otros órganos lo cual determina su elevada susceptibilidad a los efectos de xenobióticos reactivos como el cadmio. Los efectos tóxicos del cadmio sobre el reloj central a nivel de sistema nervioso central pueden a la vez repercutir en la sincronización que existe con el oscilador periférico en el hígado. De tal manera, es posible suponer que en los juveniles de *A. mexicanum* el efecto adverso del cadmio sobre la expresión diurna del sistema glutatión a nivel hepático sea consecuencia de la acción tóxica del metal tanto a nivel del reloj en el sistema nervioso central como en el reloj periférico hepático.

La alteración de los niveles hepáticos del glutatión asociado a la generación de estrés oxidante por la exposición a un metal altamente reactivo como el cadmio ha sido ampliamente documentado en mamíferos roedores y en peces teleósteos, con resultados contradictorios. En roedores, la administración de dosis elevadas de cadmio incrementa los niveles de GSH-T con evidencias de lipoperoxidación hepática (Shaiku *et al.*, 1999; Cartaña *et al.*, 1992). Este mismo comportamiento es registrado en peces teleósteos bajo

exposiciones subletales, subcrónicas al cadmio, de 14 a 28 d (Lange *et al.* 2002; Schlenk y Rice, 1998; Thomas *et al.* 1982; Tort *et al.* 1996). Sin embargo, otros estudios en roedores (Kawata *et al.* 1983) y en peces (Thomas y Wofford, 1993) reportan la reducción o un efecto nulo en las concentraciones hepáticas de GSH-T ante exposiciones subcrónicas al metal. En los anfibios, la información generada al respecto es limitada si bien se reporta que la exposición subletal de 28 d al cadmio en el anuro, *Hoplobatrachus occipitalis*, ocasiona la reducción del GSH y el aumento en los niveles de peroxidación lipídica a nivel hepático (Ezemonye, 2011). La discrepancia en los resultados obtenidos puede ser reflejo de respuestas especie-específicas, de diferentes condiciones experimentales, la magnitud de la exposición, rutas de incorporación y el curso de la intoxicación por el cadmio así como de la edad y condición nutricional de los organismos bajo estudio.

En el presente estudio, la exposición subletal en los juveniles de *A. mexicanum* a los niveles más bajos del metal (16.7 µg Cd/L) ocasionó una drástica reducción en el pool de glutatión, el cual actúa como una primera línea de defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ROS; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los resultados obtenidos sugieren una condición severa de estrés oxidante y la alteración del balance redox celular, probablemente relacionados con la inhibición de los procesos de reciclaje del glutatión. Los mecanismos que explican el efecto del cadmio sobre la alteración del sistema glutatión en anfibios han sido poco estudiados. En ratas sometidas a muy bajas concentraciones de cadmio (5 µmoles Cd/kg PH) se ha demostrado que el metal conjuga tioles de bajo peso molecular como metalotioneínas (MT), cisteína (Cys) y GSH, reduciendo las concentraciones funcionales celulares pero a la vez limitando la toxicidad del ión libre (rev. Zalups y Ahmad, 2003). La reducción del glutatión debido a la producción de especies reactivas que exceden la habilidad de regenerar el GSH, también ha sido demostrada en ratones expuestos a dosis bajas de cadmio (rev. Stohs y Biagchi, 1995). Al igual que en los roedores, es probable que estos procesos estén operando en los juveniles de *A. mexicanum* expuestos en las concentraciones más bajas del metal. Sin embargo, dado el agotamiento del pool celular de glutatión es posible suponer la participación activa del sistema tioredoxina (Trx) como respuesta compensatoria, para regular el balance redox celular ante las condiciones de estrés oxidante (rev. Circu y Aw, 2010). Las Trx's son proteínas de bajo peso molecular que participan de manera acoplada con el sistema glutatión, donde el sistema glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) y el sistema Tiorredoxina reducida y oxidada (Trx-SH/Trx-SS) son sistemas independientes, pero

acoplados, que participan en el control y la regulación del balance redox celular (rev. Circu y Aw, 2010).

En contraste a lo observado bajo una exposición a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ , en los juveniles de *A. mexicanum* expuestos a la mayor concentración subletal del cadmio (163  $\mu\text{g Cd/L}$ ) se registró el incremento en todos los parámetros evaluados del sistema glutatión a nivel hepático (GSH-T, GSH, GSSG). El GSH-T presentó un aumento del 74% en comparación con el grupo expuesto a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ ; sin embargo, se mantuvo 20% por debajo de los niveles máximos del grupo control. El mismo patrón fue observado para el GSH, si bien los niveles de GSSG aumentaron a niveles similares del grupo control. Es probable que el aumento del pool del glutatión registrado en 163  $\mu\text{g Cd/L}$  esté asociado a la activación de los sistemas reguladores de la molécula y a una síntesis *de novo* de GSH ante una mayor concentración de ROS, como ha sido descrito en otros estudios. La inducción de la síntesis *de novo* del GSH, mediada por la inducción de la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa, en respuesta al efecto oxidante de plaguicidas organofosforados ha sido descrito en peces (Peña-Llopis *et al.*, 2003) y en bivalvos marinos (Peña-Llopis *et al.*, 2002).

Los genes que codifican para enzimas clave en la síntesis *de novo* del glutatión son reconocidos como genes redox sensibles o son regulados por genes sensibles a los cambios en el estado redox celular (Xu *et al.*, 2012; Lu, 2009; Deneke y Fanburg, 1989). Es posible sugerir que el incremento en la acumulación hepática del cadmio observado en los ajolotes expuestos a 163  $\mu\text{g Cd/L}$  este asociado a una elevación general en la producción de ROS que actuaría como el estímulo para la activación de la síntesis de la maquinaria antioxidante y particularmente del GSH. En este escenario, se esperaría la inducción de la enzima glutatión sintasa o de la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa que participan activamente en la síntesis del glutatión (Lu, 2009; Deneke y Fanburg, 1989), aspectos que son motivo de futuros estudios en *A. mexicanum* para corroborar la hipótesis.

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian a la vez la precaución que se debe tener en el uso de biomarcadores integrales de estrés oxidante como la razón GSH/GSSG. Esta razón se considera un índice adecuado del estado redox celular al integrar el comportamiento del GSH y GSSG (Peña-Llopis *et al.*, 2003). En condiciones normales celulares, del pool total de glutatión, el 90-99% se encuentra en forma reducida (GSH) y el 1-10% en forma oxidada (GSSG) (Deneke y Fanburg, 1989). De tal manera, razones de GSH/GSSG de 9 a 99 dan cuenta de un balance redox celular normal. En el presente estudio, la razón GSH/GSSG promedio diaria de 10.6 en el hígado de los juveniles

de *A. mexicanum* fue similar a los valores teóricos esperados y da cuenta de una condición de homeostasis redox celular. Estos valores son similares a los reportados en otros anfibios (Vogiatzis y Loumbourdis, 1998; Joannis y Storey, 1996). Sin embargo, en los ajolotes expuestos a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ , la razón GSH/GSSG promedio diaria de 0.34 da cuenta de una condición severa de estrés oxidante por la exposición al metal, producto de la reducción significativa del pool celular de GSH. Resultados similares han sido reportados en diversas especies. La reducción en la razón GSH/GSSG por la exposición al Cd como consecuencia del agotamiento del pool de GSH ha sido reportado en peces (Peña-Llopis *et al.*, 2003; Eraglu *et al.*, 2014) y en roedores (Tandom, 2003; Jamba *et al.*, 1997). En contraste, Lange (2002) demuestra la inducción de estrés oxidante por la exposición subletal al cadmio en peces sin que se manifiesten modificaciones en la razón GSH/GSSG. Resultados similares fueron observados en el presente estudio en los ajolotes expuestos a 163  $\mu\text{g Cd/L}$ , donde los valores promedio diarios de la razón GSH/GSSG de 20.1 reflejarían una condición estable del balance redox. Sin embargo, las alteraciones observadas en la ritmicidad diaria de los parámetros del sistema glutatión dan cuenta del estrés oxidante de la exposición subletal al cadmio. Aún más, la probable síntesis *de novo* del glutatión no es suficiente para reducir la alteración en el balance redox celular ocasionado por el cadmio, evidenciado por el incremento significativo en la actividad de las catalasas y en la peroxidación lipídica hepática de los ajolotes (García-Ávila, 2015; datos no publicados). De tal manera, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian la precaución que se debe tener en la interpretación de biomarcadores integrales de estrés oxidante como la razón GSH/GSSG.

En anfibios, se ha descrito una producción importante de ROS durante los procesos de regeneración celular posiblemente relacionada con un sistema antioxidante de mayor capacidad. En *Xenopus laevis*, la participación de ROS es crucial para la regeneración de extremidades amputadas directamente vinculado con el metabolismo de glucosa (Love *et al.* 2013a; 2013b). En *A. mexicanum* se ha descrito también su elevada capacidad regenerativa (Lee y Gardiner, 2012; Holder *et al.* 1980) y es probable la existencia de niveles elevados de ROS y con ello un sistema antioxidante eficiente, capaz de compensarlo. Si bien en *A. mexicanum*, la probable participación de un sistema antioxidante de mayor potencial le puede otorgar una protección adicional contra los efectos adversos de estresores oxidantes como la exposición al cadmio, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que aún bajo condiciones subletales al cadmio, en concentraciones ambientalmente

relevantes, el metal ejerce efectos adversos sobre el balance redox de los organismos, tanto en su expresión rítmica como en su capacidad de respuesta.

## **8.2.2. Efecto del cadmio en el metabolismo aerobio: Nivel fisiológico**

### **8.2.2.1. Ritmicidad diaria del consumo de oxígeno**

En todos los organismos la ritmicidad diaria/circadiana del metabolismo aerobio se relaciona con la ritmicidad en la actividad locomotora y es reflejo de las demandas energéticas de los organismos para sus actividades y procesos funcionales de rutina (Frisard y Ravussin, 2006; Jacopo, 2004). A la fecha, los estudios en anfibios anuros y urodelos se han centrado en el comportamiento circadiano de la actividad locomotora (rev. Oishi *et al.*, 2004) por lo que, hasta donde es de nuestro conocimiento, el presente estudio constituye el primer registro del patrón diario del metabolismo aerobio en anfibios y particularmente en *Ambystoma mexicanum*.

En los juveniles de *A. mexicanum* del grupo control, la ritmicidad unimodal del consumo de oxígeno con un periodo cercano a la 24:00 h y acrofase (máxima tasa) a las 11:00 h, refleja los requerimientos energéticos de rutina de los organismos en un ciclo de 24 h. En todos los organismos, incluidos los anfibios, la ritmicidad del metabolismo aerobio obedece a su regulación neuroendocrina, donde la ritmicidad del consumo de oxígeno como un biomarcador del estado metabólico de los organismos es una de las respuestas de salida del sistema circadiano (Mazzoccoli, 2012; Jacopo, 2004). En anfibios, existe evidencia de un oscilador en la región hipotalámica que puede ser responsable de la oscilación de distintos componentes del metabolismo aerobio, incluyendo al consumo de oxígeno (Yoshikawa, 1998). De tal manera, la periodicidad del consumo de oxígeno en los juveniles de *A. mexicanum* pudiera reflejar la expresión del ritmo diario de un sistema metabólico sincronizado a un reloj central.

En los juveniles de *A. mexicanum* del grupo control, la ritmicidad unimodal del consumo de oxígeno con un periodo cercano a la 24:00 h y acrofase (máxima tasa) a las 11:00 h, refleja los requerimientos energéticos de rutina de los organismos en un ciclo de 24 h. En todos los organismos, incluidos los anfibios, la ritmicidad del metabolismo aerobio obedece a su regulación neuroendocrina, donde la ritmicidad del consumo de oxígeno como un biomarcador del estado metabólico de los organismos es una de las respuestas de salida del sistema circadiano (Lafuente, 2013; Jacopo, 2004). Se reconoce la ritmicidad circadiana de genes regulados por genes reloj que participan en la expresión temporal del metabolismo

aerobio, a distintos niveles (Ramsey *et al.* 2009; Ruiter *et al.* 2003; Roesler *et al.* 1985; Kida *et al.* 1980).

En los grupos experimentales, la exposición subletal al cadmio alteró el ritmo diario del consumo de oxígeno de los ajolotes ocasionando cambios significativos en el patrón diario, en la expresión de su intensidad y cambios de fase. La exposición al cadmio alteró el patrón unimodal a uno bimodal con un efecto severo en los organismos expuestos a la mayor concentración del metal (163  $\mu\text{g Cd/L}$ ) donde la ritmicidad del consumo de oxígeno se pierde por completo. Los resultados obtenidos sugieren el efecto neurotóxico del cadmio en el reloj central, el cual regula la expresión rítmica de numerosas funciones entre ellas el metabolismo aerobio, como ha sido descrito en roedores expuestos a bajas concentraciones del metal. A nivel de sistema nervioso central, se sugiere que el eje hipotálamo-hipófisis-pituitaria puede ser el principal blanco de la toxicidad del cadmio (Lafuente, 2013). A este nivel, el cadmio altera la actividad de proteínas de transporte transmembranal como  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasas, canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , canales de  $\text{Zn}^{2+}$  y bombas  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$  (Van Kerhove, 2010). En específico, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se han asociado con el funcionamiento del reloj central por lo cual una alteración a este nivel puede ocasionar una disrupción de la ritmicidad circadiana de variables reguladas por el hipotálamo, entre ellas el metabolismo energético (Ko *et al.* 2009).

Muchas variables relacionadas con el mecanismo de obtención de oxígeno, su utilización como molécula central del metabolismo aerobio y la bioenergética de los organismos, se han descrito una ritmicidad diaria y están reguladas por la secreción de hormonas hipofisarias (Lafuente, 2013; Jacopo, 2004). De tal manera, un segundo nivel de toxicidad del cadmio que explica la alteración en la ritmicidad diaria, es la disrupción de procesos de señalización endocrina en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas, al afectar la secreción de hormonas y neurotransmisores. El mecanismo central en la alteración de la ritmicidad diaria de variables fisiológicas ocasionada por el cadmio es su efecto neurotóxico sobre el reloj central por medio de la inducción de estrés oxidante y la modificación de la expresión de genes reloj, genes redox sensibles y genes ligados al metabolismo como ha sido descrito en roedores (Jiménez-Ortega *et al.* 2010). De tal manera, es posible suponer que en los juveniles de *A. mexicanum* expuestos al cadmio, operen múltiples mecanismos involucrados en la alteración temporal del metabolismo aerobio, responsables de la cronotoxicidad del cadmio sobre el consumo de oxígeno de los organismos, estos son aspectos sujetos a corroboración futura.

### 8.2.2.2. Condición energética

Una alteración a notar en los ajolotes expuestos al cadmio fue el cambio en los parámetros energéticos de la amplitud metabólica y el campo de actividad metabólica de los organismos así como el consumo de oxígeno promedio diario. El incremento de estos parámetros en los ajolotes expuestos a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  y la reducción observada en los expuestos a 163  $\mu\text{g Cd/L}$ , coincide con las dos fases de respuesta ante la exposición al cadmio descritas por Reflexans (1988), las cuales se relacionan con el tiempo de exposición y con la concentración del metal en el medio (y por lo tanto con su bioacumulación). Al igual que en los juveniles de *A. mexicanum* del presente estudio, diversos trabajos en crustáceos (Zuñiga-Lagunes, 2002; Vanegas-Peréz, 1996; Gaudy *et al.* 1991) y en peces (Couture, 2007) apoyan el patrón descrito por Reflexans (1988).

El incremento en las demandas energéticas observado en los ajolotes expuestos a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  puede obedecer a un aumento en la demanda de ATP asociado a los procesos de desintoxicación, protección y/o compensación al efecto tóxico del cadmio, como ha sido descrito en crustáceos (Zuñiga-Lagunes, 2002; Vanegas-Peréz, 1996) y peces (Berntssen y Lundebye, 2001; McGeer *et al.* 2000). Por otro lado, la reducción en las demandas energéticas observada en los ajolotes expuestos a la mayor concentración de cadmio (163  $\mu\text{g Cd/L}$ ) refleja la incapacidad de los organismos de cubrir la demanda requerida de ATP y puede obedecer a la alteración de múltiples procesos. El cadmio está involucrado en alteraciones del ciclo de Krebs por daños a nivel enzimático o estructural en la ruta metabólica (Bansal *et al.*, 2002), daños en la cadena transportadora de electrones (Wang *et al.*, 2004) y daños a la señalización endocrina que regula muchos procesos metabólicos (Lafuente, 2013; Ricard *et al.*, 1998).

En los organismos, el metabolismo aerobio integra las demandas de oxígeno y ATP para sus funciones de rutina y las involucradas en costos de actividad locomotora (Randall, 2002). En este sentido, el efecto neurotóxico del cadmio en organismos acuáticos se refleja además en la reducción de la actividad de nado y en la alteración en sus patrones de alimentación (Pestana *et al.* 2007; Lefcort *et al.* 1998; Bryan *et al.* 1995; Atchinson *et al.* 1987). De tal manera en los juveniles de *A. mexicanum* expuestos a 163  $\mu\text{g Cd/L}$ , el daño a los sistemas metabólicos, el agotamiento en los sistemas de compensación para reducir la toxicidad del cadmio y la reducción en la actividad de nado y alimentación observada durante la exposición al metal, podrían explicar el decremento de la amplitud metabólica y del campo de actividad metabólica.

### **8.2.3. Efecto del cadmio en el Crecimiento e Índices de Condición: Nivel Fisiológico**

En el presente estudio, los índices de condición evaluados en los juveniles de *A. mexicanum* expuestos 15 d a niveles subletales de cadmio, demuestran que el efecto tóxico del metal no se manifestó en indicadores globales como son el Índice de Foulton, el Índice Hepatosomático y la tasa de crecimiento, como ha sido señalado en otros organismos. En peces, el índice de Foulton (Pavlov *et al.*, 2014; Heydarnejad *et al.*, 2013; Kerambrun *et al.*, 2012; Riddell *et al.*, 2005) y el índice Hepatosomático disminuyen en respuesta al aumento en la concentración de cadmio en el medio (Traven *et al.*, 2013; Van Dyk *et al.*, 2007; Sindhe *et al.*, 2004; Thomas y Wofford, 1993; Lowe-Jiude y Niimi, 1984). La exposición crónica al cadmio, reduce a la vez la tasa de crecimiento en peces (Heydarnejad *et al.*, 2013; Kerambrun *et al.*, 2012) y en anfibios (Sharma y Patiño, 2009). De manera global, los estudios realizados señalan que la influencia del cadmio sobre estas respuestas está determinada por variables como la edad, sexo, especie, intensidad del estímulo estresor (concentración del tóxico) y duración del tiempo de exposición.

Es posible suponer que el tiempo de exposición subletal de 15 d al cadmio en juveniles de *A. mexicanum* no fue un periodo suficiente para detectar que el efecto significativo registrado en las alteraciones bioquímicas (sistema glutatión) y metabólicas (metabolismo aerobio) se viera reflejado en respuestas integrales como los Índices de Foulton, Hepatosomático e incluso en la tasa de crecimiento. No obstante, aunque el efecto del cadmio no pudo ser evaluado a nivel global organismico, observaciones conductuales evaluadas demuestran cambios en variables relacionados con el estado metabólico y fisiológico de los ajolotes (i.e. actividad locomotora y conductas de alimentación). Estas observaciones incluyeron la lentitud en la captura del alimento suministrado y nado errático particularmente en los ajolotes expuestos a 163 µg Cd/L. Estas observaciones están de acuerdo con efectos del cadmio sobre la conducta evaluadas en otros organismos como peces y crustáceos (Pestana *et al.*, 2007; Bryan *et al.*, 1995; Atchinson *et al.*, 1987). En anfibios, el efecto subletal de metales sobre la conducta se ha reportado en fases iniciales del desarrollo (estadios larvales) con efectos sobre respuestas de miedo (“fright response”), forrajeo y búsqueda de refugios (Lefcort *et al.*, 1998), alteraciones conductuales que se relacionan con un daño a nivel neurofisiológico y particularmente sobre el sistema de quimiorrecepción. De acuerdo a Lefcort *et al.* (1998) los efectos subletales de metales pueden no ocasionar un efecto sobre variables morfológicas globales pero si sobre respuestas conductuales. Lo anterior explicaría los resultados obtenidos en los juveniles de *A.*



*mexicanum*, donde si bien los índices globales de condición no demuestran una alteración, se observan comportamientos conductuales alterados en los organismos expuestos a la condición subletal más elevada de cadmio lo cual sugiere a la vez el efecto neurotóxico del metal.

El efecto neurotóxico del cadmio se relaciona con la generación de una condición de estrés oxidante y daños a nivel estructural y funcional, incluyendo daño a estructuras de quimiorrecepción, daño sobre el sistema musculo esquelético y su señalización neuronal con el sistema nervioso central y, la alteración de los procesos metabólicos encargados de la producción de energía (rev. en Lafuente, 2013). Debido al acople que existe entre la actividad locomotora, el consumo de oxígeno, la producción de ROS y el balance redox celular, es probable que las alteraciones conductuales sean una evidencia adicional del efecto subletal del cadmio asociado con la alteración del estado redox general de los juveniles de *A. mexicanum*.

Cabe señalar que a la fecha, no se han detectado estudios que reporten en anfibios y menos aún en *A. mexicanum* el efecto del cadmio sobre la ritmicidad del balance redox y del metabolismo aerobio, ni sobre aspectos bioenergéticos relacionados, por lo cual el presente estudio se propone como uno de los primeros con este enfoque. Las alteraciones observadas del efecto de niveles subletales de cadmio sobre las respuestas evaluadas, pueden tener un efecto negativo a largo plazo sobre el desempeño global de los ajolotes comprometiendo su desarrollo, crecimiento y sobrevivencia y por lo tanto, incidir adversamente en la estabilidad de sus poblaciones en su ambiente natural, actualmente impactado por concentraciones relevantes de metales, entre ellos el cadmio (Rodríguez-Evangelista, 2011; González-Rendón, 2006).

## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra la ritmicidad diaria del sistema glutatión y del metabolismo aerobio en los juveniles de *A. mexicanum*. De igual manera se demuestra el efecto neurotóxico de la exposición subletal al cadmio, en concentraciones ambientalmente relevantes, en la regulación de los ritmos diarios del estado redox celular hepático y del consumo de oxígeno, aunque no se detectaron alteraciones en patrones morfométricos e índices de condición fisiológica.

Los resultados obtenidos a nivel bioquímico por medio de la evaluación del GSH-T, GSH, GSSG y la razón GSH/GSSG demuestran la existencia de una ritmicidad diaria ligada con el estado redox celular. La exposición subletal al cadmio, demostró tanto su acción oxidante como su efecto disruptor sobre la ritmicidad diurna del sistema glutatión y fueron consecuencia tanto de la atenuación del ritmo (pérdida del ritmo), como de los cambios de fase (acrofase y batifase). Ante una exposición subletal a la menor concentración de cadmio (16.7  $\mu\text{g Cd/L}$ ), el sistema glutatión presentó un fuerte decremento. Es probable que el cadmio participe a través de vías directas e indirectas de toxicidad alterando la funcionalidad de las moléculas antioxidantes y ocasione el agotamiento del pool de glutatión. En la mayor exposición subletal al metal (163  $\mu\text{g Cd/L}$ ), la concentración del sistema glutatión aumentó, si bien se mantuvo la pérdida de la ritmicidad diurna. Es probable que ante una concentración mayor de cadmio ocurra una mayor producción de ROS y con ello la activación de procesos de síntesis *de novo* de glutatión y enzimas relacionadas. Si bien en esta condición se observó la aparente recuperación del estado redox celular a través de los valores de la razón GSH/GSSG y la recuperación de su ritmicidad, los resultados obtenidos sugieren tomar con precaución la interpretación de este índice como un biomarcador idóneo del estado redox celular.

En el presente estudio, se comprobó la existencia de un ritmo diario en la tasa metabólica de ajolotes juveniles de *A. mexicanum* evaluada a través del consumo de oxígeno. De igual manera se demostró el efecto subletal del cadmio sobre la alteración temporal de la expresión del consumo de oxígeno. Las alteraciones observadas por la exposición a 16.7  $\mu\text{g Cd/L}$  incluyen una reducción en el periodo y un aumento de la amplitud del ritmo, lo cual sugiere un incremento en la demanda energética ante un estresor como el cadmio y se ve reflejado en un aumento de la amplitud metabólica y el campo de actividad metabólica. Bajo la exposición a 163  $\mu\text{g Cd/L}$ , el ritmo se pierde por completo y las variables metabólicas calculadas (amplitud y campo de actividad metabólica) se reducen

significativamente lo cual sugiere un probable daño funcional que conlleva un decremento en la capacidad de obtención de energía del animal.

Es probable sugerir que en *A. mexicanum* la cronotoxicidad del cadmio evaluada obedezca a la alteración de los procesos de regulación circadiana mediados por el reloj central así como la señalización con los osciladores periféricos ubicados en el hígado.

El cadmio es un metal de elevada toxicidad, presente en ambientes acuáticos, donde puede ocasionar importantes daños a las poblaciones y comunidades. El impacto del cadmio sobre la regulación de los ritmos biológicos del estado redox celular y del metabolismo, puede afectar el desempeño de los organismos en su medio. Una alteración en estos procesos anticipatorios implica una desventaja adaptativa y una menor tasa de supervivencia. En especial, el efecto del cadmio sobre la ritmicidad biológica será mayor en especies sensibles a contaminantes como es el ajolote *Ambystoma mexicanum*. La consideración de este trabajo como evidencia de la cronotoxicidad del cadmio sobre respuestas de tanta importancia para los organismos debe tomarse en cuenta para futuros planes de manejo y conservación de la especie o de la restauración ecológica de su ambiente, la zona lacustre de Xochimilco.

Los mecanismos del cadmio como neurotóxico están poco estudiados y la posibilidad de que el efecto evaluado en este trabajo se relacione con daños a nivel del reloj central son elevadas. Por ello se sugiere elaborar estudios donde se analice el efecto del cadmio sobre estructuras cerebrales como el hipotálamo y daños a nivel de señalización neuronal a osciladores periféricos vinculados con el balance redox y el metabolismo, así como en la alteración de genes reloj que tienen un papel fundamental en la regulación circadiana. Estos resultados darían un marco más sólido para describir las alteraciones de los ritmos biológicos ante contaminantes de reconocida acción disruptora neuroendócrina, como el cadmio. Estos trabajos deben considerar un diseño experimental adecuado (i.e. condiciones de oscuridad constante) para revelar la presencia de un ritmo endógeno. De igual manera, son relevantes los estudios complementarios que relacionen la ritmicidad de la actividad locomotora con el metabolismo aerobio. Bajo todas estas consideraciones, el presente estudio es una novedosa e importante fuente de información para evidenciar el efecto de contaminantes sobre los ritmos biológicos en organismos tan poco estudiados como son los anfibios.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S. and A. Rezase. 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*. 10(6): RA141-RA147.
- Agapito M.T., Redondo I., Plaza R., López-Burillo S., Recio J.M. and M. Pablos. 1999. Relationships between melatonin, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and catalase. Endogenous rhythms on cerebral cortex in *Gallus domesticus*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 460: 377–381.
- Atchinson G.J., Henry M.G. and M.B. Sandheinrich. 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of fishes*. 18(1): 11-25.
- Bansal P., Sharma P. and V. Goyal. 2002. Impact of lead and cadmium on enzyme of citric acid cycle in germinating pea seeds. *Biologia Plantarum*. 45(1): 125-127.
- Barlow-Walden L.R., Reiter R.J., Abe M., Pablos M., Menendez-Pelaez A., Chen L.D. and B. Poeggeler. 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International*. 26: 497–502.
- Barzilai A. and K.L. Yamamoto. 2004. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*. 3: 1109-1115.
- Berntssen M.H.G. and A.K. Lundebye. 2001. Energetics in atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) parr fed elevated dietary cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 128(3): 311-323.
- Beyersmann D. and S. Hechtenberg. 1997. Cadmium, gene regulation and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicology and applied Pharmacology*. 144: 247-261.
- Bleackley M.R. and R.T.A. MacGillivray. 2011. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*. 24: 785-809.
- Boyd R.S. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*. 36: 45-58.
- Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bryan M.D., Atchinson G.J., and M.B. Sandheinrich. 1995. Effects of cadmium on the foraging and growth of juvenile bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52(8): 1630-1638.
- Burggren W. and J. Roberts. Respiration and Metabolism. En: Prosser C.L. 1991 *Environmental and metabolic animal physiology*. Jhon Wiley & Sons Inc. New York. 352-435.
- Cadusseau J. and G. Galand. 1980. Electrophysiological evidence for white light sensitivity of the encephalon in eyeless and pinealectomized frogs. *Experimental Brain Research*. 40: 334-341.
- Cambar J., L'Azou B. and J.C. Cal. Chronotoxicology. En: Touitou Y. and E. Haus. 1992. *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Spinger Verlag. Berlin. pp. 138-150.
- Cartaña J., Romeu A. and L.L. Arola. 1992. Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 101C (2): 209-213.
- Cech J. Jr. Respirometry. En: Schreck CB. and P.B. Moyle (Eds.). 1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Maryland, USA. pp. 684.
- Cipolla-Neto J., Abdalla D.S., Markus R.P. and A. Campa. 1993. Circadian variations of superoxide dismutase activity in the rat pineal gland. *Journal of Neural Transmission*. 92: 117–123.
- Circu M.L. and T.Y. Aw. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical Biology and Medicine*. 48(6): 749-762.

- Crichton R.R., Wilmet S., Leggsy R. and R.J. Ward. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 91: 9-18.
- Couture P. y P. Rajen de Kumar. 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*. 64: 107-120.
- Cuyppers A.M., Plusquin M., Remans T., Josefczak M., Keunen E., Gielen H., Opdenakker K. Ravindran-Nair A., Munters E., Artois T.J., Nawrot T., Vangronsveld J. and K. Smeets. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23(5): 927-940.
- Davies M.H., Bozigian H.P., Merrick B.A., Birt D.F. and R.C. Schnell. 1983. Circadian variations in glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse. *Toxicological Letters*. 19: 23–27.
- De Montaigne A., Giakomtis A., Rubin M., Tóth R., Cremer F., Sokolava V., Porri A., Reymond M., Weining C. and G. Coupland. 2015. Natural diversity in daily rhythms of gene expression contributes to phenotypic variation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 112(3): 905-910.
- Deneke S. and B.L. Fanburg. 1989. Regulation of cellular glutathione. *American Journal of Physiology*. 257(4): 163-173.
- Díaz-Muñoz M., Hernández-Muñoz R., Suárez J. and V. Chagoya de Sánchez. 1985. Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience*. 16: 859–863.
- Dickinson D.A., and H.J. Forman. 2002. Cellular glutathione and thiol metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 64: 1019-1026.
- Di Toro D.M., Allen H.E., Bergamn H.L., Meyer J.S., Paquin P.R. and R.C. Santore. 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(10): 2383-2396.
- Díaz-Torres E., Gibson R., González-Farías F., Zarco-Arista A.E. and M. Mazari-Hiriart. 2013. Endocrine disruptors in the Xochimilco wetland, Mexico City. *Water Air and Soil Pollution*. 224: 1586.
- Dobovoljc K., Falnoga I., Tušek-Ťnidarie M., Mazej D., Ščančar J. and B. Bulog. 2012. Cd, Cu, Zn, Se, and Metallothioneins in two amphibians, *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata) and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *Biological Trace Metal Research*. 150: 178-194.
- Dolmen D. 1983. Diel rhythms of *Triturus vulgaris* (L.) and *T. cristatus* (Laurenti) (Amphibia) in central Norway. *Gunneria* 42:1-37.
- Douglas-Turney L. and V.H. Hutchinson. 1974. Metabolic scope, oxygen debt and the diurnal oxygen consumption cycle of the leopard frog *Rana pipiens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 49A: 583-601.
- Durán-Lizárraga M.E., Prieto-Sagredo J., Gosenbatt M.E., and M.L. Fanjul-Morales 2001. Crayfish *Procambarus clarkii* shows circadian variations in different parameters of the GSH cycle. *Photochemistry and Photobiology* 7(2):350-355.
- Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*. 62: 644-671.
- Ezemonye L.I.N. and A.A. Enuneku 2011. Biochemical alterations on *Haplobatrachus occipitalis* exposed to sublethal concentrations of cadmium. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 11: 485-489.
- Eroglu A., Dogan Z., Kanak E.G., Atli G. and M. Camli. 2014. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science Pollution Research*. 22: 3229-3237.

- Fanjul-Moles M.L., Bosques-Tistler T., Prieto-Sagredo J., Castañón-Cervantes O. and L. Fernández-Rivera. 1998. Effect of variation in photoperiod and light intensity on oxygen consumption, lactate concentration and behaviour in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119 A(1): 363-269.
- Fanjul-Moles M.L., Duran-Lizárraga M.E., Gonsebatt M.E. and J.A. Prieto. 2003. The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochemistry and Photobiology*. 77(2): 210-218.
- Fanjul-Moles M.L., Prieto-Sagredo J.A., López D.S., Bartolo-Orozco R. and H. Cruz-Rosas. 2009. Crayfish *Procambarus clarkii* retina and nervous system exhibit antioxidant circadian rhythms coupled with metabolic and luminous daily cycles. *Photochemistry and Photobiology*. 85:78-87.
- Finkel T. and N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
- Frisard M. and E. Ravussin. 2006. Energy metabolism and oxidative stress. Impact on the metabolic syndrome and aging process. *Endocrine*. 29(1): 27-32.
- Forman H.J., Zhang H. and A. Rinna. 2008. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Molecular aspects of Medicine*. 30: 1-12.
- Foyer C.H., Lelandais M. and K.L. Kunert. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 92(4): 696-717.
- Gaudy R., Guérin J.P. and P. Kerambrun. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomys lingvura* (Crustacea: Mysidacea). *Marine Biology*. 109:493-501.
- González-Rendón S. 2006. Evaluación *in situ* del efecto biológico de metales pesados en el ajolote *Ambystoma mexicanum*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM. pp 91.
- Griffith O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*. 106: 207-212.
- Halliwell B. and S. Chirico. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 715S-725S.
- Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge 1999. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>ra</sup> Ed. Oxford Clarendon Press.
- Hardeland R., Coto-Montes A. and B. Poeggeler. 2003. Circadian Rhythms, Oxidative Stress, and Antioxidative Defense Mechanisms. *Chronobiology International*. 20(6): 921-62.
- Heydarnjad M.S., Khosravian-Hemamai and M.A. Nematollahi. 2013. Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Irish Veterinary Journal*. 66(11): 2-7.
- Hodoğlugil U., Ongun Ö., Güney Z., Altan N. and H. Zengil. 1995. Temporal variation in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiology International*. 12:152-155.
- Jacopo P.M. 2004. Breathing around the clock: an overview of the circadian pattern of respiration. *European Journal of Applied Physiology*. 91:119-129.
- Jamba L., Nehra B. and M.P. Bansal. 1997. Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposure in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 177: 169-175.
- Jiménez-Ortega V., Cardinali D.P., Fernández-Mateos M.P., Díaz-Lugo M.J., Scacchi P.A. and A.I Esquifino. 2010. Effect of cadmium on 24 hour pattern in expression of redox enzymes and clock genes in rat medial basal hypothalamus. *Biometals*. 23: 327-337.

- Jiménez-Ortega V., Cano-Barquilla P., Scacchi P.A, Cardinali D.P. and A.I. Esquifino 2011. Cadmium-induced disruption in 24-h expression of clock and redox enzyme genes in rat medial basal hypothalamus: Prevention by melatonin. *Frontiers in Neurology*. 2: 1-9.
- Jiménez-Ortega V., Cano-Barquilla P., Pagano E.S., P. Fernández-Mateos, A.I. Esquifino and D.P. Cardinali. 2012. Melatonin supplementation decreases prolactin synthesis and release in rat adenohypophysis: correlation with anterior pituitary redox state and circadian clock mechanisms. *Chronobiology International*. 29(8): 1021-1035.
- Kawata M. and K.T. Suzuki. 1983. Relation between metal and glutathione concentrations in mouse liver after cadmium, zinc or copper loading. *Toxicological Letters*. 15: 131-137.
- Kerambrun E., Perrichon H.F., Courcot L., Moziane T., Spilmant N. and R. Amara. 2012. Growth and condition indices of juveniles turbot, *Scotphthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology*. 108: 130-140.
- Kida K., Nishio T., Yocozaawa T., Nagai K., Matsuda H. and H. Nakagawa. 1980. The circadian change of gluconeogenesis in the liver in vivo fed rats. *Journal of Biochemistry*. 88: 1009-1013.
- Ko G.Y.P, Shi L. and M.L. Ko. 2009. Circadian regulation of ion channels and their functions. *Journal of Neurochemistry*. 110(4): 1150-1169.
- Kohen R. and A. Nyska. 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods of their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30(6): 620-50.
- Kültz D. 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*. 67: 225-57.
- Lafuente A. 2013. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis is target of cadmium toxicity. An update of recent studies and potential therapeutic approaches. *Food and Chemical Toxicology*. 59: 395-404.
- Lange A., Ausseil O. and H. Segner. 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothioneins mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to Cd and Zn. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131C: 231-243.
- Lapenna D., De Gioia S., Mezzetti A., Porreca E., Ciofani G., Marzio L., Capani F., Di Ilio C. and F. Cuccurullo. 1992. Circadian variations in antioxidant defences and lipid peroxidation in the rat heart. *Free Radical Research Communication*. 17: 187-194.
- Lefcort H., Mcguire R.A., Wilson L.H. and W.F. Ettinger. 1998. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antepredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35: 447-456.
- Lowe-Jinde L. and A.J. Niimi. 1984. Short-term and long-term effects of cadmium on glycogen reserves and liver size in rainbow trout (*Salmo gairdnari*, Richardson). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 13: 759-764.
- Lu S.C. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30: 42-59.
- Lushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101: 13-30.
- Mátovic V., Buha A., Bulat Z. and D. Dukic-Cosic. 2011. Cadmium toxicity revisited: Focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 62:65-76.
- Mazari-Hiriart M., López-Vidal Y., Castillo-Rojas G., Ponce de León S. and A. Cravioto. 2001. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico city. *Archives of Medical Research*. 32: 458-467.

- Mazzoccoli G., Paziienza V. and M. Vinciguerra. 2012. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiology International*. 29(3): 227-251.
- McGeer J.C., Szebedinszky C., McDonald D.G. and C.M. Wood. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to water borne Cu, Cd, or Zn in rainbow trout: 1. Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicology*. 50(3): 231-243.
- Morgan E. 2004. Overview: Ecological significance of biological clocks. *Biological Rhythm Research*. 35: 3-12.
- Mouchet, F. Baudrimont M., Gonzalez P., Cuenot Y., Bourdineaud J.P., Boudou A. and L. Gauthier. 2006. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicology*. 78: 157-166.
- Moulis J.M. and F. Thevenod. 2010. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals*. 23: 763-768.
- Nagai K. and T. Oishi. 1998. Behavioral rhythms of the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*, under semi natural condition. *International Journal of Biometeorology*. 41: 105-112.
- Nash R.D.M, Valencia A.H. and A.J. Geffen. 2006. The origin of Foulton's condition factor: setting the record straight. *Fisheries*. 31(5): 236-38.
- Nelson D.L., and M.M. Cox. 2000. Lehninger: Principios de Bioquímica. 3ra ed. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 6-12.
- Newman M.C., and Jagoe C.H. 1996. Ecotoxicology. A hierarchical treatment. 1<sup>era</sup> ed. Lewis Publishers. New York. pp. 20-25.
- North C., Feuers R.J., Scheving L.E., Pauly J.E., Tsai T.H. and D.A. Casciano. 1981. Circadian organization of thirteen liver and six brain enzymes of the mouse. *The American Journal of Anatomy*. 162:183-199.
- Nye H., Cameron J., Chernoff E. and D. Stocum. 2003. Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Developmental Dynamics*. 226: 555-560.
- Oishi T., Nagai K., Harada Y., Naruse M., Ohtani M., Kaurano E. and S. Tamotsu. 2004. Circadian rhythms in amphibians and reptiles: ecological implications. *Biological Rhythm Research*. 35(1-2): 105-120.
- Pavlov D.F., Chuiko G.M. and D.D. Pavlov. 2014. Growth of Mozambique *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*, Peters) chronically exposed to cadmium, Naphthalene, and DDVD. *Inland Water Biology*. 7(1): 97-100.
- Pazos-Mandujano R., Astroga-González E. y M. Hernández-Quiroz. Digestión ácida asistida por microondas de tejidos de peces método EPA SW-3052 modificado para la determinación de metales. En: Ponce de León Hill C., R.C. Vanegas Pérez, Hernández-Quiroz M. y S. Cram-Heydrich (Eds.). 2012. Conceptos y procedimientos para el análisis de muestras ambientales. *Editorial Las prensas de Ciencias*. México. pp. 88-91.
- Peek B.C., Affinati A.H., Moynihan-Ramsey K., Kuo H.Y., Yu W., Sena L.A., Ilkayeva O., Marcheva B., Kobayashi Y., Omura C., Levine D.C., Bacsik D.J., Gius D., Newgard C.B., Goetzman E., Chandel N.S., Dena J.M., Mrksich M. and J. Bass. 2013. Circadian clock NAD<sup>+</sup> cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science*. 342 (6158): doi: 10.1126/science.1243417.
- Peña-Llopis S., Fernando M.D. and J.B. Peña. 2002. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere*. 47(5): 485-497.



- Peña-Llopis S., Fernando M.D. and J.B. Peña. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetyl cysteine. *Aquatic Toxicology*. 65(4): 337-360.
- Pestana J.L.T., Ré A., Nogueira A.J.A. and A.M.V.M. Soares. 2007. Effects of cadmium and zinc on the feeding behavior of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere*. 68(8): 1556-1562.
- Pittendrigh C.S. 1981. General perspective. En: Aschoff J. 1984. Biological clock. Handbook of behavioral neurobiology. *Plenum Press*. New York 4:56-79.
- Ramsey K.M., Yoshino J., Brace C.S., Abrassart D., Kobayashi Y., Marcheva B., Hong H.K., Chang J.L., Buhr E.D., Lee C., Takahashi J.S., Imai S. and J. Bass. 2009. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science*. 324: 651-654.
- Randall D., Burggren W. and K. French. 2002. Eckert Animal Physiology: mechanisms and adaptations. 5<sup>ta</sup> ed. *Editorial W.H. Freeman and co*. New York. pp. 667-673.
- Reflexans J.C., Lerat L. et H. Etcheber. 1988. Une stratégie a'etude des effets de quelques polluants (Cd, Zn, BaP) sur la respiration de communautés benthiques maintenues in vitro. *Oceanis*. 14: 411-421.
- Ricard A.C., Daniel C., Anderson P. and A. Hontela. 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride in endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34: 377-381.
- Riddell D.J., Culp J.M. and D.J. Baird. 2005. Sublethal effects of cadmium on prey choice and capture efficiency in juveniles brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(7): 1751-1758.
- Robles-Martínez M. 2011. Ritmo circadiano diario de la actividad locomotriz en el ajolote mexicano juvenil *Ambystoma mexicanum*: sincronización y libre curso. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. pp. 43.
- Robles-Mendoza C., García C., Cram S., Hernández M. and C.R. Vanegas. 2009. Organophosphorous pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). *Chemosphere*. 74: 703-709.
- Robles-Mendoza C., Zuñiga-Lagunes S., Ponce de León-Hill C.A., Hernández-Soto J. and Vanegas-Perez C. 2011. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication in locomotion activity. *Aquatic Toxicology*. 105: 728-34.
- Rodier J. 1981. Análisis de las aguas. *Editorial Omega*. Barcelona. pp. 504.
- Rodríguez-Evangelista F. 2011. Inducción de metalotioneinas como biomarcador de exposición *in situ* de metales en *Ambystoma mexicanum*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM. pp. 80.
- Roesler W.J. and R.L. Khandelwal. 1985. Diurnal variations in the activities of the glycogen metabolizing enzymes in mouse liver. *International Journal of Biochemistry*. 17: 81-85.
- Rosas C., Vanegas R.C., Alcaraz G. and F. Díaz. 1991. Effect of eyestalk ablation on oxygen consumption of *Callinectes similis* exposed to salinity changes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100A(1): 75-80.
- Ruiter M., Lafleur S.E., van Heijningen C., van der Vliet J., Kalsbeek A. and R.M. Buijs 2003. The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes*. 52: 1709-1715.
- Rusak B. Vertebrate behavioural rhythms. In: Aschoff J. 1981. *Handbook of Behavioural Neurobiology, Biological Rhythms*. New York Plenum Press. 4: 183-213.
- Rutter J., Reick M. and S.L. McKnight. 2002. Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annual Review of Biochemistry*. 71: 307-331.

- Schieber M. and N.S. Chandel. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*. 24: R453-R462.
- Schlenk D. and C.D. Rice. 1998. Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in teleost hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology*. 43: 121-129.
- Schmutz I., Albercht U. and J.A. Ripperger. 2012. The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 349: 38-44.
- Schreckenber, G. M. and A. G. Jacobson. 1975. Normal stages of development of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*. 400: 391-399.
- Shaiku Z.A., Vu T.T. and K. Zaman. 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 154: 256-263.
- Sharma B. and R. Patiño. 2009. Effects of cadmium on growth, Metamorphosis and gonadal sex differentiation in tadpoles of the african clawed frog *Xenopus laevis*. *Chemosphere*. 76(8): 1048-1055.
- Simon N., Papa K., Vidal J., Boulamery A. and B. Bruguerolle. 2003. Circadian rhythms of oxidative phosphorylation: effects of rotenone and melatonin on isolated rat brain mitochondria. *Chronobiology International*. 20(3): 451-461.
- Sindhe V.R. and R.S. Kulkarni. 2004. Gonadosomatic and hepatosomatic indices of the freshwater fish *Notopterus notopterus* (Pallas) in response to some heavy metal exposure. *Journal of Environmental Biology*. 25(3): 365-368.
- Souza-Arroyo V., Martínez-Flores K., Bucio-Ortiz L., Gómez-Quiroz L.E. and M.C. Gutiérrez-Ruiz. 2012. Liver and cadmium toxicity. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*. S5:001.
- Spurway H. and J.B.S. Haldane. The comparative ethology of vertebrate breathing. *Behaviour*. 6(1): 8-34.
- Stadman E.R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*. 40(12): 1250-1258.
- Stohs S.J. and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical Biology and Medicine*. 18(2): 321-336.
- Sura P., Ristic N., Bronwicka P. and M. Wróbel. 2006. Cadmium toxicity related to cysteine metabolism and glutathione levels in frogs *Rana ridibunda* tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 142(1-2): 128-135.
- Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Khandekar K., Dwivedi V.K., Chatterjee M. and N. Mathur. 2003. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent: antioxidant on their combination in rat. *Toxicological Letters*. 145: 211-217.
- Thomas P., Wofford H.W. and J.M. Neff. 1982. Effect of cadmium on glutathione content of mullet (*Mugil cephalus*) tissues. En: Vemberg W.B., Calabrese A., Thurberg FB. and F.J. Venberg (Eds.). Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity. *Academic Press*. New York. pp. 109-125.
- Thomas P. and H.W. Wofford 1993. Effects of cadmium and arochlor 1254 on lipidperoxidation, glutathione peroxide activity and selected antioxidants in atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology*. 27: 159-178.
- Tort L., Kargacin B., Torres P., Giralt M. and J. Hidalgo 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 114C: 29-34.

- Traven L., Mićović V., Lušić D.V. and T. Smital. 2013. The responses of the hepatosomatic index (HSI), 7-ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD) activity and glutathione-S-transferase (GST) activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) caged at a polluted site: implications for their use in environmental risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185: 9009-9018.
- Valko M., Morris H. and M.T.P. Cronin. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161-1208.
- Van Dyk J.C., Pieterse G.M. and J.H.J. van Vuren. 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 432-440.
- Vanegas-Pérez R.C. 1996. Efectos subletales del cadmio y zinc en el camarón blanco *Penaeus setiferus*. Tesis para la obtención del grado académico de doctora en ciencias (biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 118.
- Vanegas-Pérez C., Zúñiga-Lagunes S., Ponce de León-Hill C., Cram S., Hernández-Quiroz M. y I. Rosas-Pérez. 2015. Manual de Procedimientos para la evaluación de efectos toxicológicos: métodos bioquímicos para la evaluación de la exposición y efecto de contaminantes. Serie 1. PAPIME – DGAPA (PE206210). ISBN No. 978-607-02-6391-0. *Las prensas de Ciencias*, UNAM.
- Van Kerhove E., Pennemans V. and Q. Swennen. 2010. Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *Biometals*. 23(5): 823-855.
- Vitaterna M.H., Takahashi J.S. and F.W. Turek. 2001. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research and Health*. 25(2): 85-93.
- Wang Y., Fang J., Leonard S.S. and K. Murali-Krishna Rao. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 36(11): 1434-1443.
- Xu Y., Zhang D., Jin T., Cai D.J., Wu Q., Lu J., Liu J. and C.D. Klaassen. 2012. Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *Plos one*. 7(8): e44237.
- Yoshikawa T. 1998. Extraretinal photoreception and circadian systems in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119(1). 65-72.
- Zambrano L. 2004. Informe final del proyecto AS004 Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. México. CONABIO.
- Zalups, R.K and S. Ahmad. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. 2003. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 186: 163-188.
- Zuñiga-Lagunes S.R. 2002. Efecto del cadmio en la osmoregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea: decapoda). Tesis para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias (Biología Marina). Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. pp. 92.

## 11. ANEXOS

### 11.1. Acumulación del cadmio en hígado y alimento (adultos de *Artemia salina*)

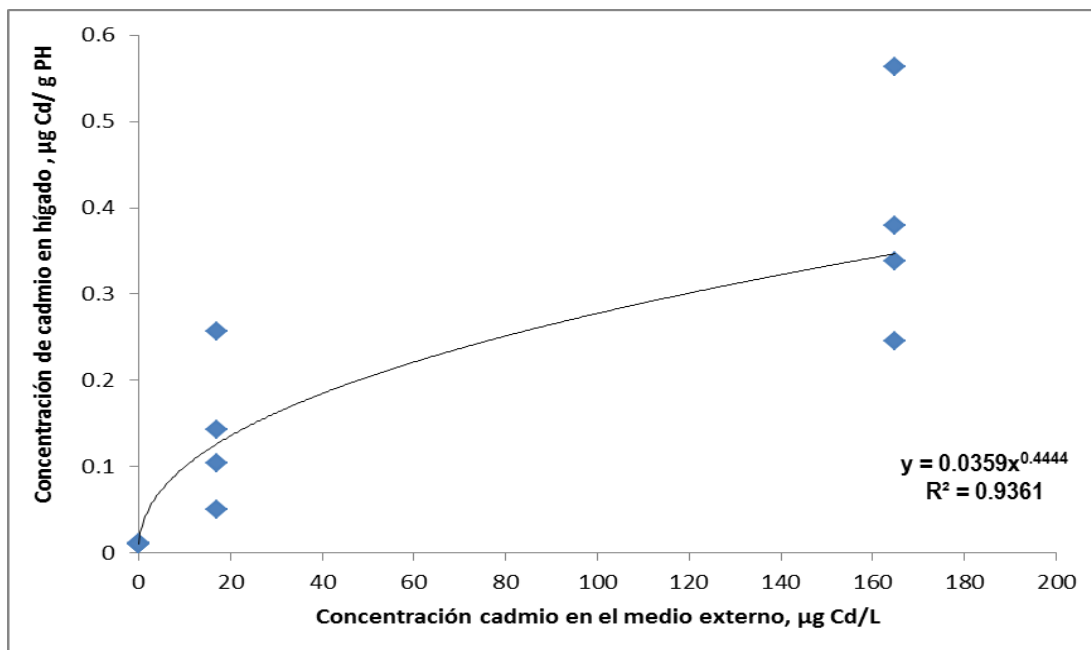


Fig. 1. Relación entre la concentración de cadmio en el medio externo ( $\mu\text{g Cd/L}$ ) y los niveles hepáticos del metal ( $\mu\text{g Cd/g PH}$ ) en los juveniles de *A. mexicanum* al término de la exposición de 15 d a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ .

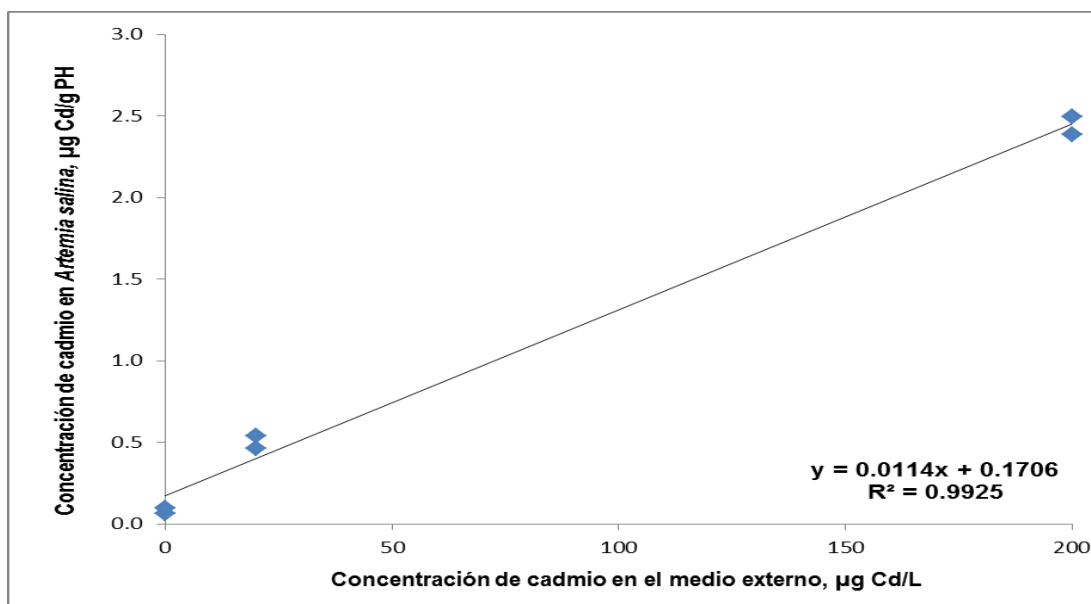


Fig. 2. Relación entre la concentración de cadmio en el medio externo de exposición ( $\mu\text{g Cd/L}$ ) y la concentración del metal en *Artemia salina*, suministrado como alimento por 2 h a los juveniles de *A. mexicanum* expuestos a 0.07, 16.7 y 163  $\mu\text{g Cd/L}$ .

## 11.2. Ritmicidad diaria del sistema glutatión y del consumo de oxígeno

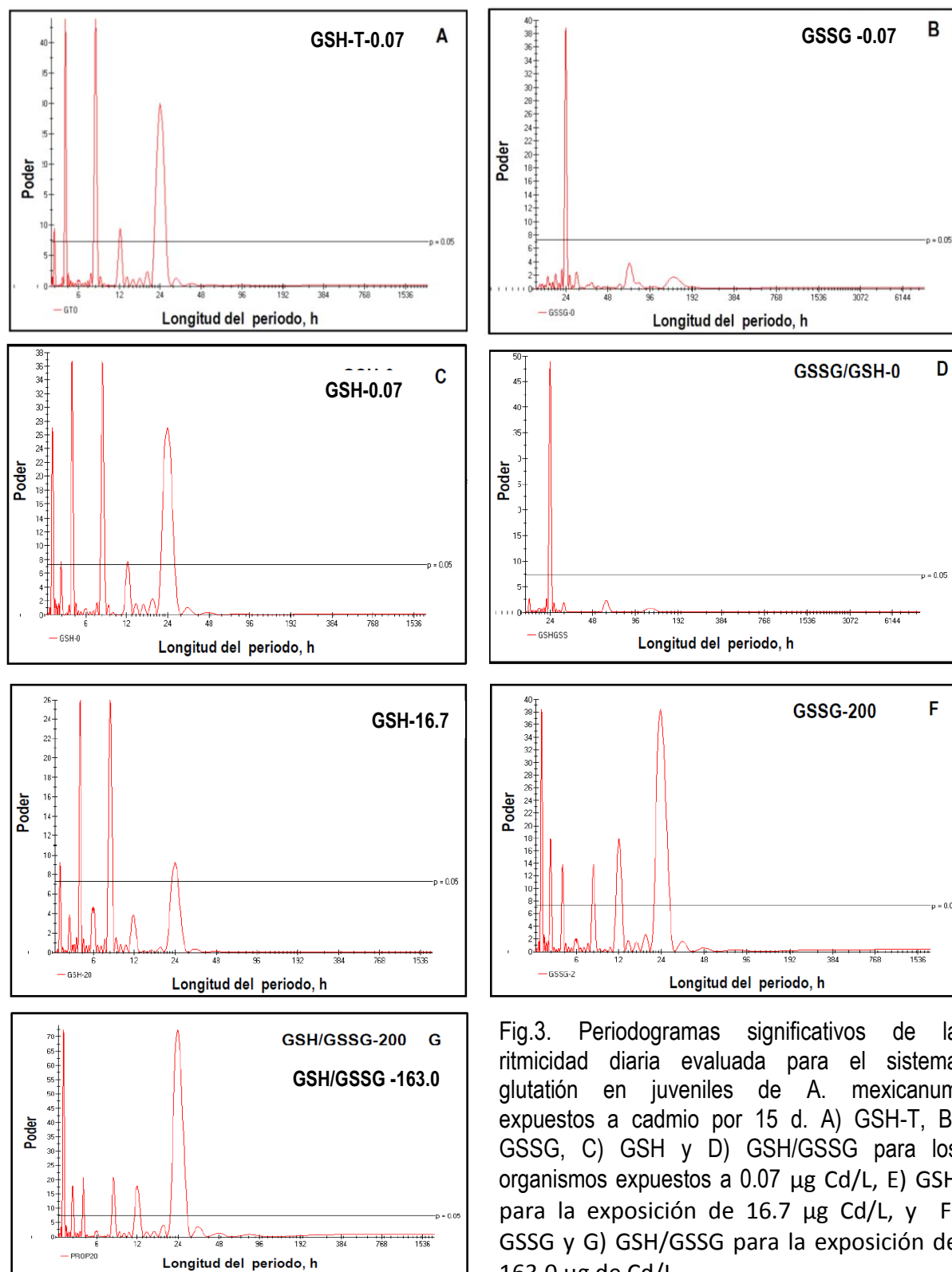
Tabla. 1. Consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/h/g PH) y niveles hepáticos de glutatión total (GSH-T), oxidado (GSSG), reducido (GSH) (mmoles /g PH; μmoles/mg PST) y razón GSH/GSSG en juveniles de *A. mexicanum* evaluados cada 3 h en un ciclo de 24h, al término de la exposición de 15 d a 0.07, 16.7 y 163 μg/L. Se señalan valores promedio ± ES.

Condición (μg Cd/L)	Tiempo (h)	VO <sub>2</sub> , mg O <sub>2</sub> /h/mg PH	GSH-T, mmoles/g PH (μmoles/mg PST)	GSSG, mmoles/g PH (μmoles/ mg PST)	GSH, mmoles/g PH (μmoles/ mg PST)	GSH/ GSSG
0.07	17	0.0521 ± 0.006	2.00 ± 0.08 (32.00 ± 0.83)	0.19 ± 0.04 (1.08 ± 0.33)	0.77 ± 0.11 (29.32 ± 0.62)	24.45 ± 1.52
	20	0.0505 ± 0.002	1.62 ± 0.06 (50.00 ± 1.23)	0.12 ± 0.01 (2.09 ± 0.32)	1.12 ± 0.14 (47.71 ± 1.24)	20.23 ± 0.76
	23	0.0556 ± 0.004	1.81 ± 0.12 (27.02 ± 0.81)	0.13 ± 0.07 (1.40 ± 0.28)	1.08 ± 0.11 (25.67 ± 0.85)	21.23 ± 1.22
	2	0.0549 ± 0.002	1.79 ± 0.12 (24.73 ± 0.85)	0.17 ± 0.02 (2.69 ± 0.43)	1.28 ± 0.19 (22.04 ± 0.87)	9.24 ± 0.92
	5	0.0641 ± 0.001	1.47 ± 0.08 (31.58 ± 1.45)	0.07 ± 0.005 (2.91 ± 0.26)	1.32 ± 0.10 (28.67 ± 1.45)	9.89 ± 0.85
	8	0.0642 ± 0.003	1.68 ± 0.16 (25.06 ± 0.81)	0.14 ± 0.05 (4.47 ± 0.45)	1.43 ± 0.09 (20.93 ± 1.00)	6.82 ± 0.88
	11	0.0683 ± 0.002	1.67 ± 0.09 (48.42 ± 1.13)	0.11 ± 0.03 (2.91 ± 0.43)	1.75 ± 0.12 (44.87 ± 1.23)	14.38 ± 1.07
	14	0.0565 ± 0.002	1.87 ± 0.11 (39.08 ± 1.05)	0.06 ± 0.02 (1.70 ± 0.35)	1.74 ± 0.10 (36.76 ± 1.09)	27.43 ± 1.16
	17	0.0521 ± 0.006	1.82 ± 0.09 (32.00 ± 0.83)	0.19 ± 0.04 (1.08 ± 0.33)	0.77 ± 0.11 (29.32 ± 0.62)	24.45 ± 1.52
16.7	17	0.058 ± 0.002	0.08 ± 0.02 (3.02 ± 0.56)	0.06 ± 0.02 (1.36 ± 0.46)	0.12 ± 0.02 (0.94 ± 0.41)	0.59 ± 0.28
	20	0.057 ± 0.009	0.05 ± 0.01 (3.24 ± 0.43)	0.05 ± 0.02 (1.65 ± 0.35)	0.09 ± 0.01 (1.11 ± 0.44)	0.50 ± 0.11
	23	0.058 ± 0.003	0.09 ± 0.01 (3.15 ± 0.63)	0.03 ± 0.002 (2.11 ± 0.48)	0.13 ± 0.02 (1.04 ± 0.48)	0.51 ± 0.35
	2	0.080 ± 0.001	0.10 ± 0.02 (1.17 ± 0.27)	0.11 ± 0.01 (0.88 ± 0.42)	0.14 ± 0.02 (0.29 ± 0.32)	0.77 ± 0.62

Tabla 1. (Cont.)

	5	0.080 ± 0.004	0.17 ± 0.04 (2.50 ± 0.70)	0.05 ± 0.02 (1.64 ± 0.58)	0.11 ± 0.02 (0.86 ± 0.39)	0.53± 0.13
	8	0.050 ± 0.006	0.12 ± 0.01 (1.50 ± 0.36)	0.09 ± 0.03 (0.56 ± 0.09)	0.09 ± 0.01 (0.86 ± 0.33)	0.97± 0.33
	11	0.058 ± 0.006	0.18 ± 0.03 (1.08 ± 0.43)	0.04 ± 0.01 (0.64 ± 0.30)	0.05 ± 0.01 (0.20 ± 0.21)	0.39± 0.17
	14	0.070 ± 0.003	0.26 ± 0.06 (2.72 ± 0.35)	0.04 ± 0.01 (0.94 ± 0.41)	0.05 ± 0.01 (1.78 ± 0.35)	1.22± 0.36
	17	0.060 ± 0.002	0.08 ± 0.02 (3.02 ± 0.56)	0.06 ± 0.02 (1.36 ± 0.46)	0.12 ± 0.02 (0.94 ± 0.41)	0.59± 0.28
<b>163.0</b>	17	0.063 ± 0.003	1.93 ± 0.08 (38.97 ± 1.54)	0.13 ± 0.03 (2.97 ± 0.46)	0.65 ± 0.10 (35.99 ± 1.50)	12.72± 0.80
	20	0.056 ± 0.004	1.53 ± 0.06 (21.54 ± 0.85)	0.07 ± 0.02 (2.72 ± 0.33)	1.04 ± 0.14 (18.82 ± 0.88)	7.59 ± 0.69
	23	0.074 ± 0.003	1.76 ± 0.11 (28.35 ± 1.20)	0.10 ± 0.07 (3.73 ± 0.33)	0.95 ± 0.12 (24.62 ± 1.19)	6.71± 0.61
	2	0.056 ± 0.009	1.69 ± 0.12 (33.53 ± 1.30)	0.05 ± 0.02 (2.96 ± 0.54)	1.14 ± 0.20 (30.57 ± 1.22)	12.85± 1.02
	5	0.056 ± 0.003	1.26 ± 0.11 (26.20 ± 0.79)	0.03 ± 0.01 (1.68 ± 0.15)	1.21 ± 0.09 (24.92 ± 0.82)	14.58± 0.70
	8	0.057 ± 0.003	1.53 ± 0.09 (35.28 ± 1.27)	0.03 ± 0.002 (1.09 ± 0.33)	1.33 ± 0.09 (34.19 ± 1.26)	32.54± 0.62
	11	0.069 ± 0.004	1.47 ± 0.07 (30.84 ± 0.98)	0.06 ± 0.02 (0.97 ± 0.18)	1.69 ± 0.12 (29.88 ± 0.96)	31.11± 0.55
	14	0.063 ± 0.003	1.61 ± 0.15 (23.91 ± 1.00)	0.03 ± 0.01 (4.10 ± 0.48)	1.68 ± 0.09 (20.18 ± 0.98)	6.20± 0.76
	17	0.063 ± 0.003	1.73 ± 0.09 (38.97 ± 1.54)	0.13 ± 0.03 (2.97 ± 0.44)	0.65 ± 0.10 (35.99 ± 1.54)	12.93± 0.79

### 11.3. Periodogramas de la ritmicidad diaria del sistema Glutación



#### 11.4. Índices de Condición fisiológica

Tabla 2. Parámetros morfométricos utilizados para calcular los Índices de Condición fisiológica de los juveniles de *Ambystoma mexicanum* de las Series 1 y 2, al término de la exposición de 15 d a 0.07, 16.7 y 163.0  $\mu\text{g Cd/L}$ . Se señalan valores promedio  $\pm$  ES del peso del organismo (PHo, g), peso del hígado (PHh, g) y longitud patrón (LP, mm).

SERIE 1			
$\mu\text{g Cd/L}$	0.07	16.7	163.0
PHo, g	3.10 $\pm$ 0.09	3.40 $\pm$ 0.10	3.43 $\pm$ 0.10
PHh, g	0.039 $\pm$ 0.012	0.037 $\pm$ 0.013	0.048 $\pm$ 0.013
LP, mm	41.60 $\pm$ 0.21	42.76 $\pm$ 0.22	43.04 $\pm$ 0.22
SERIE 2			
	0.07	16.7	163.0
PHo	4.98 $\pm$ 0.31	4.88 $\pm$ 0.27	5.14 $\pm$ 0.27
PHh, g	0.104 $\pm$ 0.049	0.088 $\pm$ 0.040	0.099 $\pm$ 0.045
LP, mm	47.31 $\pm$ 0.58	47.33 $\pm$ 0.54	48.72 $\pm$ 0.55



### 11.5. Tasa de crecimiento

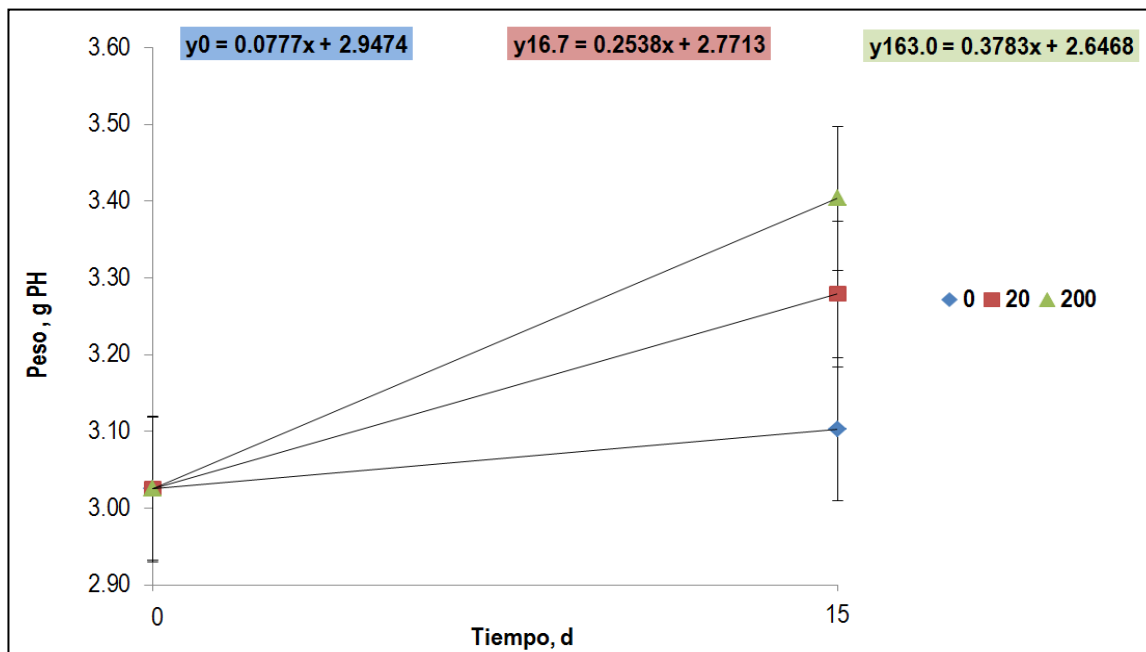


Fig. 3. Tasa de crecimiento de juveniles de *A. mexicanum* de la Serie 1 durante 15 d de exposición a niveles subletales de cadmio (0.07, 16.7 y 163 µg Cd/L). Se señalan valores promedio  $\pm$  ES. Se incluyen las ecuaciones de las regresiones lineales para cada condición experimental.

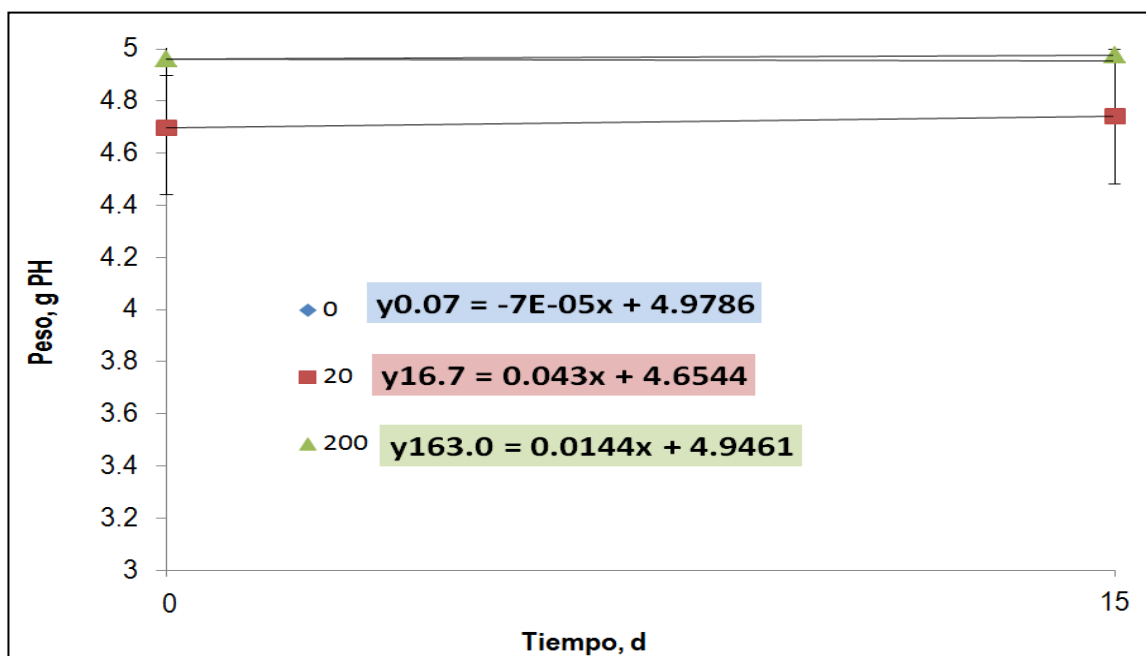


Fig. 4. Tasa de crecimiento de juveniles de *A. mexicanum* de la Serie 2 durante 15 d de exposición a niveles subletales de cadmio (0.07, 16.7 y 163 µg Cd/L). Se señalan valores promedio  $\pm$  ES. Se incluyen las ecuaciones de regresiones lineales para cada condición experimental.