



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR ARSÉNICO EN
BRANQUIA DE CARPA COMÚN (*Cyprinus carpio*)”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ARLENE ABRAHAM FELIPE

ASESOR INTERNO: DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

ASESOR EXTERNO: DR. LUIS GERARDO BERNADAC VILLEGAS



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO DE 2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo refleja el esfuerzo en conjunto de muchas personas, que con amor y dedicación han hecho posible que concluya una etapa importante de mi vida, esta tesis es el producto final de una larga carrera, donde conocí a muchas personas, las cuales me dejaron enseñanzas que ayudaron a que fuera mejor cada día.

Doy gracias a Dios por sobre todas las cosas, pues debido a su gran amor me permitió vivir en este tiempo y forjar este camino, dándome la fuerza y vida para continuar, otorgándome vivencias que me dejaron valiosas enseñanzas, reconociendo que sin Él nada soy, y nada de lo que ahora veo concluido tendría valor.

A usted especialmente, Apóstol de Jesucristo Naasón Joaquín García, pues con su amor, ejemplo, dedicación, consuelo y ánimo me impulso a superarme, a ser mejor cada día, quien guiándome por una senda verdadera donde me encuentro por convicción ha hecho que mi vida cambie de tal manera que nunca pude imaginar, siendo tan feliz a su lado, a quien le debo lo que soy, quien me ha hecho ser mejor de lo que era.

A mis padres, Juan y Ana, pues con su esfuerzo de cada día para salir a trabajar y querer dar lo mejor a sus hijos, permitieron que tuviera una carrera profesional, que aun a pesar de su cansancio y desgaste siempre tuvieron el cuidado de guiarme y apoyarme en lo que requería, a mi papá, quien fue el primero en impulsarme a estudiar pues confiaba que sería una mujer profesionalista, que siempre me inculcó la superación y excelencia académica, quien me enseñó a dar siempre lo mejor, a mi mamá, quien con sus sabios consejos me guio por un camino recto para que pudiera concluir esta carrera.

A mis hermanos, Misael, quien me inculcó el estudio y el amor por el mismo, pues fue mi ejemplo para superarme, quien me protegió y cuidó a pesar de las circunstancias, a Cesia, quien con su carisma y amor característico me hizo ver el lado bueno de las cosas, a Maciel, quien por ser mi hermano menor me enseñó el valor de la responsabilidad y el cariño sincero.

A mis sobrinos, David y Nathan, estos seres pequeños que hicieron nacer el amor desinteresado en mí, llenando de sonrisas la casa y siendo un impulso para seguir superándome, siendo un ejemplo para ellos.

A mis amigos y compañeras de la vida, de milicia, que me han motivado a ser mejor.

Al Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan por hacerme participe en este proyecto, por sus consejos y por todo el asesoramiento brindado para que fuera posible esta tesis,

a Luis Gerardo Bernadac Villegas quien resolvió mis dudas y me brindo de su tiempo y conocimiento.

A Nelly, por invitarme a ser parte de esta aventura, por sus conocimientos y confianza.

No me queda más que decir gracias, gracias a todos aquellos que han formado parte importante de mi vida, de mi crecimiento, que aportaron su granito de arena para que ahora vea concluida esta tesis.

GRACIAS

ABREVIATURAS

| | |
|------|-------------------------------|
| As | Arsénico |
| CAT | Catalasa |
| E | Expuestos |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| RL | Radicales libres |
| GPx | Glutación Peroxidasa |
| HPOX | Hidroperóxidos |
| LPX | Lipoperoxidación |
| MDA | Malondialdehído |
| PCC | Proteínas Carboniladas |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| T | Testigos |

ÍNDICE

| | CONTENIDO | PÁGINA |
|--|---|--------|
| | Índice de figuras | 6 |
| | Índice de tablas | 7 |
| | Resumen | 8 |
| | 1. Introducción | 9 |
| | 1.1 Agua..... | 11 |
| | 1.2 Contaminación de agua..... | 12 |
| | 1.3 Tipos de contaminación del agua..... | 13 |
| | 1.4 Arsénico..... | 13 |
| | 1.5 Concentración de arsénico en agua..... | 16 |
| | 1.6 Efectos del arsénico en organismos acuáticos..... | 18 |
| | 1.7 Biomarcadores..... | 20 |
| | 1.8 Estrés oxidativo..... | 22 |
| | 1.9 Bioindicadores..... | 25 |
| | 1.10 Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) | 26 |
| | 2. Justificación | 28 |
| | 3. Hipótesis | 29 |
| | 4. Objetivo general | 29 |
| | 5. Objetivos específicos | 29 |
| | 6. Metodología | 30 |
| | 6.1 Evaluación biológica usando biomarcadores para evaluar el estrés oxidativo antes y después del sistema..... | 30 |
| | 6.1.1 Obtención y mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i> | 31 |
| | 6.1.2 Evaluación de estrés oxidativo..... | 31 |
| | 6.1.3 Determinación del contenido de hidroperóxidos..... | 31 |
| | 6.1.4 Determinación del grado de lipoperoxidación..... | 32 |
| | 6.1.5 Determinación de proteínas carboniladas..... | 32 |
| | 6.1.6 Determinación de la actividad de la SOD..... | 33 |
| | 6.1.7 Determinación de la actividad de la CAT..... | 33 |
| | 6.1.8 Determinación de la actividad de la GPX..... | 33 |
| | 6.1.9 Determinación de la concentración de proteínas..... | 34 |
| | 6.2 Análisis estadístico..... | 36 |
| | 7. Resultados | 37 |
| | 7.1 Evaluación del estrés oxidativo..... | 37 |
| | 7.1.1 Evaluación del contenido de hidroperóxidos..... | 37 |
| | 7.1.2 Evaluación del grado de lipoperoxidación..... | 38 |
| | 7.1.3 Evaluación de proteínas carboniladas..... | 39 |
| | 7.2 Evaluación de la actividad enzimática..... | 40 |
| | 7.2.1 Evaluación de la actividad de la SOD..... | 40 |
| | 7.2.2 Evaluación de la actividad de la CAT..... | 41 |
| | 7.2.3 Evaluación de la actividad de la GPX..... | 42 |
| | 8. Discusión de resultados | 43 |
| | 9. Conclusión | 46 |
| | 10. Referencias bibliográficas | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| NÚMERO | TÍTULO | PÁGINA |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Usos del agua | 12 |
| 2 | Formación de ERO <i>in vivo</i> | 23 |
| 3 | Reacciones de Lipoperoxidación | 25 |
| 4 | Diagrama de metodología | 35 |
| 5 | Contenido de hidroperóxidos | 37 |
| 6 | Grado de lipoperoxidación | 38 |
| 7 | Contenido de proteínas carboniladas | 39 |
| 8 | Actividad de la superoxido dismutasa (SOD) | 40 |
| 9 | Actividad de la catalasa (CAT) | 41 |
| 10 | Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS

| NÚMERO | TÍTULO | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1 | Límites permisibles para metales pesados y cianuros | 11 |
| 2 | Características generales del arsénico | 13 |
| 3 | Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos del arsénico | 14 |
| 4 | Concentraciones de arsénico en el agua en algunos estados de México | 17 |
| 5 | Clasificación de antioxidantes | 24 |
| 6 | Condiciones del estudio sub-letal para determinar los efectos del efluente artificial sobre sangre de <i>Cyprinus carpio</i> | 31 |
| 7 | Curva tipo para la prueba de proteínas | 34 |

RESUMEN

El arsénico (As) es un oligoelemento tóxico para diversas especies acuáticas. Está presente naturalmente en el agua en diversos estados de oxidación y especies químicas. Durante su paso por el organismo, el As induce la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando estrés oxidativo en diversos organismos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad inducida por As en branquias de la carpa común *Cyprinus carpio*. Los siguientes biomarcadores se utilizaron para determinar el estrés oxidativo: contenido de hidroperóxidos, la peroxidación lipídica, el contenido de proteína carboniladas y la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Los resultados mostraron que la exposición a 0.05 mg/L indujo cambios en los biomarcadores oxidación celular, así como la actividad antioxidante en branquias de carpa común ($P < 0.05$). Los resultados de este estudio, nos permiten concluir que los biomarcadores utilizados en este estudio son útiles para la detección temprana de la toxicidad inducida por el As en los peces.

I. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) ocupa el lugar 20 en abundancia de los elementos en la corteza terrestre y se distribuye de manera no uniforme por todo el mundo, dependiendo de la región geográfica, características geoquímicas del suelo y actividad industrial (Mandal y Suzuki, 2002; Santini y vanden Hoven, 2004; Heinrich-Salmeron et al., 2011). Considerado un elemento traza tóxico, se encuentra en diversos estados de oxidación en la naturaleza de forma inorgánica como arsenito (III) o arsenato (V), siendo el primero la forma más tóxica (Akter et al., 2005). El arsénico (As) es conocido como un agente carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos en todas partes del mundo y cuya actividad genotóxica ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos (Del Razo, 1990).

La contaminación del agua por As se ha convertido en un serio problema para el medio ambiente y la salud humana (Allen and Rana, 2004). En especies acuáticas se muestran estudios sobre la formación de micronúcleos en pez *Danio rerio*, lo cual denota genotoxicidad por exposición a arsénico en un periodo de 30 horas con una concentración de 50mg/L (Báez et al., 2004), inducción de estrés oxidativo en músculo, hígado y riñón del tiburón mako (Vélez, 2009).

La toxicidad para los humanos de un compuesto con arsénico depende en gran medida de su forma química, los compuestos inorgánicos de este metal son los más tóxicos y aparecen, sobre todo, en aguas, donde se encuentran principalmente en forma de pentóxido de arsénico (As_2O_5) o trióxido de arsénico (As_2O_3). Además, la exposición a compuestos de arsénico inorgánico se ha asociado a diversos tipos de cánceres como de hígado, pulmones y piel, así como a diabetes (Basu et al., 2014).

Por otra parte, los compuestos orgánicos de arsénico se encuentran frecuentemente en alimentos y suponen la vía principal de exposición de la población al arsénico (Aragónés, 2001; Ferrer, 2003).

Cuando es consumido por humanos y otras especies mamíferas mediante la ingesta de agua o a través de alimentos contaminados, el As (V) es metabolizado a As (III) y se conjuga con moléculas orgánicas formando metil-arsénico (Thomas et al. 2001).

Debido a la importancia del agua para el hombre se han establecido características aceptables para el agua de consumo humano, los límites permisibles para algunos metales, como por ejemplo el arsénico, que de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994, es de 0.05 mg/L (NOM-127-SSA1-1994).

De acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, señala que no se debe exceder los valores de la tabla 1.

| LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA METALES PESADOS Y CIANUROS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|------|------------------------|------|---------------------------------|------|-----------------------------------|------|------------------------|------|---|------|----------------|------|---------------|------|---------------------------|------|-------------------------|------|
| PARÁMETROS (*) | RÍOS | | | | | | EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES | | | | AGUAS COSTERAS | | | | SUELO | | | | | |
| (miligramos por litro) | Uso en riego agrícola (A) | | Uso público urbano (B) | | Protección de vida acuática (C) | | Uso en riego agrícola (B) | | Uso público urbano (C) | | Explotación pesquera, navegación y otros usos (A) | | Recreación (B) | | ESTUARIOS (B) | | Uso en riego agrícola (A) | | HUMEDALES NATURALES (B) | |
| | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. | P.M. | P.D. |
| Arsénico | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 |
| Cadmio | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.05 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| Cianuro | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 | 2.0 | 3.0 | 1.0 | 2.0 |
| Cobre | 4.0 | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4 | 6.0 | 4 | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4 | 6.0 | 4.0 | 6.0 |
| Cromo | 1 | 1.5 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 1 | 1.5 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 1 | 1.5 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 0.5 | 1.0 |
| Mercurio | 0.01 | 0.02 | 0.005 | 0.01 | 0.005 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.005 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.005 | 0.01 | 0.005 | 0.01 |
| Níquel | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| Plomo | 0.5 | 1 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 1 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 1 | 0.2 | 0.4 | 5 | 10 | 0.2 | 0.4 |
| Zinc | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 |

(*) Medidos de manera total.
P.D.= Promedio Diario, P.M.= Promedio Mensual; N.A.= No es aplicable
(A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo Receptor según la Ley Federal de Derechos.

Tabla 1: límites permisibles para metales pesados y cianuros, tomada de NOM-001-SEMARNAT-1996

En el agua, los niveles de As son menores en agua superficial (mares, ríos y lagos) y más elevados en agua subterránea, especialmente en áreas con depósitos de roca volcánica o de minerales ricos en As (Smedley y Kinninburgh, 2002).

El estrés oxidativo es un biomarcador que se utiliza para evaluar el daño celular, el cual se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado. Las células sufren un daño debido a que por reacciones químicas, radiaciones ionizantes u otra serie de eventos ajenos a nuestro organismo, desestabilizan al oxígeno. Las especies que se forman son

llamadas radicales libres que son aquellas que tienen un electrón desapareado con lo cual pueden quitarle a las biomoléculas, que se encuentran cercan, un electrón (Venereo, 2002).

1.1 Agua

El agua cubre aproximadamente el 75% de la superficie terrestre, es fundamental para los procesos tanto ambientales como sociales e indispensable para el surgimiento y desarrollo de la vida (Mazari, 2017). Posee propiedades únicas que la hacen esencial para la vida. Es un solvente extraordinario, un reactivo ideal en muchos procesos metabólicos; tiene una gran capacidad calorífica y tiene la propiedad de expandirse cuando se congela (Fernández, 2012). De acuerdo a las estadísticas en México se utiliza, el 77% del agua en la agricultura; 14%, es utilizada en el abastecimiento público; 5%, en las termoeléctricas y 4%, en la industria (INEGI).

El agua es una molécula sencilla formada por átomos pequeños, dos de hidrógeno y uno de oxígeno, unidos por enlaces covalentes muy fuertes que hacen que la molécula sea muy estable, concentrando la mayor densidad electrónica alrededor del átomo de oxígeno debido a su tamaño en comparación con los átomos de hidrógeno (Carbajal y González, 2012; UNAM, 2008). Debido a su pequeño tamaño, a la naturaleza polar de sus enlaces H-O, a su estructura angular y a su capacidad para formar puentes de hidrógeno, el agua es una sustancia altamente reactiva que puede disolver sustancias iónicas y polares (Martínez y Sánchez, 2007, Monge-Najera et al., 2005).

El agua es el medio en el que funcionan todos los medios de transporte, permitiendo el intercambio de sustancias, en ella se transportan hormonas, metabolitos y sustancias necesarias para la célula así como productos de desecho para ser eliminados, llevándose a cabo las reacciones bioquímicas (Martí, 2007) en donde tiene también un papel fundamental para determinar la estructura de las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y todas las moléculas que se hallan en solución (UNAM, 2008). El cuerpo tiene 75% de agua al nacer y en la edad adulta tiene un 60%, de este porcentaje el 60% de agua se encuentra dentro de la célula y el resto en líquido extracelular (Iglesias et al., 2011).

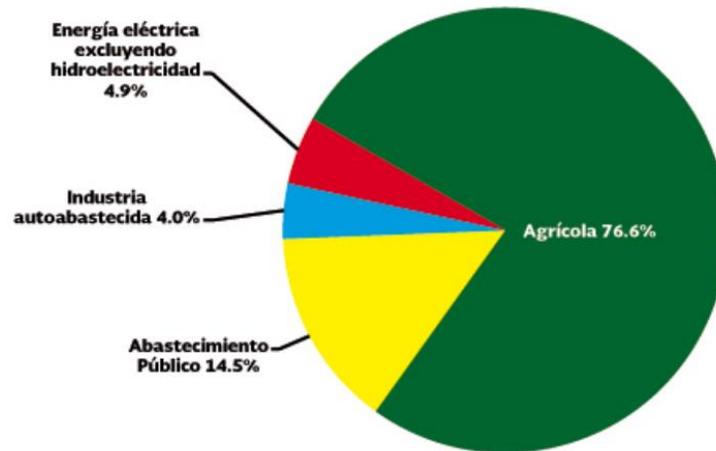


Figura 1. Usos del agua CONAGUA, Estadísticas del agua en México 2013

1.2 Contaminación de agua

Debido a lo indispensable que es el agua para el ser humano es importante y necesario que sea de fácil acceso para la población (OMS, 2015), si ésta se encuentra contaminada, es decir, hay Incorporación de agentes extraños, capaces de modificar su composición física, química y calidad puede provocar problemas económicos y sociales (INEGI, 2000), nuestros lagos, ríos, arroyos y depósitos subterráneos contienen a menudo un coctel químico que incluye desde píldoras anticonceptivas, cremas solares, pesticidas y hasta petróleo (National Geographic, 2011).

La calidad del agua se ve afectada tanto por fenómenos naturales como por las actividades humanas y depende también de que se empleen tratamientos efectivos a las aguas residuales que se vierten a los cuerpos de agua, para eliminar o reducir las sustancias o agentes biológicos contaminantes (FAO, 2017). Dicha contaminación se ha determinado a través de los resultados proporcionados por la Red Nacional de Monitoreo de Calidad del Agua, mediante el empleo de un Índice de calidad del agua (ICA), que comprende valores entre 0% y 100%. Un valor mayor del ICA indica una mejor calidad del agua. Este índice, se obtiene a partir del promedio ponderado de los índices de calidad individuales de 18 parámetros, entre los cuales se encuentran el pH, la demanda bioquímica de oxígeno y los sólidos suspendidos (SEMARNAT, 2016).

De manera global, el problema más común con respecto a la calidad del agua es la eutrofización, resultado de grandes cantidades de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno), que deteriora considerablemente los usos benéficos del agua (WWAP, 2009).

Los contaminantes emergentes son aquellos que son de origen químico, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza que no son significativos en la naturaleza pero al ser detectados pueden tener impacto en el medio ambiente y en la salud (Barceló y López, 2007 y Stuart et al., 2012).

1.3 Tipos de contaminación del agua

Los contaminantes más importantes del agua se encuentran microorganismos patógenos, nutrientes, sustancias que consumen el oxígeno del agua, metales pesados y materia orgánica persistente, también sedimentos en suspensión y pesticidas que son creados por las actividades humanas, en su mayoría, provienen de fuentes difusas, es decir que no son localizadas, también otra cosa que puede ser considerado como contaminante es el calor, que eleva la temperatura de las aguas que reciben desechos (WWAP, 2009). Habitualmente, la calidad del agua en todo el mundo se pierde a causa de los contaminantes (UNESCO, 2014).

Los hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (PAHs) son productos de procesos industriales y de combustión, que son desechados al medio ambiente causando un alto grado de contaminación, ocasionando problemas, principalmente en la salud del hombre, porque tienen efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos, por tal motivo son considerados como causantes principales de distintos tipos de cáncer en el hombre, por tal motivo son producto de estudio actualmente y son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos condensados, por ejemplo el Naftaleno y el Benzo (a) pireno (Mastandrea et al., 2005).

1.4 Arsénico

El arsénico es un elemento distribuido extensamente por toda la corteza terrestre, suelo, rocas, cuerpos de agua, minerales y organismos de formas inorgánica, orgánica y metilada (Tsai, 2009; Valenzuela, 2009; Basu, 2014).

| Nombre | Arsénico |
|---------------------------|-----------------|
| Fórmula química | As |
| Numero atómico | 33 |
| Masa atómica | 74.9215 |
| Numero CAS | 7440-38-2 |
| Numero de valencia | III y V |

Tabla 2: Características generales del arsénico

El arsénico es un semimetal inodoro e insípido que se encuentra en la naturaleza tanto en rocas como en suelos (Heikens, 2006). El arsénico tiene el número atómico 33, que hace que se sitúe en el bloque p en el centro de la tabla periódica, dividiendo a los metales de los no metales (Gasque, 2013).

El arsénico se puede encontrar en diferentes estados de oxidación: arseniato As (V), arsenito As (III), As elemental (0) y arseniuro As (-III) (Tsai, 2009); encontrándose más frecuentemente como arsenito o arseniato. El arsenito es 70 veces más tóxico que las especies metiladas y 10 veces más tóxico que el arseniato, el cual es poco soluble en agua y, por tanto, menos biodisponible (Kumaresan y Riyazuddin, 2001; Valenzuela, 2009).

En los compuestos químicos naturales que forma el arsénico, se observan los distintos números de valencia que presenta, participando como catión, en óxidos y sulfuros característicos de un metal y como no metal se presenta en aniones como oxoaniones que son los arsenitos y arsenatos y arseniuros (Clemenza et al., 2008)

| | Fórmula | Punto de fusión (°C) | Punto de ebullición (°C) | Densidad (g/cm³) | Solubilidad en agua (g/L) |
|------------------------------|---|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Arsénico | As | 613 | - | 5.27 a 14 °C | Insoluble |
| Trióxido de arsénico | As ₂ O ₃ | 312.3 | 465 | 3.738 | 37 a 20 °C |
| Pentóxido de arsénico | As ₂ O ₅ | 315 | - | 4.32 | 1500 a 16 °C |
| Sulfuro de arsénico | As ₂ S ₃ | 300 (se descompone) | 707 | 3.43 | 5 x 10 ⁻⁴ a 18 °C |
| Ácido dimetilarsénico | (CH ₃) ₂ AsO(OH) | 200 | - | - | 829 a 22 °C |
| Arseniato de plomo | PbHAsO ₄ | 720 (se descompone) | - | 5.79 | Poco soluble |
| Arseniato de potasio | KH ₂ AsO ₄ | 288 | - | 2.867 | 190 a 16 °C |
| Arsenito de potasio | KAsO ₂ .HAS O ₂ | - | - | - | Soluble |

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos del arsénico (OMS, 2003).

Puede combinarse con otros elementos para formar compuestos arsenicales, orgánicos o inorgánicos, de los cuales estos últimos generalmente son los más tóxicos y predominan en el agua (Hiekens, 2006).

Los compuestos de arsénico se utilizan comercialmente y en la industria, principalmente como agentes de aleación en la fabricación de transistores, láseres y semiconductores (ATSDR, 2007). La principal fuente de arsénico del agua de

consumo es la disolución de minerales y menas de origen natural. Excepto en las personas expuestas al arsénico por motivos laborales, la vía de exposición más importante es la vía oral, por el consumo de alimentos y bebidas. En ciertas regiones, las fuentes de agua de consumo, particularmente las aguas subterráneas, pueden contener concentraciones altas de arsénico (Rosas, 1999; Armienta y Segovia, 2008; Ramírez, 2008). En algunas zonas, el arsénico del agua de consumo afecta significativamente a la salud, y el arsénico se considera una sustancia a la que debe darse una prioridad alta en el análisis sistemático de fuentes de agua de consumo. Con frecuencia, su concentración está estrechamente relacionada con la profundidad del pozo (OMS, 2006). Muchos de los derivados del arsénico que son utilizados en los pesticidas, como el metanoarsenato mono sódico (MSMA), metanoarsenato disódico (DSMA) además son utilizados en la producción de algodón.

El As se clasifica como uno de los elementos químicos más tóxicos y carcinogénicos, representando un serio problema ambiental en varias regiones de México y el mundo (Iliná, 2009; Yamamura y Amachi, 2014). Estudios confirman que durante el metabolismo del arsénico en las células hay generación de radicales libres (Yamanaka et al., 2001).

En el agua de bebida, por lo general el arsénico se encuentra en la forma de arsenato y puede ser absorbido con facilidad en el tracto gastrointestinal en una proporción entre 40 y 100%. El arsénico inorgánico ingerido pasa al torrente sanguíneo, donde se enlaza a la hemoglobina y en 24 horas puede encontrarse en el hígado, riñones, pulmones, bazo y piel. Los órganos de mayor almacenamiento son la piel, el hueso y el músculo. Su acumulación en la piel tiene relación con su fácil reacción con las proteínas (con grupos de sulfihidrilo) (Health Canadá, Ottawa, 1992).

Los cambios metabólicos del arsénico ocurren esencialmente en el hígado, donde los tioles endógenos tienen un papel crítico en la conversión del As^{+3} y As^{+5} . El glutatión (GSH) actúa como agente reductor. Las formas de As^{+3} resultantes pueden metilarse (oxidación y formación de metilarsénico - As^{+5}) al aceptar este grupo funcional de la S-adenosilmetionina. El probable producto final de la metilación continua es el dimetilarsenato (DMA). Las especies de metilarsénico (As^{+3}) y As^{+3} intermedias en el proceso pueden ser tóxicas e inhibir por ejemplo a la glutatión reductasa (GR), enzima clave en el metabolismo del GSH y cuya acción (GR) es crítica para mantener las reacciones redox propias de las células (The National Academy of Sciences, 1999).

El arsénico que es absorbido, se almacena mayoritariamente en hígado, riñón, corazón y pulmón y en menor concentración en tejido muscular y nervioso; este

metal ha sido considerado como uno de los principales carcinogénicos de pulmón, riñón, vesícula y piel; cuando hay una intoxicación aguda por arsénico los síntomas que se presentan son: vómito profuso, diarrea, cólicos, salivación excesiva, fiebre, alteraciones en el sistema cardiovascular y sistema nervioso central incluso puede llegar a causar la muerte; cuando hay una intoxicación crónica los síntomas incluyen cambios en la piel con hiperqueratosis, formación de verrugas y granos en las palmas y plantas de los pies, con grandes áreas de hiperpigmentación intercalados entre pequeñas áreas de hipopigmentación en la cara, cuello y espalda (Gwaltney-Brant, 2002; EPA, 1999; ATSD, 2003)

El arsénico inorgánico ingerido es absorbido por los tejidos y luego se elimina progresivamente por metilación. Su excreción ocurre en la orina a través de los riñones (Rossman, 2007). Cuando la ingestión es mayor que la excreción, tiende a acumularse en el cabello y en las uñas. Los niveles normales de arsénico en la orina, el cabello y las uñas son 5-40 $\mu\text{g}/\text{día}$, 80-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 430-1080 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (The National Academy of Sciences, 1999). Así mismo se han reportado que en pacientes con exposición ocupacional crónica a arsénico se presenta la encefalopatía acompañada de alteraciones en la función neurológica superiores como aprendizaje, concentración y memoria reciente (Calderón et al., 2001 y Vahter, 2007).

1.5 Concentración de arsénico en agua

La Organización Mundial de Salud en las guías para la calidad del agua potable determino que el máximo permisible de arsénico es de 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, aunque este nivel puede llegar a afectar a la salud humana (OMS, 2006).

Cuando hay mayor presencia geológica natural de arsénico, se pueden encontrar altos niveles en aguas subterráneas como es el caso de Bangladesh, India, China, Taiwán, Mongolia, Chile, Argentina, México y numerosos lugares de Estados Unidos de Norteamérica (Anawar, 2003; Mondal, 2006; Campos, 2007).

La presencia de arsénico en el agua de consumo humano es un problema que se presenta en los acuíferos de Durango, Coahuila, Zacatecas, Morelos, Aguas Calientes, Chihuahua, Puebla, Nuevo León, Guanajuato, San Luis Potosí, Sonora y la Región Lagunera, donde se han detectado concentraciones superiores a lo señalado por la NOM-127SSA1 (0.05 mg As/L) (Avilés y Pardón, 2000).

| Concentraciones de Arsénico en el agua de algunos estados de México | | |
|---|--|-----------|
| Estado | Localidad | As (µg/L) |
| Chihuahua | Delicias, Meoqui, Julimes y Rosales | 10-370 |
| Coahuila y Durango | Comarca Lagunera | 8-624 |
| Guanajuato | San Luis de la Paz, Acambaro, Abasolo | >25 |
| Hidalgo | Zimapán | 2-378 |
| Nayarit | Tecuala | 7-27 |
| Jalisco | Los Altos | 15-135 |
| Puebla | Achichipilco, Valsequillo | >25 |
| Sonora | Hermosillo | 75-134 |
| Zacatecas | Loreto, Guadalupe-Bañuelos, Chupaderos | >25 |

Tabla 4. Concentraciones de arsénico en el agua en algunos estados de México (Bueno, D, et.al. 2012).

En los Estados Unidos de América el límite máximo del contaminante, en agua, fue de 50 µg/L (Viraraghavan et al., 1999), que fue el límite anterior, el nuevo límite máximo es de 10 µg/ (Bohlen, 2002). En Canadá el límite anterior era de 25 µg/L (Viraraghavan et al., 1999), mientras en 2006 bajo a 10 µg/L.

Un estudio sobre contaminación con arsénico en 128 pozos de agua de 11 distritos de la comarca lagunera detectó en un rango de 0.008 a 0.624 mg/L que más de 50% de las muestras tuvieron niveles mayores de 0.05 mg/L. Se estimó que alrededor de 400, 000 individuos estuvieron expuestos al arsénico a través del agua de bebida, con concentraciones mayores de 0.05 mg/L. Estas evidencias permiten suponer que en el mediano plazo puede representar un problema de salud pública. De esos grupos, un total de 489.634 habitantes enfrentan un riesgo individual carcinogénico máximo del orden de $4,5 \times 10^{-2}$ – $5,7 \times 10^{-2}$; un total de 609.253 enfrentan un riesgo entre $5,2 \times 10^{-3}$ y $4,1 \times 10^{-2}$ (Vega Gleason, 2001)

En 1976, se encontraron varios pozos en el condado de Halifax, Nueva Escocia, contaminados con arsénico. Más de 50 familias fueron afectadas por envenenamiento con arsénico porque se encontraba de concentración 3 mg/L (Grantham y Jones, 1977)

Entre 1961 y 1985, el incidente de la contaminación del pozo de agua, en el suroeste de la costa de Taiwán fue muy conocido. La población en el área endémica era de alrededor de 140000. En los pueblos estudiados, el arsénico contenido en las muestras del pozo de agua, era de un rango de 0.01 a 1.82 mg/L. La mayor parte del agua de pozo contenía arsénico alrededor de 0.4-0.6 mg/L. La especie de arsénico encontrada en el agua del pozo era arsenito con un promedio de arsenito a arsenato en proporción de 2:6.

En Argentina, la mayor presencia del arsénico en el agua es de origen natural, las aguas subterráneas en las áreas afectadas presentan concentraciones de arsénico

variables, que van de valores menores de 0,10 mg/L hasta valores mayores de 1 mg/L. La fuente de arsénico en las napas freáticas de la región central y norte del territorio argentino es de origen volcánico y en menor importancia la contaminación también puede proceder de la actividad agrícola (Benítez; Osicka; Jiménez; Garro, 2000).

En 1994, se hizo un estudio del contenido de arsénico de las aguas de consumo de la vertiente del río Rímac y se analizaron 53 muestras de agua potable, de río, pozo y manantiales; se encontró que 84,9% sobrepasaban el límite recomendado por la OMS (Infante y Palomino, 1994). Sin embargo, no se han registrado casos de envenenamiento con arsénico. En 1999 se hizo otro estudio en las aguas de consumo de la provincia de Huaytará, Huancavelica. De las 31 muestras analizadas, se obtuvo un promedio de 0.0246 mg/L de arsénico; la concentración más alta se registró en Pachac, probablemente debido a un establo donde se almacena abono y plaguicidas arsenicales (Flores, 1999).

Durante los años 80's la arsenicosis endémica, era encontrada sucesivamente en varias áreas de China continental como en Xinjiang Uygur A.R., Inner Mongolia, Shanxi, Liaoning, Jilin, Ningxia y provincias de Qinghai Henan. Las concentraciones de arsénico encontradas en esta área, eran de un rango de 200 a 2000 µg/L, con un nivel más alto de 4440 µg/L (Hotta, 1995 y Xiaojuan, 1995).

1.6 Efectos del arsénico en organismos acuáticos

Los efectos más significativos de la toxicidad del arsénico, cuando se encuentra en su forma inorgánica, en mamíferos son la producción de cáncer de pulmón, de hígado, de piel y vejiga (Aposhian et al., 2003).

El As presente en el agua se absorbe por las branquias, por el tracto gastrointestinal y por la piel (Albert, 1997). Se distribuye en hígado, riñón, piel y escamas (debido a la afinidad de los arsenitos por la queratina), branquias y músculo, donde el As inorgánico se biotransforma en As orgánico lipo e hidrosoluble.

El trióxido de arsénico causa toxicidad en los peces con una concentración letal del 50% (CL50) a las 96 horas de 50-100 mg/l para el Pez Dorado, de 30-40 mg/l para la Carpa, de 20-25 mg/l para la Trucha, y de 25-30 mg/l para otros. La concentración de arsenitos y arsenatos, considerada como segura para peces y otros organismos acuáticos, es de 15-23 mg/l (Metelev y cols., 1983).

En las especies acuáticas hay evidencias de que el arsénico puede afectar de manera distinta. En un estudio con dos líneas celulares, una línea celular de *Therapon jarbua* y la otra línea de Tilapia, se presentó citotoxicidad al estar en contacto con arsenito de sodio, indicando que el arsenito de sodio indujo la

apoptosis en células de *Therapon jarbua* probablemente causando estrés oxidativo y perturbando el ciclo celular de células de tilapia (Wang et al., 2004).

El pez cebra, *Danio rerio*, fue expuesto a una concentración de arsénico permitida en la legislación brasileña actual (10 µg/L) durante 48 horas, se estudiaron las branquias, que es por donde se absorbe el arsénico, concluyendo que a pesar de que no hubo una diferencia significativa entre enzimas, si existe un descontrol en el sistema antioxidante (Ventura-Lima et al., 2009). Sin embargo es posible que también ocasione teratogénesis, ya que se demostró en un estudio realizado en España que al colocar al pez cebra en aguas con mayor concentración de arsénico hay un mayor porcentaje de huevos no viables y también aumenta el porcentaje de juveniles con malformaciones, disminuyendo el porcentaje de juveniles sobrevivientes (Prieto et al., 2006).

En otro estudio, se obtuvo una CL₀ y una CL₅₀ a las 96 horas de 15.73 y 45.32 ppm de As total para la tilapia *Oreochromis niloticus*, administrado como trióxido de As. Asimismo, se sometieron peces sanos a 0, 0.05 y 15.73 ppm As total en agua del pozo Zimapán 5 (Estado de Hidalgo, México) durante 96 horas, encontrándose un aumento en la concentración del metal en el pez completo y en el grado de lipoperoxidación en branquias con el incremento de la concentración en el agua y del tiempo (Baez Ramírez, 2001).

Se expuso a la carpa común, *Cyprinus carpio*, al arsénico en su forma arsenato y arsenito fueron analizados las branquias e hígado, donde se midió la acumulación de la especie química, arsenato o arsenito, y la actividad de la glutatión-S-transferasa omega, que es la enzima limitante en la biotransformación del arsénico inorgánico, teniendo como biomarcadores de defensa antioxidante a las enzimas glutatión-S-transferasas, glutatión reductasa, glutatión, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se vio mayor acumulación de arsenato (As (V)) sólo en branquias, por lo que la respuesta de anti oxidación se vio modulada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que probablemente contribuyó a la reducción de formación de especies reactivas del oxígeno. No hubo cambios significativos en el hígado respecto a la glutatión-S-transferasa, pero el metabolismo del glutatión fue más sensible en este tejido, donde hubo una inhibición de la glutatión reductasa actuando junto al incremento en los niveles de glutatión y aumento la capacidad antioxidante hacia los grupos peróxilo, evitando la producción de lipoperoxidación y producción de especies reactivas del oxígeno (Ventura-Lima et al., 2009).

Otro estudio demostró en indian catfish, *Clarias batrachus*, que la exposición a dosis no letales de arsénico durante 10 días se indujo lipoperoxidación, incremento de glutatión oxidado a reducido y se produjo un exceso de peróxido de hidrogeno en los primeros dos días. Además hubo un incremento en la actividad de las enzimas

glutación peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, y disminución de la actividad de la glutación reductasa (Bhattacharya y Bhattacharya, 2007).

En un estudio con peces de colores, *Carassius auratus*, expuesto a arsenito de sodio durante 7 días, el hígado mostro un incremento en los niveles de lipoperoxidación y de glutación oxidado los primeros 4 días, por lo tanto también incremento el estrés oxidativo. Después del periodo de exposición, las actividades de las enzimas antioxidantes se vieron elevadas, indicando que la respuesta antioxidante estaba mejorando. Así mismo se analizó la metilación del ADN, concluyendo que hubo una hipometilación el cual es un marcador para regulaciones epigenéticas (Bagnyukova, et. al., 2007).

1.7 Biomarcadores

El término biomarcador se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad (Albertini, 1991).

Es un indicador bioquímico, fisiológico o ecológico del estrés físico, químico o biológico en los organismos y sus poblaciones. Es un trazador de las reacciones que pueden ocurrir a diferentes niveles –molecular, celular, en el organismo completo, las poblaciones o comunidades. Su detección permite evaluar de forma temprana los efectos negativos de los contaminantes (INECC, 2016). Se refiere a señales fisiológicas producidas por un xenobiótico que permiten cuantificar el grado de exposición, de una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas.

Los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia de una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental (Toxicología Ambiental, 2016).

La ventaja de utilizar los biomarcadores radica en que, tanto las variaciones internas como las variaciones externas son consecuencia de la alteración fisiológica generada por la exposición al xenobiótico a un tiempo determinado.

El uso de biomarcadores en el diagnóstico de alteración de los ecosistemas y la exposición de la vida silvestre a xenobióticos tiene varias ventajas: la respuesta de los biomarcadores puede indicar la presencia de contaminantes biológicamente disponibles, con un conjunto de biomarcadores adecuados se puede dilucidar la

presencia de contaminantes que no habían sido considerados, pueden detectar eventos de contaminación intermitente e integrar en tiempo y espacio la exposición, son capaces de detectar efectos inducidos por mezclas complejas de contaminantes (Handy, 2003).

Las características deseables de un biomarcador son: ser medible, reflejar la interacción del organismo (cualitativamente o cuantitativamente) con la sustancia química de interés, ser reproducible cualitativamente y cuantitativamente a largo y corto plazo, presentar precisión y exactitud analítica en la medición (Botello et al., 2005).

Es un evento que se produce en un sistema biológico y se interpreta como indicador del estado de salud, de la esperanza de vida o del riesgo de enfermedad. Suelen clasificarse en biomarcadores de: exposición, efecto y de susceptibilidad (Arango, 2012).

1) De exposición

Evalúa en un organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana (Atkinson et al., 2000; Knudsen, 2007).

De acuerdo en la especificidad de pruebas de retención, se subdividen en:

- Selectivos: medición directa de los metabolitos del xenobiótico a través de fluidos corporales
- No selectivos: son indicadores inespecíficos de exposición

2) De susceptibilidad

Es un indicador de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica (Atkinson et al., 2000; Knudsen, 2007). Indicando el grado de sensibilidad a los compuestos tóxicos de manera individual, generalmente se habla de factores genéticos por estudios de ADN y fragmentos de restricción (RFLPs) (Repetto, 1997). Son de dos tipos: el primero de marcadores de polimorfismos de sistemas activadores, que mide la actividad de las enzimas del citocromo P-450 y el segundo de marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores que consiste en la medición de diversas enzimas como la glutatión-s-transferasa, la acetiltransferasa, la glucuronil transferasa o la paraoxonasa (Van Cauteren et al., 1996).

3) De efecto

Evalúa la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede ser asociada con una enfermedad (Atkinson et al., 2000; Knudsen, 2007). Este biomarcador indica los cambios bioquímicos que puede presentar el organismo debió a la exposición al xenobiótico, como modificaciones en la composición celular sanguínea, alteración en la actividad enzimática, aparición de aductos del ADN, aumentos localizados de ARN-m, incremento de determinadas proteínas y aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (Repetto, 1997).

1.8 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres provocando daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes, siendo los RL especies químicas que poseen en el último orbital un electrón no apareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes.

El desbalance entre la producción de EROS y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (Wei, 1996 y Aejmelaus, 1997). El estrés oxidativo puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante y de un incremento de la formación de EROs, cuya alta reactividad puede provocar peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica. El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad.

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno, que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón (Delatre, 1998).

Debido a que la estructura atómica de un radical libre tiene el electrón impar se genera una configuración de alta inestabilidad, son denominadas como especies

reactivas del oxígeno (EROS), que son ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical nitrilo (NO^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Ferreira, 1998).

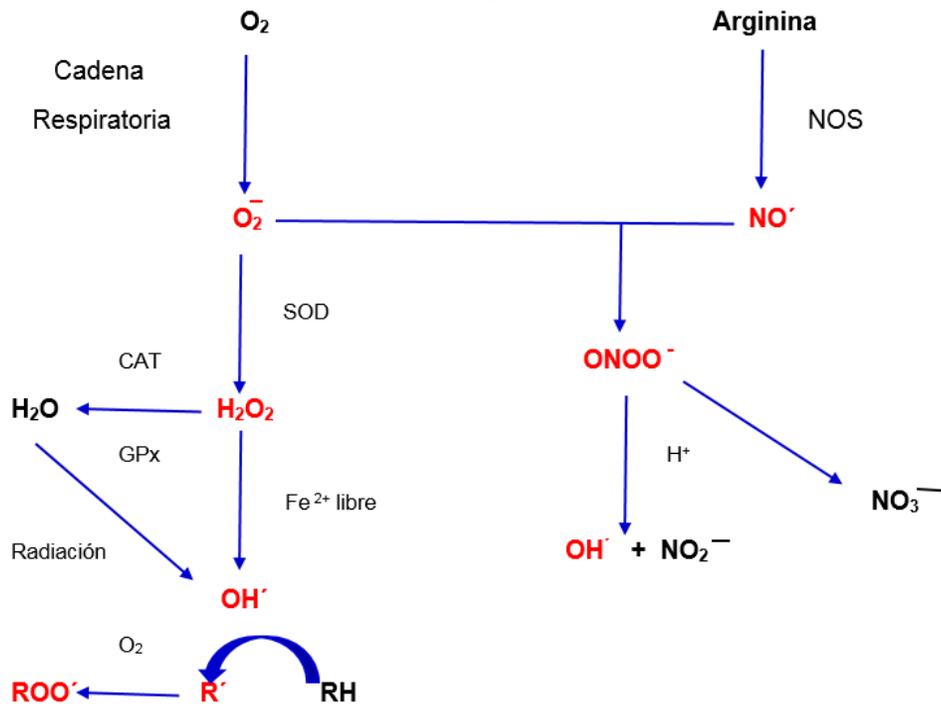


Figura 2: Formación de ERO *in vivo* (Paolisso, 1998)

1. 8.1 Sistema Antioxidante

El sistema de defensa está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. A estas defensas contra los radicales libres se denominan antioxidantes, ejemplo de ellos pueden ser vistos en la tabla 5, ya que neutralizan a estas moléculas inestables (Mayor, 2010). En esta interacción los radicales libres se transforman en una molécula débil no toxica porque cede un electrón que le permite oxidarse.

Las enzimas catalizan o aceleran las reacciones químicas que usan los sustratos que reaccionan con los radicales libres (Delatre, 1998; Jacob, 1995).

- SOD (Superoxido Dismutasa): Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD que contienen cobre y cinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; Mn-SOD que contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; Fe-SOD que contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la E. Coli. Estas enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido.

- **CAT (Catalasa):** Tiene una amplia distribución en el organismo humano, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa. Detoxifica el H₂O₂ en dos moléculas de agua y una de oxígeno (Hai et al., 1997).
- **GPx (Glutación peroxidasa):** Es una enzima selenio-dependiente, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza en citosol (eritrocitos), lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Existen 3 formas de GPx: GPx-c o forma celular, tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido; GPx -p o forma extracelular, presenta afinidad semejante para ambos sustratos; GPx-PH, tiene afinidad específica para los lipoperóxidos.

| Exógenos | Endógenos |
|--------------------------|--|
| Vitamina E (VE) | No enzimáticos Glutación Coenzima Q |
| Vitamina C (VC) | Ácido tiótico |
| Betacaroteno (BC) | Enzimáticos. Cofactor |
| Flavonoides | Superóxido dismutasa (SOD), cobre, manganeso, zinc. Catalasa (CAT), hierro |
| Licopeno | Glutación peroxidasa (GPx) Selenio |

Tabla 5: Clasificación de los antioxidantes (Mayor, 2010).

1.8.2 Daño a biomoléculas

- **Lipoperoxidación (Peroxidación lipídica):** Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas como lo muestra la figura 3. Proviene de reacciones en cadena, donde

los productos obtenidos son capaces de inactivar enzimas; el sustrato para estas reacciones son los ácidos poliinsaturados. Comúnmente se usa el ácido tiobarbitúrico para la cuantificación del grado de lipoperoxidación, cuantificando la producción de malondialdehído (MDA) (Kavitha y Venkateswara, 2008).

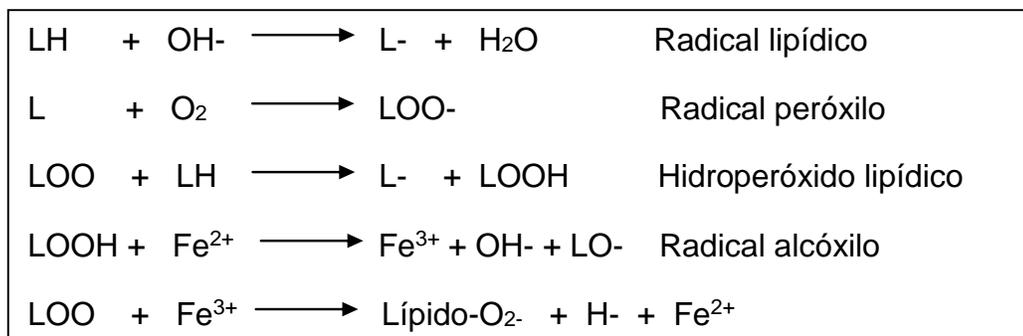


Figura 3: Reacciones de lipoperoxidación (Fraga et al., 1996)

-Proteínas carboniladas: el daño causado a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto es debido a que todos los residuos de aminoácidos son sujeto de ataque por un grupo hidroxilo (OH[•]), produciéndose una oxidación (Standtman, 2002). El contenido de proteínas carboniladas generadas por la ruptura y oxidación de la cadena polipeptídica principal o por la oxidación de las cadenas laterales en los aminoácidos como arginina, lisina, prolina y treonina es utilizado como marcadora de estrés oxidativo (Lopaczynski y Zeisel, 2002).

1.9 Bioindicadores

Son aquellos organismos o comunidades en los que su existencia, sus características estructurales, su funcionamiento y sus reacciones dependen del medio en que se desarrollan y cambian al modificarse las condiciones ambientales (Capo, 2007). Son las especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia a varios parámetros, usan los bioindicadores de contaminación debido a su especificidad y fácil monitoreo.

Un bioindicador es un organismo o poblaciones de organismos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes, estos pueden ofrecer información sobre los riesgos para otros organismos, ecosistemas y el hombre (Pignata, 2003).

Los peces son comúnmente utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, ya que son los vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, a través de la ingesta de sedimentos o alimentos contaminados (Reis-Henriques et al., 2009).

Algunas de las ventajas del uso de bioindicadores como herramienta para determinar la calidad del agua e implementar acciones sobre la recuperación son:

- a) La colecta y registro de información biológica puede realizarse por personas ajenas a la biología, ya que existen manuales que señalan métodos establecidos.
- b) Las comunidades biológicas reflejan las condiciones del sistema (física, química, biológica y ecológica)
- c) El biomonitoreo permanente de las comunidades resulta ser económico comparado con los análisis fisicoquímicos.

1.10 Carpa común (*Cyprinus carpio*)

La carpa común, identificada por Linnaeus en 1758 como *Cyprinus carpio*, es un pez de agua templada a semifría que soporta poco oxígeno y altos niveles de pH, amoníaco, nitritos, nitratos y fosfatos, siendo una especie comestible barata y de fácil manejo de ahí que contribuye a la piscicultura más extendida en la actualidad, esto se debe a que las carpas son especies de ciclo energético corto, su régimen de alimentación es variado, su potencial reproductivo elevado y sus huevos y larvas resistentes y están adaptados a los climas templados, soportando los semitropicales (ILCE, 2013).

México es uno de los principales países productores de *Cyprinus carpio* en América, así como también Brasil, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú, Colombia; en África: Sudáfrica, Mozambique, Marruecos, Tunes, Camerún, Kenia, y en la mayoría de los países de Europa y Asia (FAO, 2015). Siendo el Estado de México el principal productor de carpa con un neto de 8 247.53 toneladas registradas el año 2014 (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2017).

La carpa común silvestre vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros lagunares y embalses de agua, siendo las principales habitantes del fondo, pero buscan alimento en las capas media y superior del cuerpo de agua. (FAO, 2015) El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua está en el intervalo 23 °C y 30 °C ya que los peces pueden sobrevivir períodos de inviernos fríos, en salinidades hasta alrededor de 5‰ son toleradas, con un pH óptimo de 6.5-9.0 y la especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5 mg/ litro) así

como súper saturación (FAO, 2015). Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton, adicionalmente, la carpa consume los tallos, hojas y semillas de plantas acuáticas y terrestres, plantas acuáticas en descomposición, etc. (FAO, 2015).

Dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año, varia la composición química de los peces, siendo los principales constituyentes del músculo del pescado las proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, agua, vitaminas y minerales (Bustos, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

La alta concentración acumulada de arsénico que se encuentra presente en los cuerpos de agua, se da por las actividades antropogénicas e industriales, como la producción de pesticidas, la fabricación de algodón, vidrio y semiconductores, y por origen biogeoquímico, afectando a los organismos que se encuentran presentes en el ambiente, la población mexicana, de acuerdo a la OMS, se encuentra entre las más expuestas a nivel mundial a este agente tóxico, debido a que los mantos acuáticos utilizados para la dispensación del agua potable se encuentra contaminado, esta agua no sólo se utiliza para el consumo humano, sino también para el riego de los cultivos, y la acuicultura, además los tratamientos que son utilizados en las plantas tratadoras de aguas residuales no son capaces de eliminar este compuesto y la contaminación en el agua afecta a organismos acuáticos; la carne de la especie *Cyprinus carpio* tiene un alto nivel proteico por lo cual es altamente consumida, por lo que tiene un gran interés comercial. El consumo de la especie *Cyprinus carpio* contaminada con arsénico puede generar efectos sobre la salud humana debido a la bioacumulación. Se seleccionó como biomarcador de efecto al estrés oxidativo por el daño genérico que puede producir a las diferentes biomoléculas del pez afectando su integridad y funcionalidad, este estudio se realizó en las branquias de la especie *Cyprinus carpio* debido a que es una parte del organismo que está en contacto directo con el efluente de la industria y los mantos acuáticos contaminados, lo cual aportará resultados importantes para una futura legislación de los límites permisibles de arsénico en los mantos acuíferos utilizados para el consumo humano, tomando en cuenta la bioacumulación del arsénico en las especies acuáticas hasta llegar al consumo humano, se decidió llevar a cabo éste estudio con la especie *Cyprinus carpio* debido a la facilidad del manejo en el laboratorio para el cuidado y mantenimiento del mismo, así como el bajo costo comparado con otros estudios de igual importancia.

III. HIPÓTESIS

La toxicidad del arsénico puede generar estrés oxidativo y daño biomolecular en branquia de *Cyprinus carpio*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el estrés oxidativo inducido por arsénico en branquias de carpa común *Cyprinus carpio*.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar los biomarcadores de oxidación celular en branquias de carpa común *Cyprinus carpio* por exposición a arsénico (lipoperoxidación, hidroperóxidos y proteínas carboniladas)
- b) Determinar la actividad antioxidante en branquias de carpa común *Cyprinus carpio* por exposición a arsénico (SOD, CAT, GPx)

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Evaluación biológica usando biomarcadores para evaluar el estrés oxidativo antes y después del sistema

6.1.1 Obtención y mantenimiento de *Cyprinus carpio*

Para las pruebas se utilizó carpa común (*Cyprinus carpio*) de 18.39 ± 0.31 cm de longitud y un peso de 50.71 ± 7.8 g, los cuales se obtuvieron de las instalaciones de acuicultura en Tiacaque, Estado de México. Los peces se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno selladas y oxigenadas, posteriormente, se aclimataron en contenedores con agua del grifo sin cloro durante 30 días antes del experimento. Durante la aclimatación, las carpas fueron alimentadas con Pedregal Silver™ (con alimento para peces), y tres cuartas partes del agua del tanque se sustituyeron cada 24 h con el fin de mantener un entorno saludable. Las características fisicoquímicas del agua del grifo se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, concentración de oxígeno disuelto 80-90%, pH 7.5-8.0, alcalinidad total 17.8 ± 7.3 mg/L, dureza total 18.7 ± 0.6 mg/L. Se mantuvo un fotoperiodo natural de luz/oscuridad.

6.1.2 Determinación de arsénico

La espectroscopia de absorción atómica es un método muy utilizado para determinar arsénico, mide la cantidad de luz que es absorbida por los átomos del analito a la longitud de onda resonante, sin embargo, los límites de detección no son lo suficientemente bajos, por lo cual se ha recurrido al acoplamiento de un generador de hidruros, el cual aporta la sensibilidad requerida. Esta técnica permite que la muestra se mezcle con un ácido diluido agregando un agente reductor como Zn o borohidruro de sodio (NaBH_4), basada en la reacción de Marsh y Guttzeit, esta reacción produce H atómico que reacciona con el As para formar hidruros volátiles como la arsina (AsH_3), los cuales son arrastrados por un gas portador como Nitrógeno a una celda de cuarzo, que es calentada por una llama de aire-acetileno para producir la atomización del analito, cuando los gases pasan a través de este tubo calentado, ocurre una descomposición térmica y se liberan los átomos del Arsénico.

Al pasar la luz emitida por la lámpara a través del conjunto de átomos, la absorción crece a medida que estos se producen, llega a un máximo y cae al consumirse el analito y agotarse los átomos de la celda de absorción.

6.1.3 Evaluación del estrés oxidativo

Tres réplicas de 5 organismos se colocaron en recipientes de polietileno previamente lavados con ácido nítrico al 30% de 6 litros de capacidad que contuvieron agua con arsénico (0.05 mg/L), el tiempo de exposición fue de 96 horas (en la tabla 3 se muestran las condiciones utilizadas en la prueba); después del cual las carpas fueron anestesiadas con aceite de clavo 50 mg/L y se obtuvo la muestra de branquia, se completó el volumen a 1 mL con buffer salino de fosfatos (PBS pH 7.3) y se centrifugo a 12 500 rpm durante 20 min para la obtención del sobrenadante. El sobrenadante se utilizó para la determinación del estrés oxidativo.

| Condiciones | Parámetros |
|---|----------------------------------|
| Volumen de los recipientes, L | 6 |
| Volumen de prueba, L | 4 |
| Concentración ensayada | Agua con arsénico (0.05 mg/L) |
| Número de réplicas por concentración | 3 |
| Temperatura, °C | 20±2 |
| Duración del bioensayo, h | 96 |
| Tipo de ensayo | Estático sin renovación de medio |

Tabla 6. Condiciones del estudio subletal para determinar los efectos del efluente artificial sobre sangre de *Cyprinus carpio*.

6.1.4 Determinación del contenido de hidroperóxidos (Método de Jiang et al., 1992)

El método consistió en tomar 100 µL de muestra previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10% (Sigma-Aldrich)] a la cual se agregaron 900 µL de la

mezcla de reacción [FeSO_4 0.25 mM (Sigma-Aldrich), H_2SO_4 25 mM (Sigma-Aldrich), naranja de xilenol 0.1 mM (Sigma-Aldrich) y 4 mM hidroxitolueno butilado (Sigma-Aldrich) en 90% (v/v) de metanol (Sigma-Aldrich)]. Posteriormente la mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 560 nm frente a un blanco que contenía únicamente la mezcla de reacción. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar y se expresaron en nM de HPC (hidroperóxido de cumeno) (Sigma-Aldrich)/mg de proteína.

6.1.5 Determinación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1978)

A 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se le añadió solución reguladora Tris-HCl 150 mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich) hasta completar 1 mL. La muestra se incubó a 37°C por 30 min, posteriormente se le agregaron 2 mL de TCA-TBA [ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich) al 0.375% en ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 15%], después se indujo un choque térmico (con ayuda de un baño maría) en agua a ebullición por 45 min. Concluido este tiempo, se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de Malondialdehído (MDA)/mg de proteína, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) de 1.56×10^5 M/cm.

6.1.6 Determinación de proteínas carboniladas (Método de Levine et al., 1994, modificado por Parvez y Raisuddin, 2005 y Burcham, 2007)

Consistió en tomar 100 μL del sobrenadante que se le adicionaron 150 μL de DNPH (Sigma-Aldrich) 10 mM en HCl (Sigma-Aldrich) 2 M. Posterior a esto se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Después de la incubación se adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 20% y se dejaron reposar durante 15 min a 4 °C. El precipitado obtenido se centrifugó a 11 000 rpm durante 5 min. El botón se lavó varias veces con etanol (Sigma-Aldrich)-acetato de etilo (Sigma-Aldrich) 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución 6 M de guanidina (Sigma-Aldrich) pH 2.3 donde se incubó a 37 °C durante 30 min. La

absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en μM de carbonilos reactivos (C=O)/mg de proteína, utilizando el CEM de 21 000 M/cm.

6.1.7 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

Se colocaron 40 μL del homogenizado en una celda de cuarzo adicionando 260 μL de solución amortiguadora de carbonatos [carbonato de sodio (Sigma-Aldrich) 50 mM y EDTA (Vetec) 0.1 mM] a pH 10.2. Posteriormente, se agregaron 200 μL de adrenalina (Bayer) 30 mM y se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. La actividad enzimática se determinó usando el CEM de SOD (21 M/m). Los resultados se expresaron como UI/mg proteína.

6.1.8 Determinación de la actividad de la catalasa (Método Radi et al., 1991)

Se utilizaron 20 μL del sobrenadante y se colocaron en una celda de cuarzo, agregando 1 mL de solución amortiguadora de aislamiento [sucrosa (Vetec) 0.3 M, EDTA (Vetec) 1 mM, HEPES (Sigma-Aldrich) 5 mM y KH_2PO_4 (Vetec) 5 mM] y 0.2 mL de una solución de H_2O_2 (Vetec) 20mM. Posteriormente, se tomaron las lecturas de absorbancia a 240 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron sustituyendo el valor de la absorbancia obtenida para cada uno de los tiempos en la fórmula siguiente donde el CEM del H_2O_2 es 0.043 mM/cm, y se expresaron como μM H_2O_2 /mg proteína.

$$[\text{CAT}] = \frac{(A_0 - A_{60})}{\text{CEM}}$$

6.1.9 Determinación de glutatión peroxidasa (Método de Gunzler y Flohe-Claiborne, 1985, modificado por Stephensen et al., 2000)

Se colocaron 100 μL del sobrenadante en una celda de cuarzo y se le adicionaron 10 μL de glutatión reductasa [2 U glutatión reductasa, (Sigma-Aldrich)], además de 290 μL del buffer de reacción [K_2HPO_4 (Vetec) 50 mM, KH_2PO_4 (Vetec) 50 mM pH

7.0, glutatión reducido (Sigma-Aldrich) 3.5 mM, azida de sodio (Sigma-Aldrich) 1 mM, NADPH (Sigma-Aldrich) 0.12 mM] y 100 µL de H₂O₂ (Vetec) 0.8 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 340 nm, a los 0 y 60 s. Los resultados se analizaron usando la siguiente ecuación donde el CEM del NADPH es 6.2 mM/cm. Los resultados se expresaron como mM NADPH/mg proteína.

$$[GP_x] = \frac{(A_0 - A_{60})}{CEM}$$

6.1.10 Determinación de la concentración de proteínas (Método de Bradford, 1976)

A 25 µL del sobrenadante se le agregaron 75 µL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cummassie, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H₃PO₄ en 500 mL de agua desionizada). Los tubos se agitaron y se dejaron reposar por 5 min donde se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron en una curva estándar hecha con albúmina (tabla 3).

| Tubo | Albumina µL | Agua desionizada µL |
|---------------|--------------------|----------------------------|
| 1 | 10 | 90 |
| 2 | 25 | 75 |
| 3 | 50 | 50 |
| 4 | 75 | 25 |
| 5 | 100 | 0 |
| Blanco | 0 | 100 |

Tabla 7. Curva tipo para la prueba de proteínas

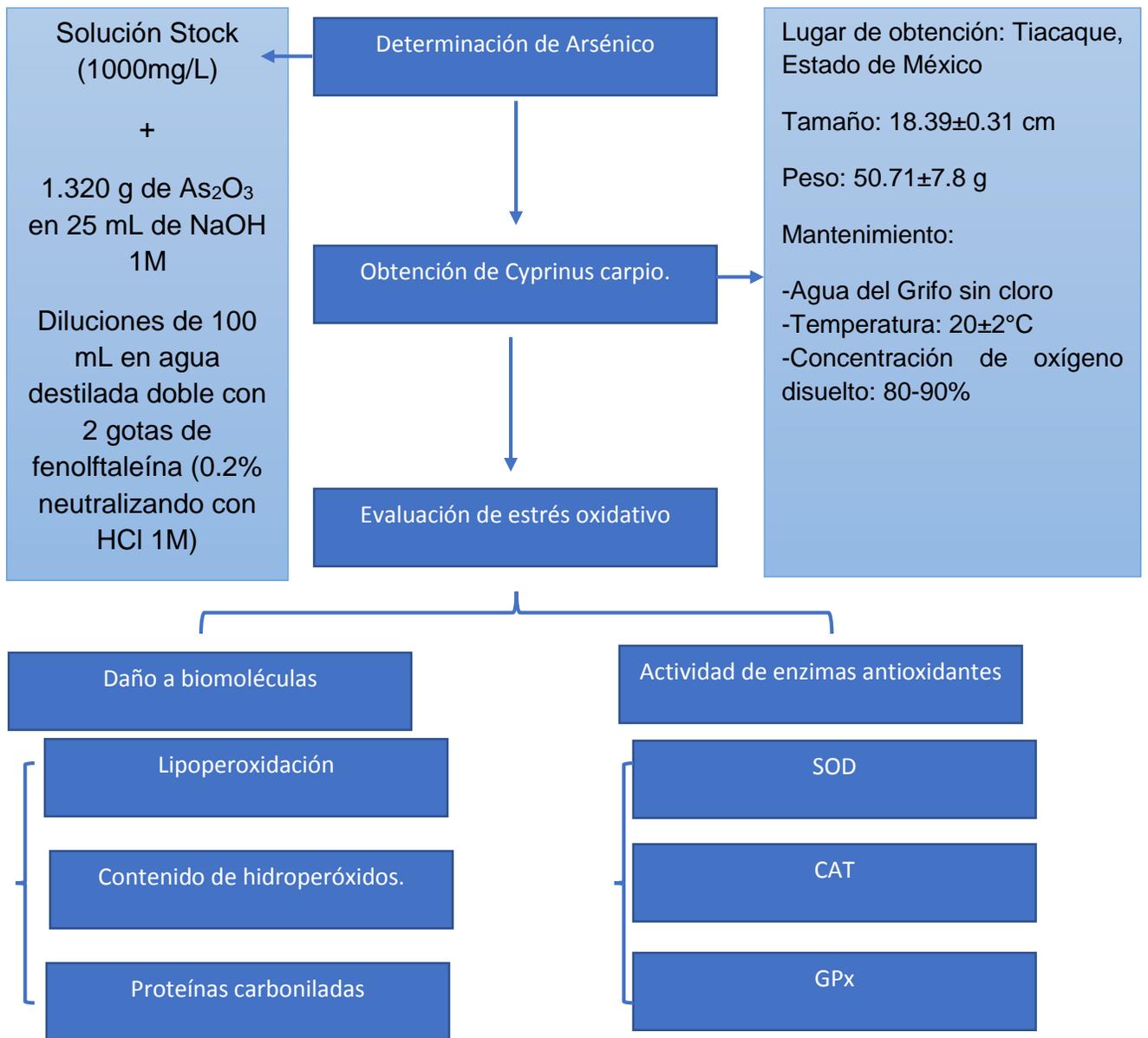


Figura 4: Diagrama de metodología

6.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y las diferencias de cada grupo se compararon usando la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples contra un testigo con el programa estadístico StatPlus (2009). Las diferencias fueron consideradas significativas a una $P < 0.05$.

ANOVA: El análisis de varianza de un factor nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Permite identificar si varios tratamientos muestran diferencias significativas. Esta prueba es una generalización del contraste de igualdad de medias para dos muestras independientes. Se aplica para contrastar la igualdad de medias de tres o más poblaciones independientes y con distribución normal.

Método de Bonferroni: permite superar las dificultades que surgen al aumentar el número de grupos al comparar y no poderse controlar los falsos rechazos de la hipótesis nula. Permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la H_0 de igualdad de medias mediante la técnica de ANOVA.

VII. RESULTADOS

7.1 Evaluación de daño a biomoléculas

7.1.1 Evaluación del contenido de hidroperóxidos

La figura 5 muestra los resultados de contenido de hidroperóxidos en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó una diferencia significativa con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 24 h y 72h de exposición.

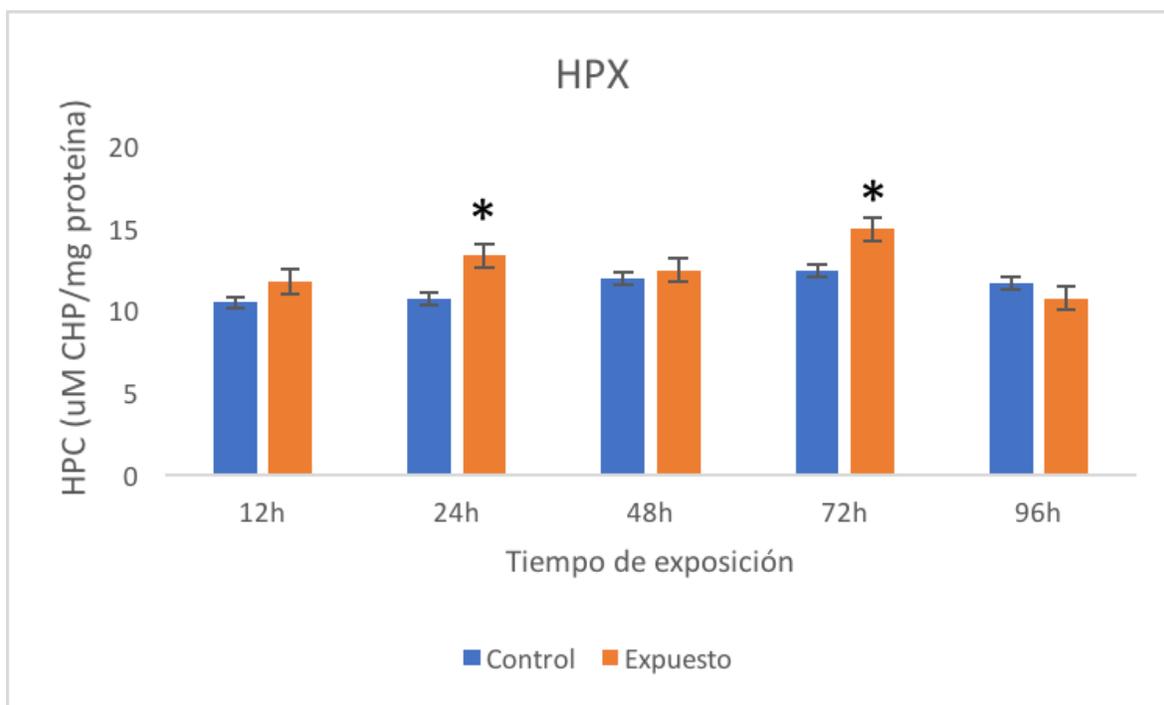


Figura 5: Contenido de hidroperóxidos (HPC) en branquias de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Los valores son la media de tres replicas. CHP hidroperóxido de cumeno. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

7.1.2 Evaluación del grado de Lipoperóxidos

La figura 6 muestra los resultados del grado de lipoperóxidos en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó un decremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12, 24 y 48h de exposición.

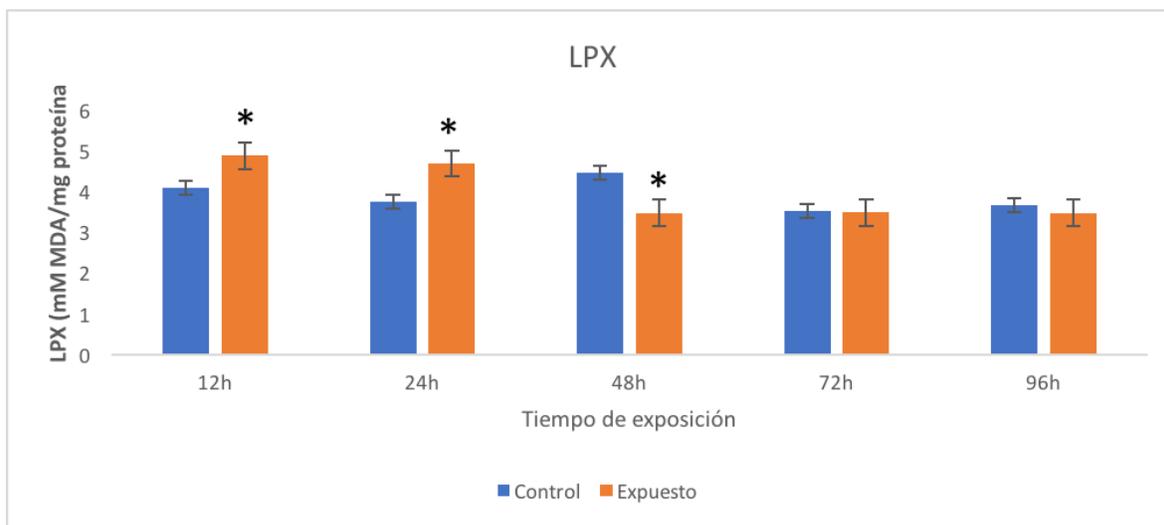


Figura 6: Grado de lipoperoxidación (LPX) en branquias de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72, y 96 h. Los valores son la media de tres replicas. MDA malondialdehído. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

7.1.3 Evaluación de Proteínas Carboniladas

La figura 7 muestra los resultados de las proteínas carboniladas en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12 y 24h de exposición y una disminución a las 96h.

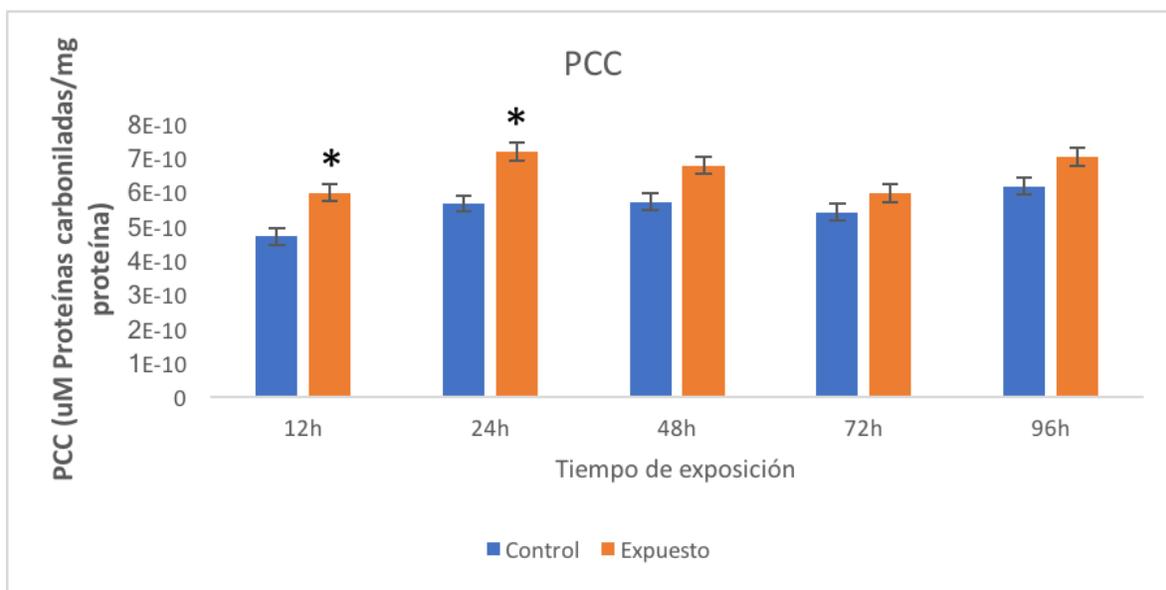


Figura 7: Contenido de proteínas carboniladas (PCC) en branquias de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72, y 96 h. Los valores son la media de tres replicas. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

7.2 Evaluación de actividad enzimática

7.2.1 Evaluación de la actividad de la enzima SOD

La figura 8 muestra los resultados de la actividad de la superóxido dismutasa en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 24 y 48 horas de exposición.

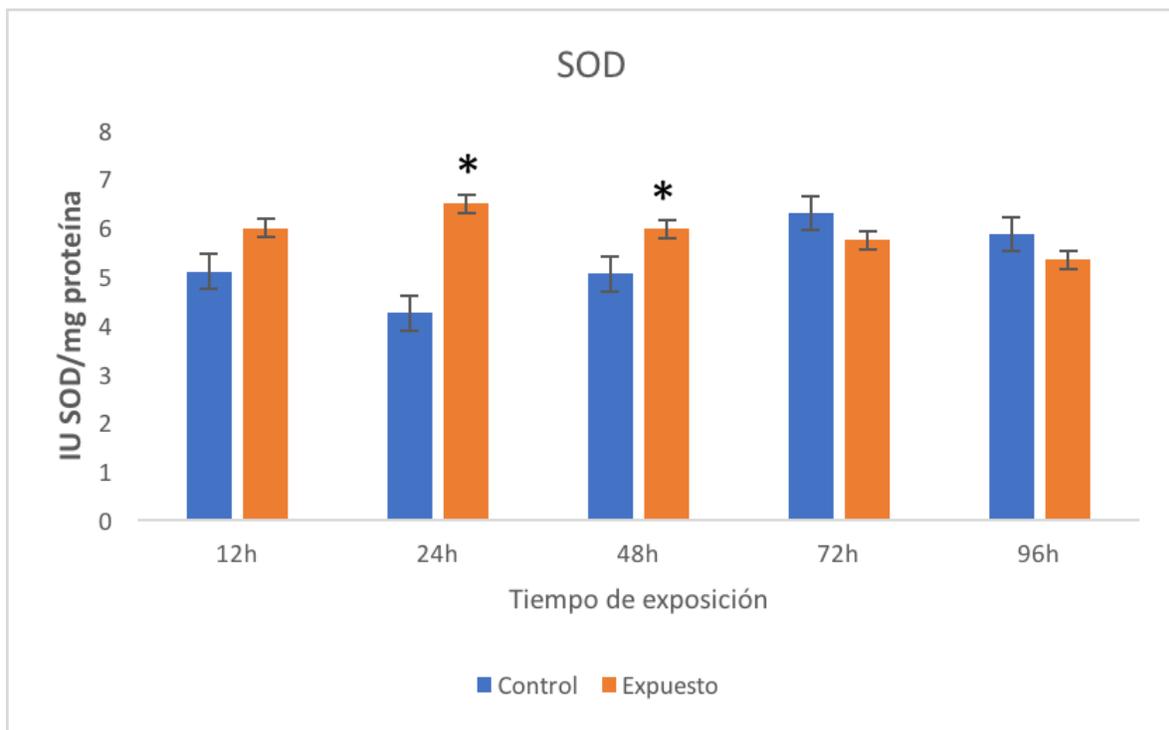


Figura 8: Actividad de la superoxido dismutasa (SOD) en branquia de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72, y 96 h. Los valores son la media de tres replicas. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

7.2.2 Evaluación de la actividad de la enzima CAT

La figura 9 muestra los resultados de la actividad de la catalasa en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 24, 72 y 96h de exposición.

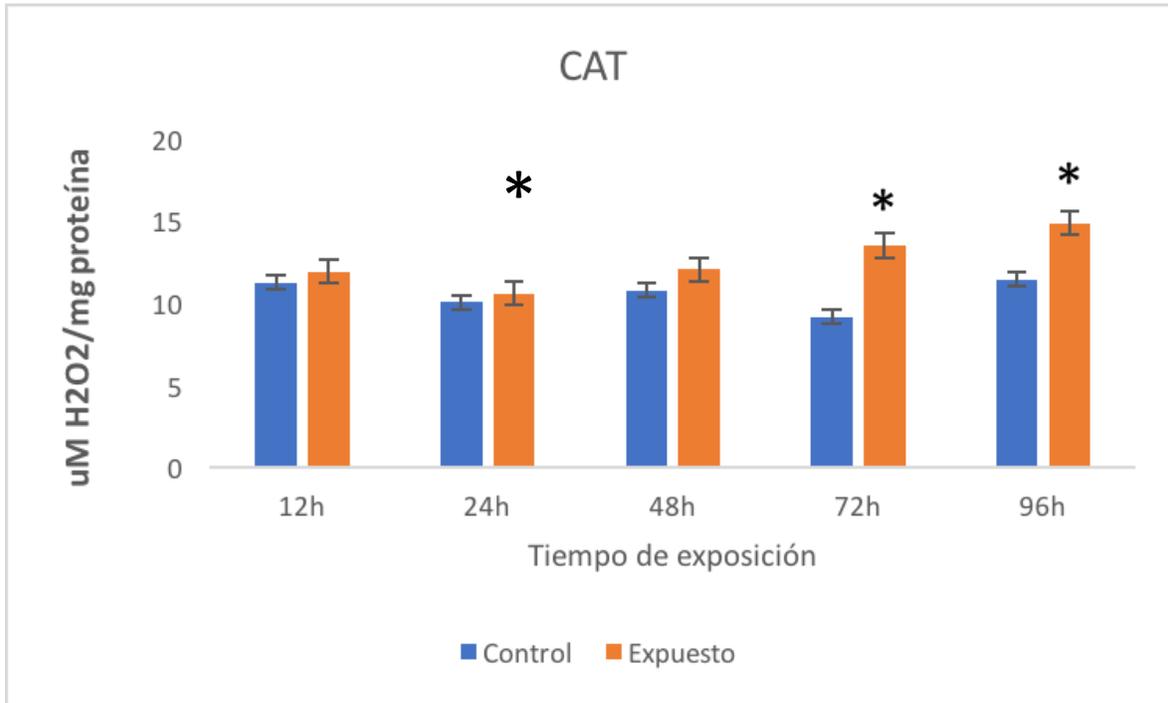


Figura 9: Actividad de la catalasa (CAT) en branquias de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72, y 96 h. Los valores son la media de tres replicas. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

7.2.3 Evaluación de la actividad de la enzima GPX

La figura 10 muestra los resultados de la actividad de la glutatión peroxidasa en branquias de *Cyprinus carpio*, expuesto a 0.05 mg/L de arsénico. Se observó un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12 y 72h de exposición.

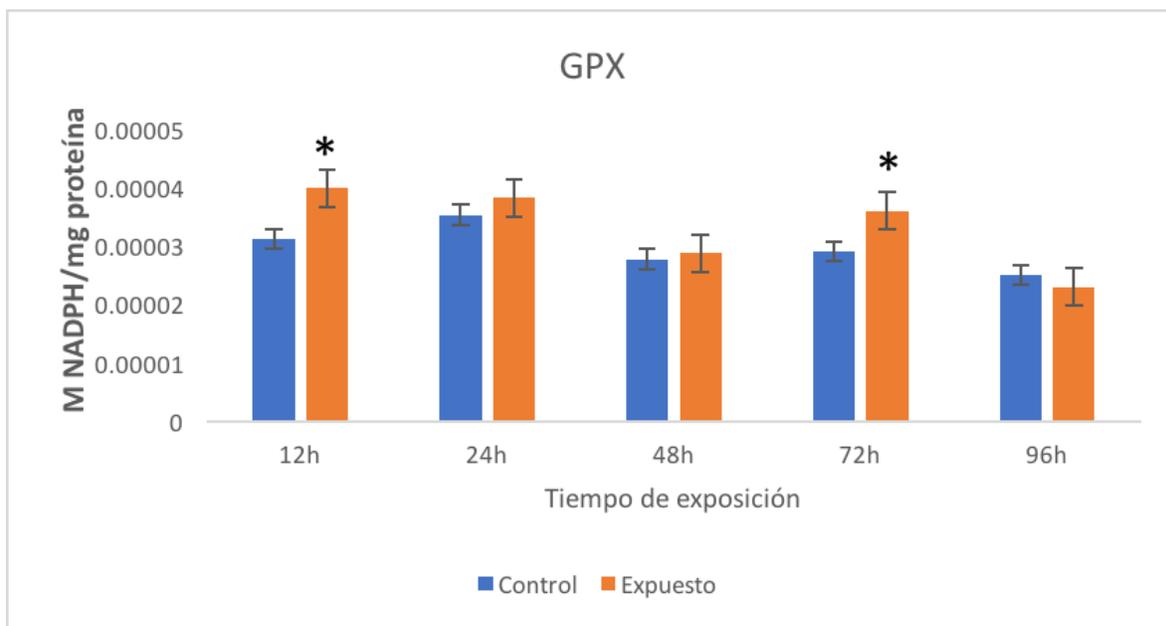


Figura 10: Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en branquias de *Cyprinus carpio* expuesto a arsénico por 12, 24, 48, 72, y 96 h. Los valores son la media de tres replicas. *Diferencia significativa con respecto al control, ANOVA y Bonferroni ($P < 0.05$). N=100 peces

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El arsénico es considerado un contaminante natural muy común, el cual puede bioacumularse fácilmente en diferentes tejidos (Farombi et al. 2007).

Existen diversos estudios que demuestran la producción de ROS en la célula debido a la exposición de diferentes contaminantes, entre los cuales encontramos el oxígeno (Ruas, et al. 2008), dando como resultado un aumento en la lipoperoxidación (LPX) y ocasionando cambios en la actividad de diferentes enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx), (Valka et al. 2005; Lushchak 2011).

Los compuestos de As que producen ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) causan oxidación de la célula, lípidos, ADN y proteínas (Volodymyr 2011). Los sistemas antioxidantes fungen un papel fundamental tanto para preservar la estabilidad celular como mantener un estricto control de los radicales libres.

En la figura 1 los resultados de HPC muestran un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 24 y 72h de exposición, debido a que el As afecta a la mitocondria en el transporte de electrones en la respiración celular, dando como resultado el aumento de EROS (Yamanaka y Okada 1994) generando el radical HO^* que se mide de manera directa en esta prueba, lo cual podría explicar el incremento de este biomarcador. Debido a que las branquias son el primer órgano de contacto con el agua contaminada con arsénico es por eso que se refleja en las primeras 24h de exposición un aumento en el contenido de hidroperóxidos, pero a las 72h nuevamente se muestra un aumento significativo el cual se deba probablemente al aumento de contacto con el arsénico del pez y que su sistema antioxidante no fue capaz de combatir y disminuir este biomarcador. Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Bhattacharya y Bhattacharya (2007) donde demostraron un aumento en la producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) después de la exposición a dosis de 84 mg L^{-1} de arsénico en el pez *C. batrachus*. Durante la LPX, los ácidos grasos poliinsaturados de doble cadena reaccionan con las ROS, particularmente con el radical hidroxilo (HO^*) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como lo es el peroxinitrito ($ONOO^-$) mediante un mecanismo de reacción en cadena permitiendo la formación de hidroperóxidos (Wilhelm-Filho et al. 2005).

Los radicales libres causan daño a diferentes niveles de la célula: ataca a los lípidos y proteínas de la membrana celular lo cual la inhabilita para realizar sus funciones normales, peroxidación de lípidos, modificación irreversible en las proteínas (Soledad, 2007). Cuando existe lipoperoxidación hay daño en los lípidos de la membrana, alterando la cohesión, la fluidez y la permeabilidad, por lo tanto

producen una membrana inestable dando como resultado daño y muerte celular. El As presente en el agua se absorbe por las branquias, por el tracto gastrointestinal y por la piel (Albert, 1997). Se distribuye en hígado, riñón, piel y escamas (debido a la afinidad de los arsenitos por la queratina), branquias y músculo, donde el As inorgánico se biotransforma en As orgánico lipo e hidrosoluble. En la figura 2 muestra los resultados obtenidos de LPx donde se observó un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12 y 24h de exposición, lo que demuestra el daño que se origina en las primeras horas de exposición en las branquias produciendo lipoperóxidos, de acuerdo a un estudio realizado por Ventura-Lima *et al.* (2009) en hígado y branquia de *C. Carpio* por exposición a arsénico en una dosis de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ encontraron un aumento en lipoperóxidos, concordando con los resultados obtenidos. Diversos autores concuerdan que el grado de lipoperoxidación depende de la dosis y el tiempo de exposición al arsénico en peces (Báez y Prieto, 2004, Ventura-Lima *et al.* 2009 y Bhattacharya and Bhattacharya 2007). De acuerdo con un estudio realizado con *Chana punctatus* expuesta a una dosis de 1mg/L de trióxido de arsénico se determinó que después de 90 días de exposición disminuye la concentración de arsénico en los tejidos como son branquias, hígado, riñones y músculo (Allen and Rana, 2004).

Las reacciones de oxidación de las proteínas resultan en la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos particularmente con grupos tiol (S) los cuales son transformados a disulfuros, ácido sulfanílico y ciertos aminoácidos aromáticos, esto conduce a una alteración en su estructura y función como en los puentes de hidrógeno de la estructura secundaria de las proteínas. El OH puede remover protones de los grupos metileno de los aminoácidos llevando a la formación de carbonilos los cuales tienden a ligar aminas de las proteínas o unirse covalentemente al ADN causando un entrecruzamiento (Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, 2003). Las PCC muestran un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12 y 24h de exposición. Los incrementos significativos de este biomarcador también pueden deberse a que las ROS remueven protones de los grupos metileno de los aminoácidos formando carbonilos que tienden a unirse con proteínas induciendo daño en los centros nucleofílicos, grupos sulfhídricos oxidados, fragmentación peptídica culminando con una pérdida de la función proteica (Parvez and Raisuddin 2005). Castro *et al.* 2009 reportaron un incremento en los niveles de proteínas carboniladas en cerebro de pez zebra (*Danio rerio*) tras exposición de $100 \mu\text{L}^{-1}$ de As por 96h. Dicho autor concluye que al existir un incremento en los niveles de proteínas carboniladas bajo condiciones de oxidación pueden generar un alto porcentaje de proteínas disfuncionales consideradas como el mayor contribuidor al daño y muerte celular por estrés oxidativo.

Para poder determinar la presencia de estrés oxidativo ocasionado por arsénico en branquias es necesario analizar el sistema de enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx, las cuales cambian de acuerdo al tiempo de exposición, dosis y organismo (Lantz, et. al., 2007).

Debido a que el arsénico activa las defensas antioxidantes (Vlahogianni et al. 2007) la enzima SOD es la primera que se activa (van der Oost et al., 2003) catalizando la dismutación del anión superóxido evitando que se formen radicales hidróxilo (Wang et al. 2006). En el caso de SOD se observó un aumento significativo con respecto del grupo control ($P < 0.05$) a las 24 y 48h en branquia, lo que nos dice que se contrarresto la formación de hidroperóxidos mostrados anteriormente, el sistema de defensa primaria esta alerta para contrarrestar la formación del anión super oxido O_2^- . Existen pocos estudios respecto a esta enzima, por ejemplo Jain et al. (2012) encontraron que la SOD no presentó cambios significativos en cerebro, hígado y sangre de rata por exposición de 0.325, 1.3 y 2.5 mg kg^{-1} de As. Mientras que Bharti et al. (2012) observaron en ratas hembra una disminución significativa de este biomarcador por exposición a 100 mg L^{-1} de As^{III} . Ambos autores concluyen que el efecto del As en la actividad de SOD depende de la edad, sexo y tiempo de exposición. Como refiere Livingstone (2003), el incremento en la actividad de la SOD en peces y organismos acuáticos, es consecuencia de los altos niveles del radical anión superóxido producido por exposición a diversos contaminantes ambientales, entre ellos incluido el As.

Se reportó en *C. batrachus* un aumento de la CAT tras la exposición de arsénico después de una exposición de 84 mg L^{-1} de As durante 48h (Battacharya and Battacharya, 2007) lo resultados obtenidos en la figura 5 muestra un aumento significativo con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 72 y 96h de exposición, quizá se deba a la eficiencia de la super oxido dismutasa para disminuir los niveles el anión super oxido, lo cual disminuyo la formación de hidroperóxidos que son las moléculas que contrarresta la CAT, sin embargo, estas diferentes respuestas del sistema antioxidante al daño oxidativo muestran claramente que la toxicidad del arsénico es dependiente de la especie y el órgano analizado (Schuliga et al., 2002). En un estudio realizado a *Chana punctatus* se demostró que las branquias y riñón no tienen la misma capacidad que el hígado para neutralizar e impacto de los peróxidos y radicales libres, por eso el decremento de la enzima (Ahmad I, Hamid T, Fátima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S. 2000).

La toxicidad del arsénico (III) está relacionado con su alta afinidad por los grupos sulfhidrilos de las biomoléculas como GSH y ácidos lipídicos (Aphosian and Aphosian, 2006). El arsénico es capaz de inhibir la GPx, SOD y CAT, entre otras enzimas antioxidantes, como lo demostró Flora et. al 2005 en rata con una exposición de arsénico de 100mg/L. La formación del enlace As (III)-S resulta de la

inhibición de las enzimas tioreducin peroxidasa, tioreducin reductasa, GSH y GPx en una exposición crónica (Schuliga et al., 2002; Lin et al., 2001; Chang et al., 2003). Lo que concuerda con los resultados obtenidos en la figura 6, la GPx mostró un aumento con respecto al testigo ($P < 0.05$) a las 12 y 72h de exposición, demostrando así el daño a las biomoléculas por estrés oxidativo.

IX. CONCLUSIÓN

El estrés oxidativo comprende un importante aspecto de la toxicología por lo que ha recibido una especial atención en los últimos años. Diversas investigaciones se han centrado en estudiar los diferentes aspectos relacionados con el estrés oxidativo, entre los que se incluyen los mecanismos por los cuales se produce daño a nivel celular y bioquímico así como los mecanismos de defensa que exhibe el organismo ante este ataque. Se ha encontrado una gran significancia ecológica al proceso de estrés oxidativo particularmente relacionado con diferentes tipos de contaminantes ambientales como los pesticidas que ingresan al agua y causan efectos en los organismos acuáticos.

Se ha hallado que los peces son organismos sensibles ante los cambios provocados por agentes inductores de estrés oxidativo. El entendimiento de los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo genera sus efectos es un tema de gran importancia al momento de identificar posibles biomarcadores que indiquen los efectos de la exposición de los organismos acuáticos ante contaminantes.

Los efectos agudos de estrés oxidativo pueden servir como una señal de alarma de exposiciones tempranas al contaminante y de las posibles consecuencias que se relacionan con daños celulares posteriores.

El contenido de hidroperóxidos, grado de lipoperoxidación y contenido de proteínas carboniladas, se vio alterada por exposición a 0.05 mg/L de arsénico.

Se observó un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx respecto al control como un mecanismo para contrarrestar el daño oxidativo generado por exposición a 0.05 mg/L de arsénico.

Los biomarcadores utilizados en este estudio, pueden servir para la detección temprana de la toxicidad inducida por arsénico en peces.

La exposición de *Cyprinus carpio* a una concentración de 0.05 mg/L de arsénico causa estrés oxidativo en branquia.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aejmelaus RT, Holm P, Kauskinen U, et al. (1997) Age related changes in the peroxy radical scavenging capacity of human plasma. *Free Rad Biol Med*; 23:69-75.
2. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, "Resumen de Salud Pública: Arsénico" 2007
3. Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSD). (2003) Toxicological Profile for Arsenic U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA
4. Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1523:37-48
5. Akter K, Owens FG, Davey DE, Naidu R (2005) Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 184:97–149.
6. Albert, L.A. (1997). *Introducción a la toxicología ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología. Metepec, México.
7. Albertini RJ. (1999). Biomarker responses in human populations: towards a worldwide map. *Mutat. Res*; 428(1-2): 217-226
8. Allen T, Rana S (2004) Effect of arsenic (AsIII) on glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus*. *Biol Trace Elem Res* 100(1):39–48
9. Anawar, H., J. Akai, K. Komaki, H. Terao, T. Yosioka, T. Ishizuka, S. Safiullah, and K. Kikuo. 2003. Geochemical occurrence of arsenic in the groundwater of Bangladesh sources and mobilization processes. *J. Geochem. Explorat.* 77: 109-131.
10. Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Mihaela, D.A., Koplín, M.J., Wollenberg, M.L., 2003. Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193, 18.
11. Aragonés, S.N., M. Palacios D., A. Avello de Miguel, P. Gómez R., M Rodríguez, M. Martínez C. y M. J. Rodríguez B. 2001. Nivel de arsénico en abastecimientos de agua de consumo de origen subterráneo en la comunidad de Madrid. *Rev. Esp. Salud Públ.* 75: 421-432.

12. Arango S. (2012). Biomarcadores para la Evaluación de Riesgo en la Salud Humana. *Revista nacional de la salud pública*, Vol. 30 (1) pp 75-82.
13. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. (2000) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Therap.*; 69(1): 89-95.
14. Avilés, M.; Pardón, M. (2000). Remoción de arsénico de agua mediante coagulación-floculación a nivel domiciliario. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, FEMISCA 2000, pp. 1-10.
15. Baez Ramírez, O.A. (2001). Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hirirart Balderrama de Zimapán, Hidalgo en *Oreochromis niloticus*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional
16. Báez, A., Prieto, F., Galán, C., (2004). Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Ensayos en cortos plazos. Aquatic. No. 21.p 62-70.*
17. Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P., Lushchak, V.I., 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environ. Mol. Mut.* 48, 658–665.
18. Barceló, Damiá y López, María J. (2007) “Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas”. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC.
19. Basu, A., D. Saha, R. Saha, T. Ghosh, and B. Saha. 2014. A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Res. Chem. Intermed.* 40: 447-485.
20. Basu, A., D. Saha, R. Saha, T. Ghosh, and B. Saha. 2014. A review on sources, toxicity and remediation technologies for removing arsenic from drinking water. *Res. Chem. Intermed.* 40: 447-485.
21. Battacharya, A., Battacharya, S., 2007. Induction of oxidative stress by As in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 178–187.
22. Benitez, M; Osicka, R.; Giménez, M.; Garro, O. 2000. Arsénico total en aguas subterráneas en el centro oeste de la provincia de Chaco. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.*
23. Bhattacharya, A., Bhattacharya, S., 2007. Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 178–187

24. Bohlen A., (2002). Southwest Hydrology, May/June, 18
25. Botello, et al.; (2005). *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias* (2° Ed.) México.
26. Bueno, Daniel et al. Presencia de arsénico y coliformes en agua potable del municipio de Tecuala, Nayarit, México. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online]. 2012, vol.28, n.2 [citado 2017-10-29], pp.127-135. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0188-4999.
27. Bustos Z., et. al. (2006) "Estudio de biocumulación de metales pesados en la carpa (*Cyprinus carpio*) de la laguna de Tecocomulco en Hidalgo", *Revista de Salud Pública y Nutrición*, No. 14-2006, ISSN 1870-0160 pp. 26
28. Calderón J, Navarro ME, Jiménez-Capdeville ME, Santos-Díaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, et al. (2001) Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res*; 85:69-76.
29. Campos, V., C. Valenzuela, M. Alcorta, G. Escalante, and M. Mondaca. 2007. Isolation of Arsenic resistance bacteria from volcanic rocks of Quebrada Camarones, Parina Region, Chile. *Gayana* 71: 150-155.
30. Capó M. (2007) *Principios de ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente*. Editorial Tebar.
31. Carbajal, A. González, M. (2012). Propiedades y funciones biológicas del agua, *Agua para la salud: pasado, presente y futuro*, 63-78
32. Clemenza, M., Fiorini, E., Guerra, L., Herborg, C., Labra, M. Orvini, E. Piazzoli, A. Previtali, E. Puggioni, F. Santagostin, A., (2008), *Il Nuovo Saggiatore*, 24(1-2), 19-30
33. Daughton, Christian. (2004) Non-regulated water contaminants: emerging research. En: *Environ Impact Asses Rev*. Vol. 24. p. 711-32.
34. del Razo, L.M., M.A. Arellano y M.E. Cebrián. (1990). the oxidation states of arsenic in wellwater from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ. Pollute*. 64:143-153.
35. Delatre J, Bonnefont-Rousselot D (1998). Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech Lab Int*; 3(2):21-23.
36. Environmental Health Directorate of Health Canada. 1992. Arsenic guidelines for Canadian drinking quality. Ottawa, p. 1-9.
37. Environmental Protection Agency (EPA). (1999). Integrated Risk Information Systems (IRIS) on Arsenic. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development Washington DC.

38. FAO (2017). El agua. Obtenido el 10 de abril de 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/docrep/006/W1309S/w1309s06.htm>
39. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (1996) “Ecología y enseñanza ambiental: Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensiones” Estudio FAO Montes 131
40. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2015) *Cyprinus carpio*. Obtenido el día 12 de septiembre de 2016 de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es
41. FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) “Ecología y enseñanza rural: El agua”. *Depósito de documentos de la FAO*. Obtenido el día 17 de mayo de 2016 de: http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s06.htm#P5_56
42. Fent, Karl; Weston, Ana y Caminada, Daniel. (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. En: *Aquat Toxicol*. Vol. 76. p.122-59
43. Fernández, F. (2012) El agua: un recurso esencial. *Química viva, vol.11 (3)*.147-170.
44. Ferreira R. (1998). Estrés oxidativo y antioxidativo: de las ciencias básicas a la medicina aplicada. Buenos Aires: Hospital Militar Central.
45. Ferrer, A. 2003. Intoxicación por metales. Metal poisoning. *Anal. Sis. San. Navarra* 26: 141-153.
46. Flores, Y. 1999. Análisis químico toxicológico y determinación del arsénico en aguas de consumo directo en la provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica. Tesis (Lic.), UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Título de Químico Farmacéutico. Lima.
47. Gasque, L. (2013). “Arsénico el elemento inclasificable” en revista educación química [en línea] número 25, octubre 2013, pp 495-500, Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido el día 25 de Julio de 2016 de: www.elsevier.es/es-revista-educacion-quimica-78-pdf-90402201-S300
48. Gluszczak L, dos Santos Miron D, Moraes BS, Rodríguez SR, Chitolina SMR, Morsch VM, Loro VL. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2007; Part C.(146): 519-24
49. Goodman, S.T. 1998. *Medical cell biology*, vol. II, pp. 27-65, USA: Goodman, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.

50. Grantham D.A. and Jones J.F., J. Am. (1977) Water Works Assoc., 69,653.
51. Gwaltney-Brant SM. (2002) Heavy Metals. En: Haschek WM, Rosseaux CG, Wallig AM, editors. Handbook of Toxicologic Pathology. New York. Academic Press: 701-32.
52. Hai dQ, varga i, Matkovics. (1997) Organofosfate effects on antioxidants system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). Comp Biochem Physiol; 117C (1):83- 88.
53. Handy, R.D., Galloway, T.S., y Depledge, M.H. (2003). A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. Ecotoxicology, 331-343.
54. Heikens, A (2006). "*Arsenic contamination of irrigation water, soil and crops in Bangladesh: Risk implications for sustainable agriculture and food safety in Asia*" En la revista de la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, número 20, mayo 2006, pp 4-19.
55. Heinrich-Salmeron, A., A. Cordi, C. Brochier-Armanet, D. Halter, C. Pagnout, E. Abbaszadeh-Fard, D. Montaut, F. Seby, P. Bertin, P. Bauda, and F. Arsène-Ploetze. 2011. Unsuspected diversity of arsenite oxidizing bacteria as revealed by widespread distribution of the *aoxB* gene in prokaryotes. Appl. Environ. Microbiol.77: 4685-4692.
56. Hotta N., (1995).Asia Arsenic Network, October
57. Iglesias C., Villarino A. L., Martínez J. A., Cabrerizo L., Gargallo M., Lorenzo H., Quiles J., Planas M., Polanco I., Romero de Ávila D., Russolillo J., Farre R., Moreno Villares J. M., Riobo P., Salas-Salvado J., (2011) "Importancia del agua en la hidratación de la población española: documento FESNAD 2010" Nutr Hosp;26(1):27-36
58. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática), (n.d) "El agua", *Cuéntame de México*. Obtenido el 12 de Mayo de 2016 de: <http://cuentame.inegi.org.mx/territorio/agua/que.aspx?tema=T>
59. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2000) Diccionario de datos de hidrología superficial. Escalas 1:250,000 y 1:1,000,000 (Alfanumérico).
60. Infante, L.; Palomino, S. 1994. Cuantificación espectrofotométrica de arsénico en aguas de consumo humano en la vertiente del río Rímac. Tesis (Lic.), UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Título de Químico Farmacéutico. Lima.
61. Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa (2013). "Piscicultura". Obtenido el día 12 de septiembre de 2016 de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/090/ht ml/sec_7.html

62. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2016) "Ecotoxicología" *Semarnat* Obtenido el día 25 de Julio de 2016 de: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/766-sqre-eco>
63. Jacob RA (1995). The integrated autoxidant system. *Nutr Res*; 15:755-766.
64. Kavitha P, Venkateswara Rao J. (2008) Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 26:192-198.
65. Knudsen LE, Hansen AM (2007). Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health*; 210(3-4): 461-470.
66. Kumaresan, M. and P. Riyazuddin. 2001. Overview of speciation chemistry of arsenic. *Curr. Sci.* 80: 837-846.
67. Lantz, R. C.; Lynch, B. J.; Boitano, S.; Poplin, G. S.; Littau, S.; Tsaprailis, G.; Burgess, J. L. (2007) Pulmonary biomarkers based on alterations in protein expression after exposure to arsenic. *Environ. Health Perspect.* 115:586–591
68. *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*. 20ed. Lewis, USA, pp. 1-13.
69. Lopaczynski W, Zeisel S. (2002). Antioxidants, programmed cell death, and cancer *Nutrition Research*; 21(1-2) 295-307.
70. Lushchak VI (2011a) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C* Vol. 153, pp.175-190.
71. Manahan, S., (2007) *Introducción a la química ambiental*. Editorial Reverté, México. 145-250
72. Mandal, B. K. and K. T. Suzuki. 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58: 201-235.
73. Martí O., (2007). *Claude Bernard y la medicina experimental*. Editorial Montesino.
74. Martínez, R., Rodríguez, J., Sánchez, L. (2007). *Química, un proyecto de la American Chemical Society*, Ed. Reverte.
75. Mayor-Oxilia, R. (2010) *Rev. Inst. Med. Trop*;5(2):23-29
76. Mazari, M. (2017). El agua como recurso. ¿Cómo ves?, 10-12.
77. Metelev, V.V., A.I. Kanaev y N.G. Dzasokhova. (1983). *Water toxicology*. Amerind Publishing Co. New Delhi.

78. Mondal, P., C. B. Majumder, and B. Mohanty. 2006. Laboratory based approaches for arsenic remediation from contaminated water: Recent developments. *J. Hazardous Mat.* 137: 464-479.
79. Monge-Najera J., et. al. (2005), "Biología General". Primera edición, Editorial universidad estatal a distancia, Costa Rica, pp. 55
80. National Geographic (2011). Contaminación del agua. Obtenido el 23 de agosto de 2017. National Geographic: <http://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/tifon-huracan-ciclon-que-diferencia-hay>
81. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2015). "Agua", *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido el día 16 de Mayo de 2016 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
82. Organización Mundial de la Salud (2006), "Guías para la calidad del agua potable" [en línea] (3º Ed.) Volumen. p.157-250. Obtenido el día 25 de Julio de 2016 de: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf?ua=1 http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/
83. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Manzella D, Gambardella A, Varricchio M (1998). Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. *J Am Geriatr Soc*; 46: 833-838.
84. Pignata, M.L. (2003). Curso empleo de biomonitores en estudios de contaminación atmosférica. Auspiciado por Swiss contact, Instituto de Ecología, La Paz Bolivia.
85. Prieto F, Báez O, Scoot W, Gaytán J, Estrada A, (2006). Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebrá (*Danio rerio*) *AquaTIC* (24) 72-85.
86. Reis-Henriques, M., Ferreria, M., Coimbra, A., Silva, C.D., Costa, J., y Shailaja, M.S. (2009). Efectos del fenantreno y el nitrito en juveniles del róbalo, *Dicentrarchus labrax*, mediante el uso de enzimas hepáticas biotransformadoras, fluorescencia biliar y micronúcleos como biomarcadores. *Ciencias Marinas*, 35 (1), 29-40.
87. Repetto M (1997). Diagnóstico de la intoxicación. En: Repetto M (ed). *Toxicología Fundamental*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.
88. Rossman T. 2007. Arsenic. In: Rom W and Markowitz S eds. *Environmental and occupational medicine*, 4th ed. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1006-1017.

89. Ruas CB, Carvalho S, de Araújo HS, Espíndola EL, Fernandes MN (2008) Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf.* 71:86–93.
90. Secretaria de Desarrollo Agropecuario (2017). “Dirección de Acuacultura” [en línea] Disponible en: http://sedagro.edomex.gob.mx/granjas_agricolas [Accesado el día 26 de Noviembre de 2017].
91. Semarnat (2016). “Agua” [en línea] México, disponible en: http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/pdf/Cap6_agua.pdf [Accesado el día 25 de Julio de 2016]
92. Semarnat (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2012) “Agua”. [En línea] Disponible en: http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/pdf/Cap6_agua.pdf (Accesado el día 17 de mayo de 2016)
93. Smedley, P., Kinniburgh, D. (2002): A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17, págs.517-568.
94. Soledad A.J. (2007). “Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico”. Departamento de Fisiología. Universidad de Granada. p.p. 8-11.
95. Standtman ER (2002). Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radica Biol Med*; 33: 597-604.
96. Stuart, Marianne; et al. (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. En: *Science of the Total Environment*. Vol. 416. p.21
97. Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) the cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 127–144.
98. Toxicología ambiental (2016). *Toxicología ambiental*. Universidad de Arizona. Obtenida el día 18 de septiembre de 2016 de <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/c2-2-2.html>
99. Tsai, S. L., S. Singh, and W. Chen 2009. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 659-667
100. Universidad Nacional Autónoma de México (2008), “Agua”, *Bioquímica Interactiva* [En línea] Disponible en: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~3dmolvis/agua/index.html> (Accesado el 12 de Mayo de 2016)
101. Vahter M. (2007) Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; 102:204-11.

102. Valenzuela, C., V. L. Campos, J. Yáñez, C. A. Zarror, and M. A. Mondaca. 2009. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, Northern Chile. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 593-596.
103. Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161–1208.
104. Van Cauteren H, de Kok MCM, Van Schooten FJ (1996). Cancer risk evaluation. In: Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (Eds). *Toxicology. Principles and applications*. CRC, New York, pp. 384-413.
105. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Assessment Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13:57-149.
106. Vanden Hoven, R. N. and J. M. Santini, 2004. Arsenite oxidation by the heterotrophy *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: The arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1656: 148-155.
107. Vega Gleason, Sylvia. 2001. Riesgo sanitario ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en los acuíferos de México. Comisión Nacional del Agua, Gerencia del Saneamiento y Calidad del Agua, México D.F.
108. Vélez, M., (2009). Indicadores de estrés oxidativo relacionado con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico), en diferentes tejidos de tiburón mako (*isurus oxyrinchus*). *Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste*.
109. Venereo J. (2002) “Daño oxidativo, radicales libre y antioxidantes” *Rev Cubana Med Milit*; núm. 31(2), pp. 126-133
110. Ventura-Lima, J., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M., (2009). Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: bioaccumulation, biotransformation and biological responses. *Environ. Poll.* 157, 3479–3484
111. Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou MJ, Valavanidis A (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollute. Bull.* 54, 1361-1371.
112. Volodymyr IL (2011) environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30

113. Wang, Y.C., Chaung, R-T., Tung, L-C., (2004). Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquat. Toxicol.* 69, 67–69.
114. Wei YH, Kad SH, Lee HC (1996). Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletion and lipid peroxidation in human aging. *Ann NY Acad Sci*; 786: 23-34.
115. Wilhelm Filho D, Torres MA, Zaniboni-Filho E, Pedrosa RC (2005) Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes 1847). *Aquaculture* 244:349–357
116. World Water Assessment Programmed, (2009). The United Nations World Water Development Report 3: Water in a changing World. Paris: UNESCO, and London: Earthscan. Table 8.1, page 137.
117. Xiaojuan G. (1995).Asia Arsenic Network, October.
118. Yamanaka,K., Takabayashi F., Mizoi, M., Hasegawa, A., Okada, S., (2001) Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice leads to an increase in 8-oxo-2-deoxyguanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 66–70.

