



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO
RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE
ELEMENTOS TRAZA (PLOMO, CADMIO,
MERCURIO Y ARSÉNICO), EN DIFERENTES
TEJIDOS DE TIBURÓN MAKO (*Isurus oxyrinchus*)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

M a r c e l a V é l e z A l a v e z

La Paz, B.C.S. Diciembre de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 7 del Mes de Diciembre del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Indicadores de estrés oxidativo relacionados con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico) en diferentes tejidos de tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*)”

Presentada por el alumno:

Marcela Vélez Alavez

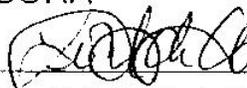
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
CO-TUTOR



Dr. Felipe Galván Magaña
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial

Director de Tesis: Dra. Tania Zenteno Savín

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Co-Tutor: Dra. Lia Celina Méndez Rodríguez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Co-Tutor: Dr. Felipe Galván Magaña

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Jurado de Examen

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Lia Celina Méndez Rodríguez

Dr. Felipe Galván Magaña

Suplente

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

El tiburón mako es considerado una de las especies más activas y veloces (Fischer *et al.*, 1995). La calidad de su carne hace que sea una especie importante para las pesquerías de palangres (Fischer *et al.*, 1995). Por su baja fecundidad y lento crecimiento el tiburón mako es considerado como un recurso vulnerable, susceptible a la explotación y de lenta recuperación de las poblaciones (Stevens *et al.*, 2000). Se considera que un cambio en el tamaño de la población, en su distribución o en su ciclo de vida puede afectar a la comunidad marina (Cortes, 1999; Stevens *et al.*, 2000). Al igual que otros animales, el tiburón mako se ve expuesto a la contaminación en el ambiente marino. Los contaminantes son de gran importancia en ecosistemas acuáticos, no sólo por su toxicidad, sino también por su tendencia a acumularse a lo largo de la cadena alimenticia (Marcotrigiano y Storelli, 2003). Los elementos traza se pueden encontrar en aguas superficiales en sus formas iónicas estables o bien reaccionar con otros iones, para formar compuestos que en ocasiones pueden ser tóxicos; algunos están implicados en las reacciones de transferencia electrónica en las que el oxígeno está presente, lo que favorece la formación de oxirradicales tóxicos (Konisgberg, 2008). El objetivo de este estudio fue determinar el estrés oxidativo asociado a elementos traza como plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y arsénico (As) en diferentes tejidos del tiburón mako. En muestras de músculo, hígado y riñón del tiburón mako se determinó la concentración de Pb, Cd, Hg y As por medio de espectrofotometría de absorción atómica (Loon, 1985). Se determinó la producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como un indicador de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) y proteínas carboniladas como indicador del daño oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) como indicador de las defensas antioxidantes (López, 2007). Se encontró que de los 20 organismos muestreados, 11 eran hembras y 9 machos, todos juveniles; en los que sólo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de Cd, Hg y As entre tejidos o entre sexos para cada tejido; no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la producción de $O_2^{\cdot-}$. Se observó el mayor daño oxidativo en el hígado de los tiburones encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) también entre sexos. De manera general, la actividad de las enzimas antioxidantes fue mayor en hígado y riñón, encontrando diferencias significativas entre hembras y machos. Se encontraron correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre la actividad de GPx y la concentración de Pb, Cd y As, y entre la actividad de CAT y SOD y As en músculo de tiburón mako. Se encontró una relación entre la concentración de As y la actividad de GR en el hígado. Los resultados obtenidos pueden deberse a la dieta, edad y fisiología de los organismos; también a sus hábitos, a la composición de los tejidos estudiados y las características propias de los elementos traza.

Palabras clave: tiburón mako, estrés oxidativo, elementos traza.

ABSTRACT

The mako shark is considered one of the most active and fast sharks (Fischer *et al.*, 1995). The quality of its meat makes it important for longline fisheries (Fischer *et al.*, 1995). Due to its low fecundity and slow growth, the mako shark is considered vulnerable, susceptible to exploitation and with slow population recovery (Stevens *et al.*, 2000). A change in population size, in distribution or in their life cycle may affect the marine community (Cortes, 1999, Stevens *et al.*, 2000). Like other animals, mako sharks are exposed to pollution in the marine environment; contaminants are of great importance in aquatic ecosystems, not only due to their toxicity, but also to their tendency to accumulate along the food chain (Marcotrigiano and Storelli, 2003). The trace elements are found in surface waters in their ionic form, stable or reacting with other ions to form compounds that can sometimes be toxic. Some trace elements are involved in electron transfer reactions in which oxygen is present, which favours the formation of toxic oxiradicals (Konisgberg, 2008). The aim of this study was to determine the oxidative stress associated with trace elements, such as lead (Pb), cadmium (Cd), mercury (Hg) and arsenic (As) in different tissues of the mako shark. The concentration of Pb, Cd, Hg and As was determined by atomic absorption spectrophotometry (Loon, 1985). The production of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) was determined as an indicator of the production of reactive oxygen species (ROS), the levels of lipid peroxidation (TBARS) and protein carbonyls were quantified as indicators of oxidative damage and the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST) was assessed as an indicator of the antioxidant defenses (Lopez, 2007). It was found that of the 20 organisms sampled, 11 were females and 9 males, all juveniles, in which only significant differences ($p < 0.05$) in Cd, Hg and As concentrations were found between tissues or between sexes for each tissue, no significant differences ($p > 0.05$) in the production of $O_2^{\cdot-}$ were found. The greatest oxidative damage was found that the greatest damage is found mainly in the liver; significant differences in oxidative damage ($p < 0.05$) were also found between sexes. Generally, the antioxidant enzyme activity was higher in liver and kidney, with significant differences found between males and females. Significant correlations were found ($p < 0.05$) between GPx activity and the concentration of Pb, Cd and As, and between the CAT and SOD activity and As levels in muscle of mako shark. In liver the concentration of As was found to correlate to the enzymatic activity of GR. These results may be due to the mako shark's diet, age and physiology of organisms, but also to their habits, the composition of the tissues studied and the characteristics of the trace elements.

Keywords: mako shark, oxidative stress, trace elements.

Dedicada a mi familia y Rafita

...y a mis chiquitos Palli y Tika

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, por la beca de maestría otorgada, registro 1010810114.

Al CIBNOR y al proyecto de Estrés oxidativo en organismos marinos (PC 2.0) por las facilidades otorgadas durante este período de formación académica.

A la Dra. Tania Zenteno Savín por su apoyo, guía y compromiso. Por su amistad, gracias.

A la Dra. Lia Méndez y al Dr. Felipe Galván por su apoyo, consejos y su gran colaboración con este proyecto. Por su amistad, gracias.

A Norma, Gris, Orlando y Baudilio, gracias por su ayuda y gran paciencia, es muy agradable trabajar con ustedes.

A mis padres y mi hermano Luis, por estar siempre conmigo y apoyarme en todo momento, los quiero mucho.

A Rafita, por estar siempre a mi lado, por tu gran apoyo incondicional en todo momento, te quiero.

A mis amigos Aurorita y Fer, por esos buenos momentos juntos, gracias por todo, los quiero peques.

A mis buenos amigos Tania, Anita, Gina, Luz, Cris, Paty, Normichis, Esthercita, Lia, Coy, Nati, Adán, Fausto, Oswaldo, Cremas, Quina, Tripp, Massó, Reno, Obet, Mario, Sergito, Calín, Ever, David, Alex... todos son geniales, grandiosos amigos, los quiero montones.

Al club de "Touchito", simplemente excelente.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Antecedentes.....	14
Hipótesis.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Particulares.....	17
Metodología.....	18
Área de estudio.....	18
Colecta de muestras.....	19
Análisis bioquímicos.....	20
Presencia de elementos traza.....	20
Indicadores de estrés oxidativo.....	21
Producción de especies reactivas de oxígeno.....	21
Determinación de radical superóxido.....	21
Daño oxidativo.....	22
Determinación de niveles de peroxidación de lípidos (TBARS).....	22
Determinación de proteínas carboniladas.....	22
Actividad de enzimas antioxidantes.....	24
Superóxido Dismutasa.....	24
Catalasa.....	24
Glutación Peroxidasa.....	25
Glutación Reductasa.....	25
Glutación-S-Transferasa.....	26
Determinación de proteínas totales.....	26
Análisis estadísticos.....	27
Resultados.....	28
Concentración de elementos traza.....	28
Indicadores de estrés oxidativo.....	36
Producción de especies reactivas de oxígeno.....	36
Producción de radical superóxido.....	36
Daño oxidativo.....	38
Peroxidación de lípidos (TBARS).....	38
Proteínas carboniladas.....	39
Defensas antioxidantes.....	41
Glutación Reductasa.....	41
Glutación Peroxidasa.....	43
Glutación-S-Transferasa.....	44
Catalasa.....	46
Superóxido Dismutasa.....	47
Relación entre elementos traza e indicadores de estrés oxidativo.....	50
Discusión.....	51
Concentración de elementos traza.....	51
Elementos traza y daño oxidativo.....	54
Elementos traza y actividad enzimática antioxidante.....	57
Conclusiones.....	60
Bibliografía.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de Fenton catalizada por hierro.....	11
Figura 2. Reacción de Haber-Weiss.....	12
Figura 3. Área de estudio	19
Figura 4. Ejemplar de tiburón mako.....	20
Figura 5. Talla y sexo de los individuos de tiburón mako.....	28
Figura 6. Concentración de plomo en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	29
Figura 7. Concentración de plomo en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	30
Figura 8. Concentración de cadmio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	31
Figura 9. Concentración de cadmio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	31
Figura 10. Concentración de mercurio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	32
Figura 11. Concentración de mercurio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	33
Figura 12. Concentración de arsénico en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	34
Figura 13. Concentración de arsénico en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	35
Figura 14. Producción de radical superóxido (O_2^- , nmol/mg proteína . min) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	37
Figura 15. Producción de radical superóxido (O_2^- , nmol/mg proteína . min) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	37
Figura 16. Producción de lípidos peroxidados (nmol TBARS/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	38
Figura 17. Producción de lípidos peroxidados (nmol TBARS/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	39
Figura 18. Producción de proteínas carboniladas (μ mol/gr. tejido) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	39
Figura 19. Producción de proteínas carboniladas (μ mol/gr. tejido) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	40
Figura 20. Actividad de glutatión reductasa (U GR/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	42
Figura 21. Actividad de glutatión reductasa (U GR/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	43
Figura 22. Actividad de glutatión peroxidasa (U GPx/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	43
Figura 23. Actividad de glutatión peroxidasa (U GPx/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	44
Figura 24. Actividad de glutatión-s-transferasa (U GST/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	45
Figura 25. Actividad de glutatión-s-transferasa (U GST/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	46
Figura 26. Actividad de catalasa (U CAT/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	46
Figura 27. Actividad de catalasa (U CAT/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	47

Figura 28. Actividad de superóxido dismutasa (U SOD/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	48
Figura 29. Actividad de superóxido dismutasa (U SOD/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	49
Figura 30. Efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Concentraciones de elementos traza en tejidos de hembras y machos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	35
Tabla II. Producción de radical superóxido (O_2^-), lípidos peroxidados y proteínas carboniladas en tejidos de hembras y machos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur.....	41
Tabla III. Actividad de las enzimas antioxidantes en tejidos de hembras y machos de tiburón mako de Isla Magdalena Baja California Sur.....	49

INTRODUCCIÓN

Los peces cartilaginosos que pertenecen a la Clase Chondrichthyes son el grupo más antiguo de sobrevivientes de vertebrados con mandíbula. Son un grupo de gran tamaño y diversidad que incluye aproximadamente entre 900 y 1100 especies de tiburones, rayas y quimeras (Wourms & Demski, 1993). La Subclase dominante corresponde a los Elasmobranchii, que incluye a los tiburones y rayas. Existen alrededor de 375 a 500 especies de tiburones asignados a 8 Órdenes. Los principales órdenes son Carcharhiniformes que abarca 56% de las especies de tiburones existentes, Squaliformes agrupa 23% de especies, Orectolobiformes con 8% y Lamniformes con un 4% de las especies de tiburones existentes (Compagno, 1990).

El tiburón mako, también conocido como marrajo (*Isurus oxyrinchus*) es una especie que pertenece a la familia Lamnidae, que está constituida por 3 géneros y 5 especies (*Carcharodon carcharias*, *Isurus paucus*, *I. oxyrinchus*; *Lamna nasus* y *L. ditropis*). La distribución de estas especies abarca desde aguas tropicales a aguas frías, litorales y epipelágicas (Compagno, 1984). *Isurus oxyrinchus* es una especie litoral y epipelágica que puede acercarse a pocos metros de la costa y se ha registrado que su ocurrencia más frecuente es en masas de agua cercanas a los 16°C. Su reproducción es ovovivípara, con registro de canibalismo y con un número de crías por camada entre 4 y 16. Su alimentación se basa en peces pelágicos pequeños (jureles, sardinas, anchovetas) y grandes pelágicos (pez espada, atunes y otros tiburones) (Compagno, 1984). Es fauna acompañante de la pesquería del pez espada en la costa del Atlántico norte y el Mediterráneo (Buencuerpo *et al.*, 1998). Es, probablemente, la especie de tiburón más activa y veloz, característica por su capacidad de saltar fuera del agua, especialmente cuando se encuentra enganchada en un anzuelo (Fischer *et al.*, 1995).

La madurez reproductiva de la especie ha sido descrita en el rango de 195 a 284 cm para machos, mientras que las hembras maduran en el rango de 280 a 394 cm. El tamaño de nacimiento de la cría se ha registrado entre 60 y 70 cm (Stevens, 1983). La edad de madurez sexual para machos ha sido estimada entre 2 y 3 años (Pratt & Casey, 1983), menor a la estimación para *Lamna nasus*, que es de 5 años (Paust & Smith, 1986) y para *Carcharodon carcharias* en el rango de edad entre 8 y 10 años (Wintner & Cliff, 1999). La edad de madurez sexual en el caso de las hembras se ha estimado en 7 años (Pratt & Casey, 1983) menor a la estimada para *L. nasus* de entre 9 y 10 años (Paust & Smith, 1986) y para *C. carcharias* de 12 y 13 años (Wintner & Cliff, 1999).

En la costa occidental de Baja California Sur *Isurus oxyrinchus* tiene un registro máximo de talla de 290 cm de longitud total (LT), pero las tallas más abundantes son entre 90 cm y 160 cm LT, que corresponden a etapa juvenil, por lo que se ha determinado como un área de alumbramiento ó de crianza (Ramírez-González, 2002; Ribot-Carballal, 2003; Conde-Moreno, 2005). Baja California Sur es un área que se caracteriza por presentar aguas altamente productivas donde juveniles de tiburón mako pueden encontrar abundante alimento (Castro, 1987; Hoyos-Padilla, 2001).

El tiburón mako es altamente migratorio y tiene una distribución geográfica circumglobal. En el Atlántico oeste, se distribuye desde el Golfo de Maine al sur de Brasil, en el Atlántico este, desde Noruega hasta la costa occidental de Sudáfrica, incluyendo el mar Mediterráneo (Valeiras & Abad, 2006). De igual manera lo podemos encontrar en el océano Índico y en el océano Pacífico en ambos hemisferios (Compagno, 2001). El tiburón mako tiene importancia para las pesquerías de palangres, especialmente debido a la buena calidad de su carne; también es una de las especies más apreciadas por los pescadores deportivos; se captura con redes de enmalle, palangres

flotantes, con líneas y anzuelos. Su carne se comercializa en fresco, congelada, ahumada y salada/desecada para el consumo humano; además se utiliza para la producción de aceite rico en vitaminas y de cuero; las aletas se aprovechan para sopas y las mandíbulas con su dentadura como objetos de adorno (Fischer *et al.*, 1995). El tiburón mako es considerado un recurso vulnerable debido a su baja fecundidad y lento crecimiento, lo que los hace susceptibles a la explotación y la recuperación de la población tiende a ser lenta (Stevens *et al.*, 2000). Se considera que un cambio en el tamaño de la población, en su distribución o en su ciclo de vida pueden afectar a la comunidad marina (Cortes, 1999; Stevens *et al.*, 2000) y, al igual que otros animales, también se ve expuesto al impacto de la contaminación en el ambiente marino.

La contaminación ambiental se define como cualquier sustancia química, elemento físico u organismo patógeno, presente en el medio ambiente que interfiere de manera adversa con los recursos naturales o la salud de animales (incluyendo humanos) o de los ecosistemas. Tal escenario plantea una relación estrecha y directa entre la magnitud de la exposición a los contaminantes y el riesgo a las enfermedades. Se ha reconocido que un alto porcentaje de los padecimientos a nivel mundial podría atribuirse a factores ambientales asociados a la degradación de los ecosistemas, como son la exposición a los productos químicos y accidentes tecnológicos. Cuando las poblaciones se exponen crónicamente a los contaminantes ambientales, con frecuencia se observa un aumento en la prevalencia de las enfermedades crónico-degenerativas. Entre los contaminantes ambientales que han sido asociados con enfermedades crónico-degenerativas relacionadas con estrés oxidativo, están algunos metaloides y metales (Konisgberg, 2008).

Los contaminantes en ecosistemas acuáticos, como los metales pesados, son de gran importancia por su toxicidad y su tendencia a acumularse a lo largo de la cadena alimenticia. Algunos peces, como los tiburones, están localizados al final de la cadena alimenticia en los sistemas acuáticos, es decir, son depredadores tope, por lo que pueden acumular estos contaminantes y posteriormente pasarlos al humano al ingerirlos causándonos enfermedades crónicas o agudas. Por ejemplo, el riesgo a la salud humana por mercurio (Hg) en el medio ambiente fue trágicamente demostrado durante los severos incidentes ocurridos por contaminación en Minamata y Niigata, (Japón) desencadenados por el consumo de pescado contaminado con metilmercurio. Por lo tanto, el consumo de pescado representa una de las primeras vías de exposición a metales para los humanos; para resguardar la salud pública, la concentración estándar máxima permisible de muchos de estos contaminantes en la comida ha sido establecida en varios países (Marcotrigiano & Storelli, 2003).

Los metales pesados son introducidos en el medio ambiente marino por medio de varias rutas: procesos de fundición, combustión de gasolina e industrialización, y como consecuencia de la erosión de rocas minerales, polvo arrastrado por el viento y actividad volcánica. Estos elementos tienen como destino el interior de sistemas acuáticos, ríos, lagos u océanos por medio de diferentes vías como lluvia radioactiva atmosférica, desechos, derrames accidentales y salidas de sistemas terrestres (efluentes domésticos e industriales) (Licata *et al.*, 2005).

Los metales traza en sedimentos de las costas son de gran importancia por su potencial de llegar a ser tóxicos en concentraciones elevadas. Éstos están normalmente presentes en sedimentos como resultado natural de procesos biogeoquímicos como la

erosión, desgaste de rocas y resuspensión de sedimentos entre otros (Prange & Dennison, 2000).

Los metales son sustancias naturales que se han formado por meteorización de minerales; algunos son esenciales para la salud humana, y a menudo son componentes importantes de varias enzimas con funciones fisiológicas. Los metales se pueden encontrar en aguas superficiales en sus formas iónicas estables o bien reaccionar con otros iones, para formar compuestos que en ocasiones pueden ser tóxicos. Algunos metales están implicados en las reacciones de transferencia electrónica en las que el oxígeno está presente, lo que favorece la formación de oxiradicales tóxicos. Desde el punto de vista toxicológico, los metales pesados o metaloides más importantes que participan en este tipo de reacciones son el Hg, el plomo (Pb), el cromo (Cr), el cadmio (Cd) y el arsénico (As) (Konisberg, 2008).

El Pb es considerado como un metal tóxico no esencial y su presencia en aguas marinas u oceánicas es atribuida principalmente a la depositación atmosférica (AAFCO, 1996; Páez-Osuna, 1996a; Sommerhayes & Thorpe, 1996). Su concentración en aguas oceánicas abarca un rango de 0.001 a 0.035 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Sommerhayes & Thorpe, 1996); mientras que en algunas lagunas costeras mexicanas se han registrado concentraciones que van desde menos de 0.1 hasta 310 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Villanueva & Páez-Osuna, 1996). La dieta es una fuente importante de exposición de Pb (Llobet *et al.*, 1998). Un hombre adulto sano no expuesto al Pb ingiere diariamente de 0,3 a 0,5 mg de este metal, el 80% del mismo es eliminado por el riñón. Si la ingesta es superior a 0,6 mg/día el plomo se acumula y puede provocar una intoxicación.

El Cd es considerado como un metal altamente tóxico (AAFCO, 1996) no esencial en animales (Allowey & Ayres, 1997; Nuñez-Nogueira, 2002). La

concentración de este elemento en aguas oceánicas está entre los 0.1 y 120 ng L⁻¹ (Summerhayes & Thorpe, 1996). Se cree que la alimentación es la ruta principal de captación de este elemento en los humanos, y su biomagnificación a través de la cadena alimenticia es común en la naturaleza (Vas, 1987; Fisher & Reinfelder, 1995). La presencia de Cd puede estar relacionada con la detoxificación por metalotioneinas como proteínas inducidas por este metal (Hidalgo & Flos, 1986; Betka & Callard, 1999; Nuñez-Nogueira, 2002).

El Hg es un metal altamente tóxico (AAFCO, 1996), no esencial, que ha sido estudiado ampliamente en tiburones, particularmente en el músculo, como resultado de su acumulación a través de la cadena alimenticia, acumulándose en altas concentraciones en peces (Alloway & Ayres, 1997; Rojas *et. al.*, 1999). El metilmercurio es considerado la forma más tóxica del Hg debido a su alta liposolubilidad lo que lo hace tener una rápida difusión a través de la membrana celular (Pelletier, 1995). El Hg es un neurotóxico, genotóxico y elemento teratogénico (Alloway & Ayres, 1997; Rojas *et. al.*, 1999). Aún cuando el Hg puede ser fácilmente distribuido por aire y enriquecer las aguas oceánicas por precipitación (Pelletier, 1995), la concentración disuelta en aguas oceánicas está entre los 0.4 y los 2.0 ng L⁻¹ siendo la concentración más baja reportada (Summerhayes & Thorpe, 1996).

El As es un metaloide moderadamente tóxico (AAFCO, 1996), considerado como un elemento no esencial (Alloway & Ayres, 1997), y su forma inorgánica es la más dañina (Del Razo *et. al.*, 2001). Los niveles de As normalmente están por debajo de 1 µg g⁻¹, pero en alimentos de origen marino (incluyendo peces) se registra una concentración media cercana a los 5 µg g⁻¹ (Núñez-Nogueira, 2005). El As se encuentra más comúnmente en su forma orgánica (Rojas *et. al.*, 1999). En organismos marinos

está en forma de grasa o soluble en agua, como arsenobetaina (IPCS, 1981), éste es varios ordenes de magnitud menos tóxico que el As inorgánico. Se ha encontrado que el As de los productos marinos es realmente absorbido por el tracto gastrointestinal en los humanos. Afortunadamente es excretado rápidamente y parece no haber evidencia concluyente de sus efectos tóxicos o carcinogénicos a largo plazo (Turozcy *et. al.*, 2000).

Cabe destacar que la mitocondria es uno de los principales blancos celulares de los efectos oxidantes de los metales. Se ha propuesto que algunas especies oxidantes de los metales como As_3^+ , Cr_6^+ , Hg_2^+ , perturban la integridad estructural de la membrana interna mitocondrial, lo que produce un aumento en la permeabilidad alterando el potencial de membrana y propiciando el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Ello favorece la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical superóxido (O_2^-), así como de especies reactivas intermediarias, producto de su biotransformación (Konisgberg, 2008). Como ejemplo, el As_3^+ , al oxidarse a As_5^+ , genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) espontáneamente y durante su biotransformación produce radicales de As, como el peroxilo dimetilado de As. Otro mecanismo de acción consiste en la inhibición de algunas de las enzimas involucradas en la protección celular contra el estrés oxidativo (Konisgberg, 2008).

El estrés oxidativo es conocido como el desbalance en la producción de ERO y las defensas antioxidantes, provocando un daño oxidativo que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales pueden desencadenar el deterioro y muerte celular (Sies, 1997). El oxígeno es esencial para la vida, pero presenta una paradoja para los organismos aerobios. Este elemento desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular y

constituye lo que se conoce como el soporte de la vida, pero también constituye el punto de partida para el oxidativo que puede provenir de una deficiencia del sistema de defensa antioxidante o de un incremento en la formación de ERO, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, ruptura del ADN y degradación protéica (Pérez & Pérez, 2000). El daño oxidativo a nivel celular conlleva disfunciones metabólicas y sistémicas que preceden distintos tipos de padecimientos o efectos adversos a la salud. Los sistemas más afectados por los agentes químicos o contaminantes ambientales incluyen los sistemas inmune, neurológico y endócrino. Es importante considerar que los blancos celulares y moleculares de los distintos compuestos químicos no serán iguales en todos los casos, a pesar de que todos se llevan a cabo a través de procesos de estrés y daño oxidativo, por lo que los efectos adversos a la salud dependerán del tipo de compuesto químico de que se trate, así como la duración de la exposición al mismo (Konisgberg, 2008).

Por otra parte, los radicales libres y las ERO se forman constantemente en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. Las fuentes endógenas incluyen a los subproductos de las reacciones metabólicas esenciales, como la generación de energía por la mitocondria o del metabolismo de compuestos tóxicos a través del sistema enzimático del citocromo P₄₅₀. Las fuentes exógenas que generan radicales libres y ERO son el humo del cigarro, los contaminantes ambientales como las emisiones de los automóviles e industrias, el asbesto y la exposición a radiaciones iónicas, entre otras (Konisgberg, 2008).

Actualmente se realizan estudios que analizan desde la liberación del contaminante al medio ambiente, hasta el desarrollo de las enfermedades en la población. La naturaleza de estos efectos adversos puede ser diversa y afectar a los organismos a

distintos niveles, tanto bioquímicos, como celulares y hasta los mecanismos de acción moleculares. Entre estos efectos destacan los procesos originados por un desbalance entre eventos prooxidantes (incremento de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno) y antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) (Konisberg, 2008).

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5 % escapa a esta reducción bivalente y se desvía a la vía de reducción monovalente; de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), 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. Los RLO son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón (Halliwell & Gutteridge 1989; Delatre J, 1998). El término ERO agrupa a los RLO y otros compuestos que, como el H_2O_2 , no constituyen un verdadero radical. Las ERO son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de oxidoreducción (REDOX), que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales (Delatre, 1998). Son las siguientes:

Oxígeno singulete (1O_2). En los sistemas biológicos el 1O_2 es producido por diferentes vías fotoquímicas y químicas. El oxígeno singulete es producido frecuentemente por reacciones de fotosensibilización en las que las moléculas absorben luz a una longitud de onda específica y son elevadas a un mayor estado energético. La energía puede luego ser pasada a oxígeno molecular (O_2) y formar 1O_2 mientras que la molécula sensibilizada regresa a su estado basal. El tiempo de vida del 1O_2 es de aproximadamente 3.7 μs en medio acuoso. Su alta reactividad con los componentes es

controlada primeramente por difusión, cuya distancia media ha sido estimada en aproximadamente 92 nm, por tanto, es probable que los efectos en los sistemas biológicos por el $^1\text{O}_2$ ocurran en el sitio específico de su formación (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Radical superóxido (O_2^-). puede actuar tanto como oxidante como reductor en los sistemas biológicos. La dismutación de O_2^- , conduce a la formación de H_2O_2 que ocurre espontáneamente o catalizada por la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD). En su estado protonado O_2^- forma el radical perhidroxilo ($^{\cdot}\text{OOH}$), el cual es un oxidante poderoso (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999), pero su relevancia biológica es probablemente menor debido a su baja concentración a pH fisiológico. En el interior de membranas biológicas, como las de mitocondrias y tilacoides, el O_2^- es estable (Takahashi & Asada, 1988; Shiraishi *et. al.*, 1994) y puede difundirse a través de la membrana de forma dependiente de la concentración a tasas extremadamente bajas (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). Aún con un tiempo de vida de 50 μs y una distancia de difusión de aproximadamente 320 nm (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999), el O_2^- puede generar daños importantes a moléculas, células y tejidos. La SOD reduce el estado de concentración de O_2^- en varios órdenes de magnitud (Fridovich, 1986).

Peroxido de hidrógeno (H_2O_2). Debido a que el H_2O_2 no tiene carga, se difunde fácilmente a través de las membranas biológicas. El H_2O_2 causa daño significativo ya que no se limita a su punto de síntesis en la célula y puede tomar parte en otras numerosas reacciones. La exposición a H_2O_2 puede dañar directamente muchos

constituyentes celulares, como el ADN y las enzimas involucradas en la fijación de carbono (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). El H_2O_2 también está involucrado en vías como la muerte celular programada, o apoptosis (Halliwell & Gutteridge, 1999). Si el H_2O_2 es reducido, puede generar radicales HO^\bullet . Una fuente de electrones para esta reducción en sistemas biológicos es la transición de metales por la vía de Fenton (Fig. 1) (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999).



Figura 1. Reacción de Fenton catalizada por hierro (Hermes-Lima *et.al.*, 1998). Fe: hierro; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; OH^\bullet : radical hidroxilo.

Radical hidroxilo (HO^\bullet). El HO^\bullet es el más reactivo de los radicales del oxígeno. Tiene un elevado potencial para causar daño biológico porque ataca a todas las moléculas biológicas por una difusión controlada, con un tiempo de vida de 10^{-7} s y una distancia media de difusión de 4.5 nm. El HO^\bullet inicia reacciones en cadena de radicales libres, puede oxidar membranas lipídicas, y causa desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos (Asada & Takahashi, 1987; Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). La producción de HO^\bullet en sistemas biológicos es regulada por la disponibilidad de hierro ferroso. Cualquier reciclamiento de hierro, desde férrico a ferroso, por un agente reductor puede mantener la reacción de Fenton, llevando a la generación de HO^\bullet . Un excelente agente reductor es el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el cual participa en la reacción de Haber-Weiss (Fig. 2) (Cadenas, 1989; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999). Algunos otros metales, además del hierro, pueden participar en estas

reacciones de transferencia de electrones mediante ciclos entre los estados oxidados y reducidos.

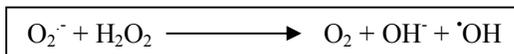


Figura 2. Reacción de Haber-Weiss (Hermes-Lima *et.al.*, 1998). $\text{O}_2^{\cdot-}$: radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogeno; O_2 : oxígeno molecular; $\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo.

En contraparte a las moléculas oxidantes, y debido a que los radicales de oxígeno son continuamente generados por una variedad de procesos celulares, todos los organismos poseen defensas antioxidantes. Según Halliwell y Gutteridge (1998), un antioxidante es toda aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, que inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato. Las defensas antioxidantes pueden clasificarse según su origen en antioxidantes exógenos: vitamina E, vitamina C, betacarotenos, flavonoides y licopenos y antioxidantes endógenos que pueden ser enzimáticos: SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), y no enzimáticos: glutatión reducido (GSH) y coenzima Q, entre otros (Venereo, 2002). La función antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, dónde y cómo se genera esa ERO, así como del daño que produce. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Gutteridge y Halliwell y 1999).

La familia de las SOD está constituida por metaloenzimas que convierten el $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios. Son cuatro tipos de enzimas: CuZnSOD, es una proteína dimérica que se encuentra principalmente en el citoplasma aunque también se ha encontrado en lisosomas, peroxisomas y núcleo;

MnSOD, que es una proteína tetramérica que se encuentra en las mitocondrias; FeSOD, proteína dimérica o tetramérica que se ubica en la matriz celular de bacterias (Hermes-Lima, 2004) y NiSOD, que está involucrada en bacterias patógenas para los humanos (Konisgberg, 2008).

La CAT y las peroxidasas transforman el H_2O_2 a agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aerobias, plantas y animales. La GPx y la glutatión S-transferasa (GST) participan en la detoxificación de xenobióticos como herbicidas, y usan al GSH como sustrato. Las peroxidasas no específicas se han encontrado en plantas y bacterias y pueden usar una amplia gama de sustratos (Spector, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1998; Gamaley & Klyubin, 1999).

Entre los agentes de bajo peso molecular de mayor importancia se encuentra el GSH en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en las mayores concentraciones intracelulares. Actúa como cofactor de las GPx para detoxificar H_2O_2 ; puede detoxificar RLO por vías no enzimáticas, por ejemplo, participa en la detoxificación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular. El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intracelular, el transporte intracelular de cobre y es cofactor de enzimas en diversas vías (Spector, 1991; Taylor *et al.*, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1998; Dalton *et al.*, 1999; Gamaley & Klyubin, 1999).

ANTECEDENTES

Lesser (2006) menciona que el estrés oxidativo puede inducir daño a lípidos, proteínas y ADN; muchos padecimientos de interés clínico y procesos de envejecimiento están relacionados con éste fenómeno. La producción de ERO es constante en los océanos del mundo y el estrés oxidativo es un signo importante en la respuesta a diferentes tipos de estrés en organismos marinos, como estrés térmico, exposición a radiación ultravioleta o exposición a diversos tipos de contaminantes. Entre éstos, elementos traza o metales pesados, los cuales, según Sigaud-Kutner *et al.* (2003), dependiendo de su estado de oxidación, pueden ser altamente reactivos y, en consecuencia, tóxicos para muchos organismos. El efecto tóxico de los metales pesados parece estar relacionado con la producción de ERO dando como resultado un desbalance en el estado redox celular. Estos autores determinaron que, por ejemplo, las algas responden a los metales pesados por inducción de diferentes antioxidantes, como enzimas, y la síntesis de componentes de bajo peso molecular. Ya sea a un nivel menor o crónico, el alga acumula metales pesados que pueden pasar a otros organismos de la cadena trófica como moluscos, crustáceos y peces.

Existen diversos estudios a lo largo de diferentes años acerca de metales pesados. Por ejemplo, el trabajo de Watling *et al.* (1981), quienes analizaron la concentración de Hg en carne de tiburón mako por su importancia dentro de la industria pesquera en Sudáfrica, estableciendo que la variación en las concentraciones de Hg obtenidas (1.91-2.11 µg/g) se relacionan con la longitud y masa corporal de los individuos indicando que un tiburón capturado en la zona, con una longitud total de 2 m o más, muy probablemente rebase el límite máximo permitido en la concentración de Hg (1µg/g). Así mismo Núñez-Nogeira *et al.* (1998) determinaron la concentración

promedio (peso seco) de Hg en branquias (0.66 mg/kg), cerebro (0.45 mg/kg), hígado (0.16 mg/kg), músculo (0.63 mg/kg), páncreas (0.51 mg/kg) y riñón (0.42 mg/kg) de cazón (*Rhizoprionodon terraenovae*) del Golfo de México para determinar el riesgo por el consumo de la carne de ésta especie, llegando a la conclusión de que es necesario consumir 280 g diarios de carne de tiburón con la concentración promedio obtenida para llegar a una exposición peligrosa. Pero, si la concentración es más alta, al ser consumida por un cierto periodo de tiempo, el riesgo de exposición al Hg será más alto. Turoczy *et al.* (2000) determinaron las concentraciones de metales en tiburones de aguas profundas del sureste de Australia (*Deania calcea*, *Centroscymnus crepidater* y *Centroscymnus owstonii*) encontrando diferencias significativas entre las especies para As, Cd, Hg y zinc (Zn); además, los niveles máximos permitidos de As y Hg (1mg/kg) se exceden en las tres especies y se concluyó que el consumo semanal de 400 g de cualquiera de éstas especies de tiburón podría resultar en sobrepasar la ingesta semanal tolerable establecida por la FAO. Gomes *et al.* (2004) mencionan que el Hg es capaz de biomagnificarse a lo largo de la cadena alimenticia y que los peces carnívoros tienden a acumular altas concentraciones de este elemento. El promedio total en las concentraciones de Hg total en muestras de músculo de *Carcharhinus signatus* (hembras, 1697 µg/kg; machos, 1787 µg/kg) son mayores al límite máximo permitido para el consumo humano establecidas por el ministro brasileño de salud para peces carnívoros (1000 µg/kg, peso húmedo).

Núñez-Nogueira (2005) evaluó las concentraciones de As, Cd, Cr, cobre (Cu), hierro (Fe), Hg, manganeso (Mn), Pb, selenio (Se) y Zn en branquias, hígado, cerebro y músculo de *Carcharhinus limbatus* y *Rhizoprionodon terraenovae* del estado de Veracruz y de varios locales de “La Nueva Viga” en México D. F., encontrando que

dependiendo del tejido, el metal se acumula en menor o mayor grado, probablemente a causa de las necesidades metabólicas y de las características fisicoquímicas de cada elemento, asociadas de igual forma a los mecanismos de desintoxicación. Con base en los niveles detectados de As (3.68 $\mu\text{g/g}$), Cd (0.34 $\mu\text{g/g}$), Hg (0.76 $\mu\text{g/g}$) y Pb (3.31 $\mu\text{g/g}$) en *R. terraenove* y As (3.16 $\mu\text{g/g}$), Cd (0.35 $\mu\text{g/g}$), Hg (3.33 $\mu\text{g/g}$) y Pb (2.51 $\mu\text{g/g}$) en *C. limbatus* en músculo para ambos casos, se determinó que no existía riesgo inmediato para el consumo de la carne de estas especies. Macías-Zamora *et al.* (2007) encontraron niveles elevados de metales traza como Cd, cobalto (Co), Cu, Mn, níquel (Ni), Pb, Zn y Fe en pastos marinos de las lagunas San Ignacio y Ojo de liebre en la costa central del Pacífico de Baja California, México. Los pastos marinos pueden incorporar estos elementos y redireccionarlos hacia otros organismos. Así mismo, observaron que varias de las concentraciones de metales en sedimentos, por ejemplo el Pb (9.5 $\mu\text{g/g}$ en Ojo de Liebre; 18 $\mu\text{g/g}$ en San Ignacio) son más altas que las ya consideradas elevadas para el sur de California.

En el caso particular del estado de Baja California Sur existen depósitos minerales de oro (Au), plata (Ag), Cu, Zn y fósforo (P), los cuales han sido explotados desde el siglo XIX (Shumilin, *et al.*, 2000). Se ha determinado que las concentraciones de Cd en mejillones de Baja California Sur (2.7-70.2 $\mu\text{g/g}$ peso húmedo; Gutierrez-Galindo *et al.*, 1999) son más altas que en la biota de las grandes áreas urbanizadas de California en Estados Unidos (0.2-0.9 $\mu\text{g/g}$ peso húmedo; Cohen *et al.*, 2001); y que las concentraciones de Cd en plancton de Baja California son aproximadamente 3 veces mayores que en el plancton colectado en otras regiones del Pacífico noreste (Martin y Broenkow, 1975). También se sabe que la alta variabilidad regional en las concentraciones de metales pesados en las aguas de las costas de Baja California pueden

ser atribuidas a dos causas, naturales (arrastre de compuestos y su mezcla en la columna de agua) y antropogénicas (principalmente urbanización) (Martin & Broenkow, 1975, Sañuda-Wihelmy & Flegal 1996; Méndez *et al.*, 1998; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Shumilin *et al.*, 2001). Sin embargo, la relativa contribución de estos varios orígenes de metales pesados en la región es pobremente entendida, así como sus efectos sobre la salud humana y ecológica.

HIPÓTESIS

La presencia de especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido, inducida por posible contaminación por elementos traza (Pb, Cd, Hg y As) propiciará un aumento en los indicadores de daño oxidativo en diferentes tejidos de tiburón, de acuerdo a la concentración del metal y su toxicidad individual.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el estrés oxidativo asociado a elementos traza como Pb, Cd, Hg y As en diferentes tejidos del tiburón mako.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la concentración de Pb, Cd, Hg y As en músculo, hígado y riñón de tiburón mako.

Determinar la producción de radical superóxido como indicador de la presencia de ERO de oxígeno en músculo, hígado y riñón de tiburón mako.

Determinar los niveles de peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas como indicadores del daño oxidativo en músculo, hígado y riñón de tiburón mako.

Determinar la actividad de las principales enzimas antioxidantes, SOD, CAT, GPx, GR y GST, como indicador de las defensas antioxidantes en músculo, hígado y riñón de tiburón mako.

Correlacionar los niveles de los indicadores de estrés oxidativo con la concentración de elementos traza y su grado de toxicidad en músculo, hígado y riñón de tiburón mako.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Isla Magdalena (Fig. 3) forma parte del complejo lagunar de Bahía Magdalena-Bahía Almejas (BM-BA) que es uno de los ecosistemas lagunares con mayor diversidad y atractivo ecoturístico y pesquero en el Estado de Baja California Sur, México. Este complejo lagunar se localiza en la costa sur-occidental de la península de Baja California Sur ($24^{\circ} 16' N$ y $25^{\circ} 45' N$ y $111^{\circ} 20' W$ y $112^{\circ} 18' W$). Este sistema tiene tres zonas geomorfológicamente distintas: Zona de Canales (137 km^2) ubicada al noroeste; Bahía Magdalena (883 km^2) situada en la parte central del complejo; y Bahía Almejas (370 km^2) situada al sureste (Álvarez-Borrego *et. al.*, 1975; Hernández-Rivas *et. al.*, 1993).

El sistema lagunar BM-BA es uno de los ecosistemas costeros mexicanos, que resulta ser de considerable importancia para el desarrollo socioeconómico regional (Mathews, 1975), no sólo por su considerable extensión (aprox. 1100 km^2) sino también por la alta productividad que prevalece durante la mayor parte del ciclo anual (Nienhuis & Guerrero, 1985; Gárate-Lizárraga & Siqueiros-Beltrones, 1998).

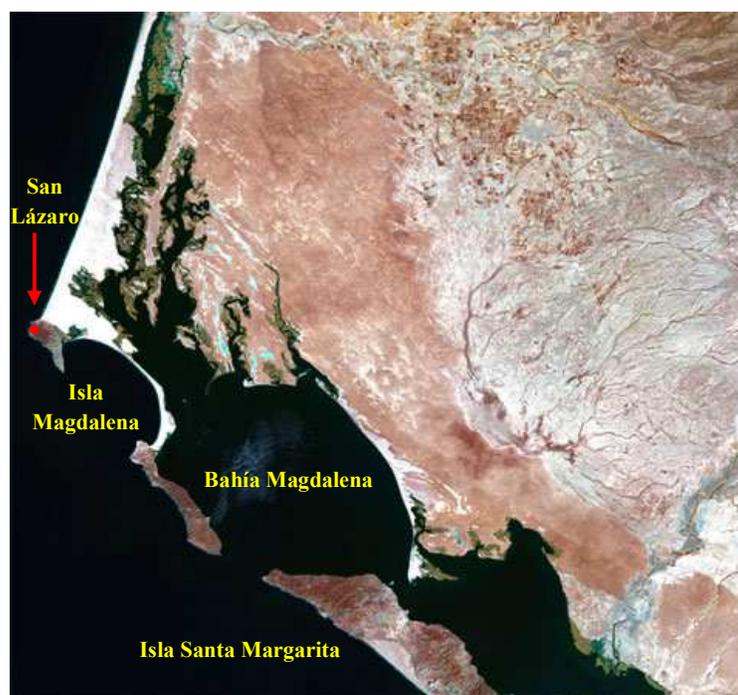


Figura 3. Área de estudio.

Colecta de muestras

Se colectaron muestras de hígado, riñón y músculo de 20 individuos de tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) (Fig. 4) en el campamento pesquero de San Lázaro ubicado en Isla Magdalena, Baja California Sur en Mayo de 2008. Los organismos capturados por los pescadores fueron llevados a la costa, donde se determinó su talla y sexo. Se tomaron aproximadamente 5 g de cada uno de los tejidos por individuo y se mantuvieron en hielo durante su traslado al laboratorio donde fueron almacenadas y congeladas hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.



Figura 4. Ejemplar de tiburón mako.

Análisis Bioquímicos

Presencia de Elementos traza

Para hacer la determinación de Pb, Cd, Hg y As las muestras fueron digeridas en una mezcla de 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) y 5 mL de agua desionizada con ayuda de un horno de microondas (CEM MARS 5x, USA). El digerido obtenido fue aforado a 50 mL con agua desionizada. Aproximadamente 5 mL fueron destinados para la determinación de Pb y Cd por medio de espectrofotometría de absorción atómica en un espectrofotómetro (GBC Avanta, Australia); el resto fue dividido en dos partes para la determinación de As y Hg. Al digerido utilizado para estos dos últimos elementos se le dio un tratamiento previo a la determinación. Para el caso de As, se le agregó ácido clorhídrico (HCl) y yoduro de potasio (KI), utilizando bromohidruro de sodio (Na HB_4) como agente reductor, finalmente la concentración de As en la muestra fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica a través de la generación de hidruros por

flama. En el caso del Hg, para acelerar el estado de oxidación se le agregó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y HNO_3 , la concentración se determinó por espectrometría de absorción atómica mediante la generación de hidruros en vapor frío (Loon, 1985).

Indicadores de Estrés Oxidativo

Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

Determinación de Radical Superóxido

La producción endógena de $O_2^{\cdot -}$ se cuantificó mediante un método fotocolorimétrico indirecto y discontinuo, siguiendo la reducción de ferricitocromo C por el $O_2^{\cdot -}$ durante un intervalo de tiempo fijo (Markert *et al.*, 1984; Drossos *et al.*, 1995). Se tomaron 100 mg de tejido húmedo y se colocaron en 1 mL de solución amortiguadora de Krebs fosfato (0.11 M NaCl, 0.0047 M KCl, 0.012 M $MgSO_4$, 0.012 M NaH_2PO_4 , 0.025 M $NaHCO_4$ y 0.001 M glucosa). Se adicionó citocromo C (15 μ M) a cada muestra y se incubó en un baño de agua a 37° C con agitación por 15 minutos. Posteriormente se retiraron las muestras del baño y se les agregó N-etilmaleimida (3mM) para detener la reducción del citocromo C. Se centrifugó a 3000 rpm a 4° C por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a una celda y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis, Reino Unido) a 550nm. Los blancos de cada muestra se realizaron retirando el remanente del sobrenadante en los tubos (quedando únicamente el tejido) y adicionando solución amortiguadora de Krebs, N-etilmaleimida y citocromo C, para posteriormente incubar a 37°C, centrifugar a 3000 rpm a 4° C durante 10 minutos y medir la absorbancia del sobrenadante a 550 nm. Los datos se expresaron en nmol $O_2^{\cdot -}$ por mg de proteína por minuto.

Daño Oxidativo

Determinación de niveles de peroxidación de lípidos (TBARS)

Se cuantificó la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un indicador de la peroxidación lipídica, siguiendo el método propuesto por Okhawa (1979) y modificado por Persky (2000). Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de lípidos de la membrana celular reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar malondialdehído (MDA), que es un pigmento rosa cristalino con absorción máxima a 532-535 nm (Persky A.M. *et al.*, 2000). Se tomaron 100 mg de tejido y se homogenizaron en frío en 2 mL de solución para homogenizar. Se tomaron 250 μ L del homogenizado y se incubaron en un baño de agua a 37° C con agitación durante 15 minutos, una vez transcurrido este tiempo se colocaron en un baño de hielo, se adicionó ácido tricloroacético al 20% (en HCl 1M) y TBA al 1% . Las muestras se colocaron en baño de agua con agitación a 90° C durante 10 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Se desechó el precipitado y se leyó el sobrenadante. Se corrió una curva estándar de 1-bis tetraetoxipropano (TEP) en paralelo con las muestras y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman coulter DU 800, USA) calibrado a 560 nm. La concentración de TBARS se calculó a partir de la curva estándar y se expresó en nmoles de TBARS por mg de proteína soluble.

Determinación de proteínas carboniladas

Los derivados carbonilados de las proteínas se forman a partir de reacciones en las que interactúan los aldehídos procedentes de la lipoperoxidación o de la oxidación de carbohidratos con proteínas. La cuantificación de estos grupos de proteínas carboniladas se hace derivándolos con 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH),

precipitándolos con ácido tricloroacético (TCA) y midiendo la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm (Levine *et al.*, 1990; Stadtman & Levine, 2000). Se tomaron 100 mg de tejido y se homogenizaron (1:20 peso volumen) en ácido sulfosalicílico al 5%. El volumen del homogenizado fue dividido en dos partes (mínimo 400µL cada una) y colocado en tubos ependorff etiquetados como muestra y blanco. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 15000 rpm a 4° C y finalmente se desechó el sobrenadante.

En la campana de extracción, se adicionaron, a la muestra 500 µL de DNPH y al blanco 500 µL de HCl, se agitaron en el vórtex durante 40 segundos y se incubaron una hora a temperatura ambiente agitando en el vórtex durante 40 segundos cada 15 minutos. A cada tubo se adicionó 500 µL de TCA y se centrifugaron 5 minutos a 15000 rpm a temperatura ambiente; se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol-acetato de etilo (1:1), se centrifugó una vez más por 5 minutos a 15000 rpm a temperatura ambiente; se repitió tres veces este procedimiento de lavado y, finalmente, se adicionó a cada tubo 1 mL de clorato de guanidina, se agitó en el vórtex y se incubó en un baño de agua a 37° C durante 15 minutos; se centrífugo por 5 minutos a 15000 rpm a temperatura ambiente. Tanto para muestras como blancos se colectó el sobrenadante (mínimo 800 µL) en celdas de plástico. Se hizo un barrido entre 340 y 410 nm y se registró la absorbancia máxima a la longitud de onda máxima en un espectrofotómetro Beckman coulter DU 800. Los resultados obtenidos se expresaron en µm de proteínas carboniladas por gramo de tejido (Levine *et al.*, 1990; Stadtman & Levine, 2000).

Actividad de enzimas antioxidantes

Para la determinación de actividades enzimáticas se pesaron 100 mg de tejido por muestra y se homogenizaron en frío en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5). Se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C, recuperando el sobrenadante y procediendo con los análisis enzimáticos a una temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C en el laboratorio.

Superóxido Dismutasa (SOD)

Para medir la actividad enzimática de SOD se utilizó el método propuesto por Suzuki (2000) generando $O_2^{\cdot -}$ de manera constante mediante el sistema xantina/xantina oxidasa. El $O_2^{\cdot -}$ al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce, formando así un compuesto llamado formazán cuyo cambio en la absorbancia es detectado cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reacción de $O_2^{\cdot -}$ con el NBT. En una celda de plástico se mezclaron: solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), xantina oxidasa (1 U/ml; sulfato de amonio 2 M) y la muestra o solución para homogenizar en el caso del blanco. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos en un espectrofotómetro (Beckman coulter DU 800) a 560 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de SOD por mg de proteína.

Catalasa (CAT)

Se determinó la actividad enzimática de CAT midiendo el decremento en la concentración de H_2O_2 a 240 nm, según la metodología propuesta por Aebi (1984). Las muestras se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5). Los reactivos se mantuvieron en un baño de agua a 25° C. La solución de trabajo se preparó

en fresco utilizando H_2O_2 (20 M) y solución amortiguadora de fosfatos (100 M). En una celda de cuarzo se mezcló solución de trabajo con la muestra y se registró el cambio en la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante 3 minutos en un espectrofotómetro (Beckman coulter DU 800) a 240 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de CAT por mg de proteína. Una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

Glutación Peroxidasa (GPx)

Para medir la actividad de la enzima GPx se utilizó el método propuesto por Folh  y Günzler (1984) midiendo el decremento de dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado reducido (NADPH) al mantener constantes los niveles de GSH. En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), solución de azida de sodio (20 mM), glutatión reductasa (15 U/ml), NADPH (1.5 mM), agua desionizada fría, GSH (250 mM), la muestra, H_2O_2 (10 mM) y se registró el cambio en la absorbancia cada 3 segundos durante 40 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis) a 340 nm. Los resultados se expresaron en U por mg de proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de GSH a Glutatión oxidado (GSSG) por minuto.

Glutatión Reductasa (GR)

La actividad catalítica de la enzima GR se determinó midiendo el decremento en la absorbancia durante la oxidación del NADPH, siguiendo la metodología propuesta por Goldberg y Spooner (1987). Todas las soluciones se mantuvieron en hielo a excepción de la solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2). En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), NADPH (2mM), agua desionizada, la muestra, GSSG (10 mM) y se registró el

cambio en la absorbancia durante 60 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis) a 340 nm. Los resultados se expresaron en U por mg de proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de GSSG a GSH por minuto.

Glutación-S-Transferasa (GST)

La actividad de la GST se determinó midiendo la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenzeno a 340 nm, como producto de la unión del GSH con 1-cloro 2, 4-dinitrobenzeno (CNDB) siguiendo la metodología propuesta por Habig y Jakoby (1981). En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.0), GSH 10 mM, EDTA 60 mM, CNDB 10 mM y 10 μ L de la muestra y se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos en un espectrofotómetro (Beckman coulter DU 800) a 340 nm. Los resultados se expresaron en U por mg de proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 μ mol de CNDB por minuto.

Determinación de proteínas totales.

Para estandarizar los datos se determinó la cantidad de proteínas solubles utilizando un kit comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. E. U. A.) adaptado a microplaca, basándose en el método descrito por Bradford (1976). Se utiliza el colorante azul de Coomassie® que, en respuesta a la concentración de proteínas, reacciona con los residuos de amino ácidos básicos, especialmente arginina, presentes en la muestra. Las muestras fueron diluidas 1:100 con solución amortiguadora de fosfatos (50mM, pH 7.5, EDTA 1 mM). Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (ASB) en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.2 mg/mL. En cada pozo de una microplaca se mezclaron agua destilada, colorante de Bradford y la muestra

o albúmina en el caso de la curva estándar. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 590 nm en un analizador semiautomático (Microlab 300, Vital Scientific, Netherlands). Los resultados se expresan en mg de proteína por mL.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para determinar si existen diferencias significativas entre músculo, hígado y riñón del tiburón mako en las concentraciones de los elementos traza, el daño oxidativo y la actividad enzimática antioxidante se realizaron análisis de varianza de un factor, con la prueba a posteriori de Fisher o diferencia mínima significativa (LSD) (Durán *et. al.*, 2003). Para detectar diferencias significativas entre hembras y machos en cada uno de los tejidos estudiados en las concentraciones de elementos traza, daño oxidativo y actividad enzimática antioxidante, se realizaron pruebas de hipótesis T de Student (Durán *et. al.*, 2003). Para obtener las relaciones de elementos traza con daño oxidativo y actividad enzimática antioxidante se realizaron matrices de correlación de Spearman con el programa STATISTICA 7.

RESULTADOS

De los 20 individuos colectados, 11 fueron hembras y 9 machos con tallas que van desde los 89 hasta los 249 cm (Fig. 5). La talla promedio para hembras fue de 134 cm y para machos de 116 cm.

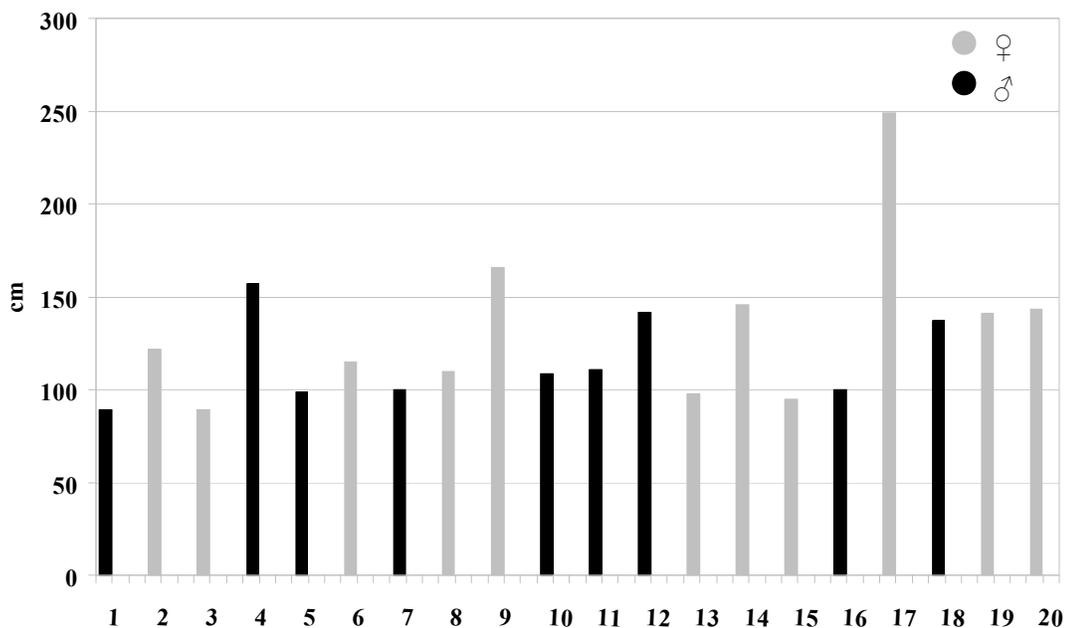


Figura 5. Talla y sexo de los individuos de tiburón mako.

Concentración de elementos traza

Se determinó la concentración de los elementos traza (Pb, Cd, Hg y As) en cada uno de los tejidos estudiados (músculo, hígado y riñón) del tiburón mako. Se encontró Pb en 15 de los 20 individuos estudiados, de los cuales, 5 tuvieron Pb en los tres tejidos, 7 lo presentaron en dos tejidos (principalmente músculo y riñón) y 3 individuos presentaron Pb sólo en un tejido (músculo). En músculo se observó una mayor concentración promedio de Pb con 0.29 mg/kg, seguido del riñón con 0.27 mg/kg y,

finalmente, el hígado con 0.14 mg/kg (Fig. 6). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres tejidos ($p>0.05$).

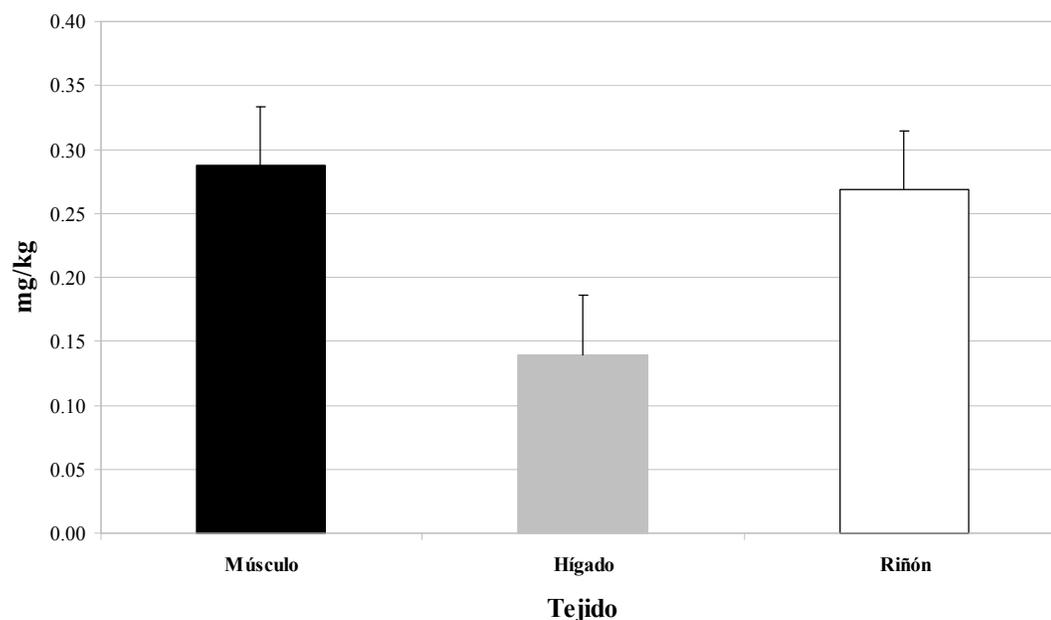


Figura 6. Concentración de plomo en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $N=20$, $p>0.05$.

Aunque no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre sexos por tejidos, para el músculo, las hembras presentaron una menor concentración de Pb que los machos con una concentración de 0.28 mg/kg ($p>0.05$); mientras que para hígado y riñón las hembras presentaron valores más altos con respecto a los machos con valores de 0.15 y 0.31 mg/kg, respectivamente ($p>0.05$) (Fig. 7).

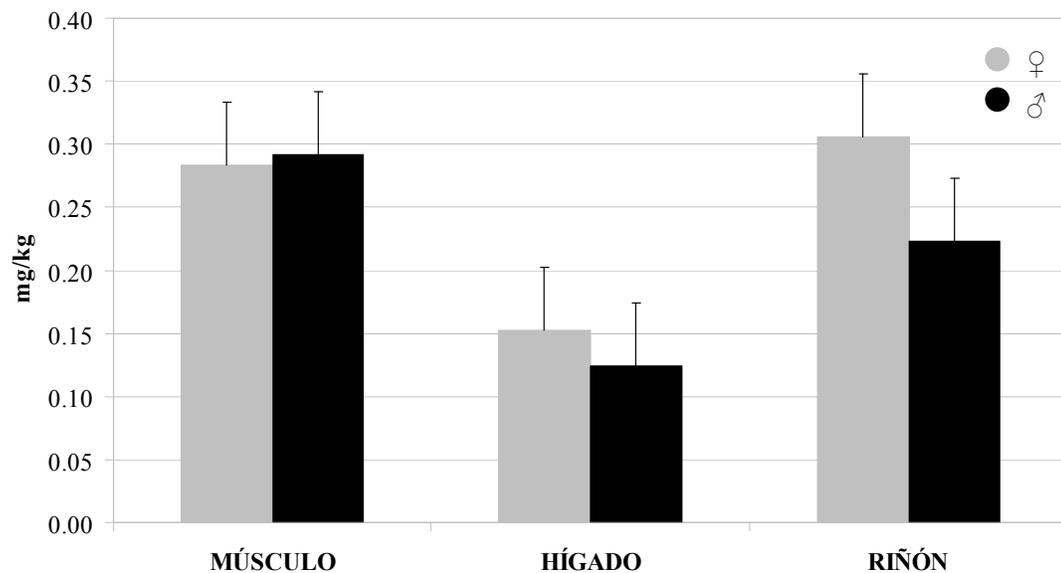


Figura 7. Concentración de plomo en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $p>0.05$.

El Cd, se encontró en 16 de los individuos colectados, de los que sólo 5 presentan el metal en los tres tejidos, 8 presentan el metal en dos tejidos (específicamente en hígado y riñón), y 3 individuos presentaron Cd en un tejido (riñón). Se observó una menor concentración de Cd en músculo de tiburón mako (0.06 mg/kg) en comparación con hígado (1.12 mg/kg, $p<0.05$) y riñón (0.97 mg/kg, $p<0.05$) (Fig. 8). No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre hembras y machos para ninguno de los tejidos analizados (Fig. 9).

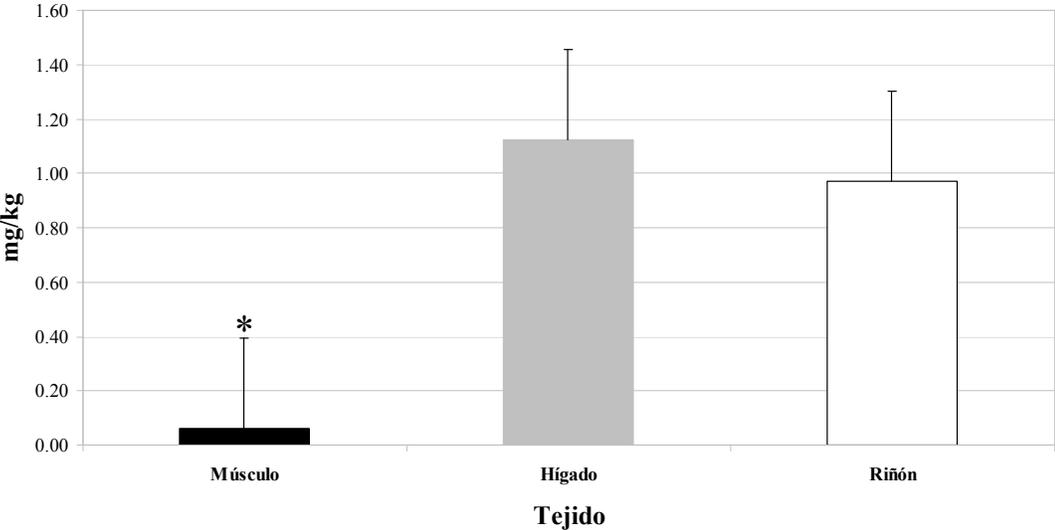


Figura 8. Concentración de cadmio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, *p<0.05.

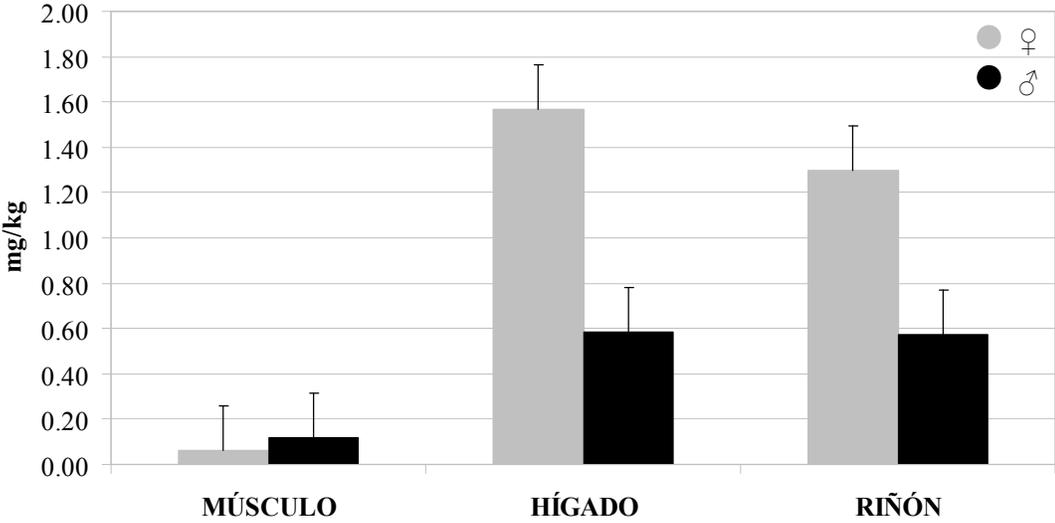


Figura 9. Concentración de cadmio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. n ♀=11, n ♂=9, p>0.05.

El mercurio (Hg) se encontró en todos los organismos muestreados, de los cuales 5 tuvieron el metal en los tres tejidos, 10 registraron Hg para dos tejidos principalmente en músculo y riñón, y 5 individuos sólo presentaron Hg en un tejido (músculo). El músculo presentó una mayor concentración de Hg con un valor de 404.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en comparación con el hígado (53.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.05$) y el riñón (47.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.05$) (Fig. 10).

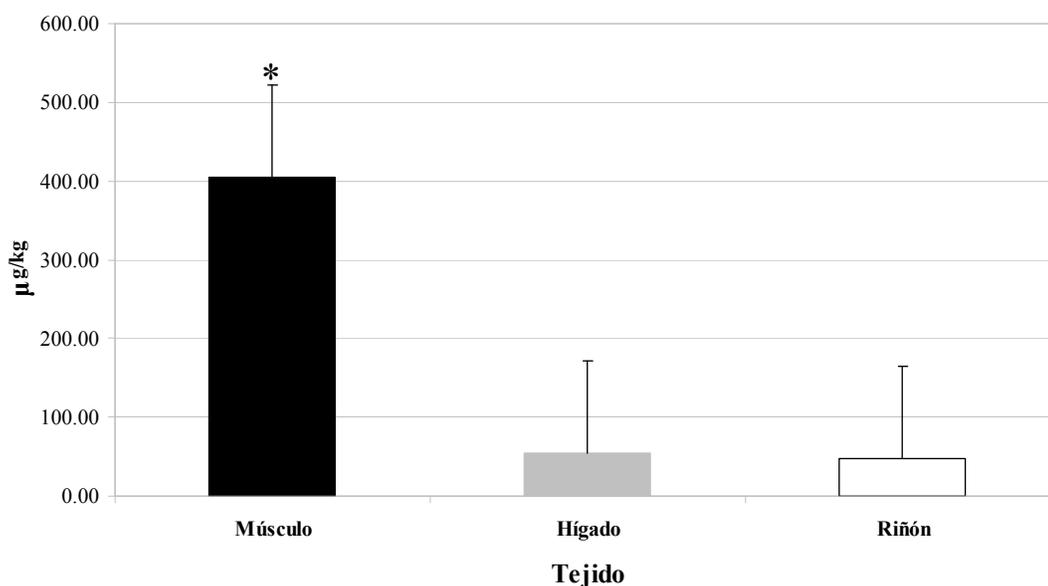


Figura 10. Concentración de mercurio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $N = 20$, $*p < 0.05$.

Se observó en las hembras una mayor concentración de Hg en músculo (491.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e hígado (80.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en comparación con los machos (músculo 298.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.05$; hígado 21.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.05$) (Fig. 11). La concentración de Hg en riñón en las hembras fue menor (42.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en los machos (54.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0.05$) (Fig. 11).

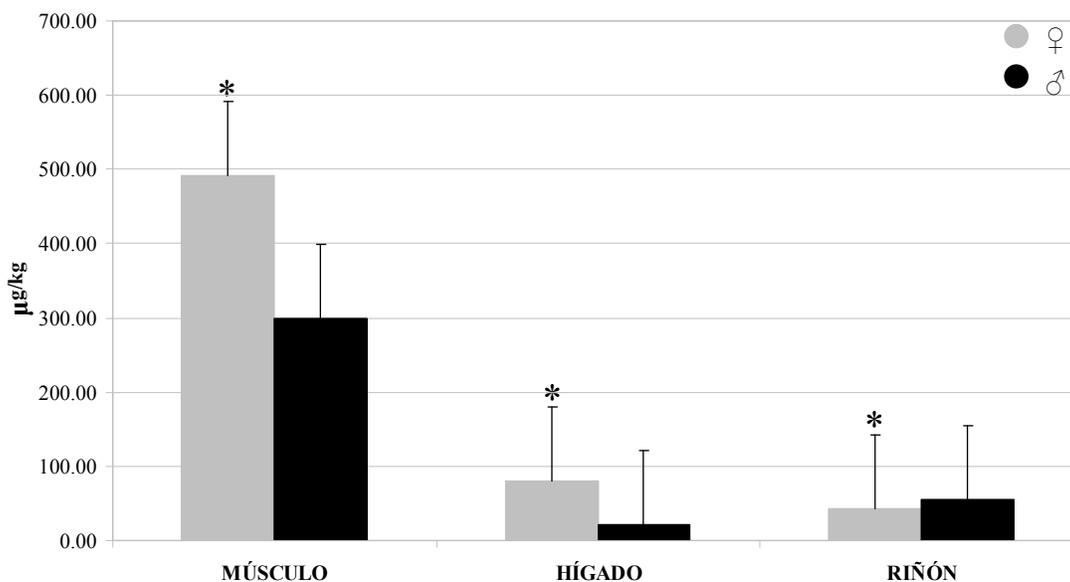


Figura 11. Concentración de mercurio en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. n ♀=11, n ♂=9, *p<0.05.

El As se encontró en sólo 10 de los individuos muestreados, de los cuales ninguno presentó el metaloide en los tres tejidos, 4 lo presentaron en dos tejidos (principalmente en músculo y riñón) y 6 en un tejido (principalmente en músculo o hígado). Las concentraciones registradas fueron las siguientes, el valor más alto es para el hígado con 27.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$, seguido del músculo con 14.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y finalmente el riñón con 6.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Fig. 12). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tejidos para este metal.

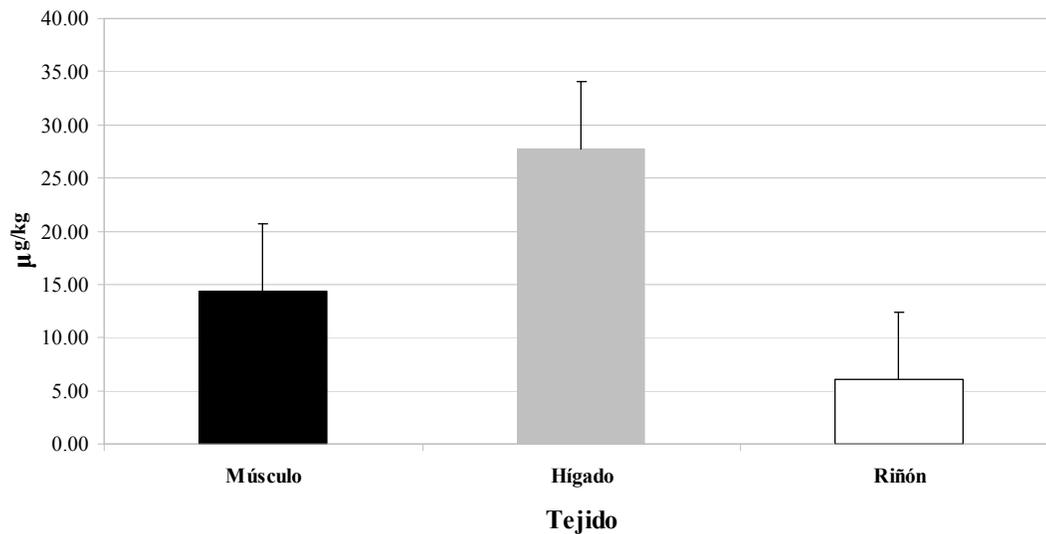


Figura 12. Concentración de arsénico en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. N= 20, p>0.05.

Se observó que para el músculo, las hembras (1.54 µg/kg) presentaron un valor más bajo que los machos (30.07 µg/kg, p<0.05); en el hígado las hembras (30.82 µg/kg) tuvieron mayor concentración de As que los machos (24.04 µg/kg, p<0.05) y para el riñón las hembras (5.13 µg/kg) presentaron menos As que los machos (7.09 µg/kg, NS) (Fig. 13).

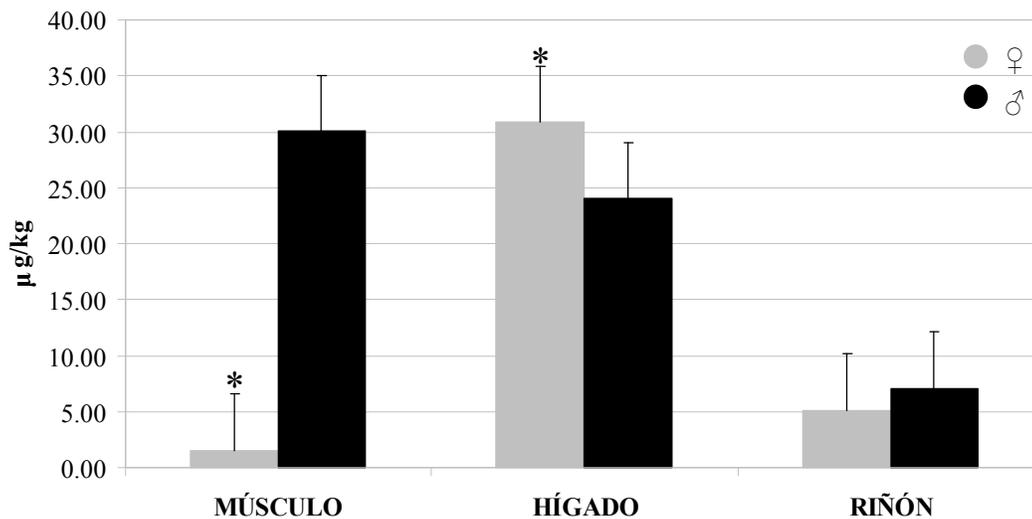


Figura 13. Concentración de arsénico en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p<0.05$.

Tabla I. Concentraciones de elementos traza en tejidos de hembras y machos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

Metal	Tejido	(peso húmedo)	(peso húmedo)	
			Hembras (n=11)	Machos (n=9)
Plomo (mg/kg)	Músculo	0.29 ± 0.07	Hembras (n=11)	0.28 ± 0.10
			Machos (n=9)	0.29 ± 0.10
	Hígado	0.14 ± 0.07	Hembras (n=11)	0.15 ± 0.10
			Machos (n=9)	0.12 ± 0.10
	Riñón	0.27 ± 0.07	Hembras (n=11)	0.31 ± 0.10
			Machos (n=9)	0.22 ± 0.10
Cadmio (mg/kg)	Músculo	0.06 ± 0.03	Hembras (n=11)	0.06 ± 0.04
			Machos (n=9)	0.12 ± 0.07
	Hígado	1.12 ± 0.65	Hembras (n=11)	1.56 ± 1.17
			Machos (n=9)	0.58 ± 0.27
	Riñón	0.97 ± 0.29	Hembras (n=11)	1.30 ± 0.51
			Machos (n=9)	0.57 ± 0.18

Metal	Tejido	(peso húmedo)	(peso húmedo)	
Mercurio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Músculo	404.51 \pm 55.41	Hembras (n=11)	491.29 \pm 87.56
			Machos (n=9)	298.44 \pm 43.97
	Hígado	53.79 \pm 36.18	Hembras (n=11)	80.55 \pm 64.83
			Machos (n=9)	21.07 \pm 15.65
	Riñón	47.71 \pm 18.98	Hembras (n=11)	42.15 \pm 33.69
			Machos (n=9)	54.51 \pm 21.67
Arsénico ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Músculo	14.38 \pm 8.04	Hembras (n=11)	1.54 \pm 1.03
			Machos (n=9)	30.07 \pm 16.85
	Hígado	27.77 \pm 15.35	Hembras (n=11)	30.82 \pm 20.82
			Machos (n=9)	24.04 \pm 24.04
	Riñón	6.01 \pm 3.41	Hembras (n=11)	5.13 \pm 5.13
			Machos (n=9)	7.09 \pm 4.60

Indicadores de Estrés oxidativo

Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

Producción de Radical Superóxido

Se determinó la producción de radical superóxido (O_2^-) en hígado, riñón y músculo del tiburón mako. Aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tejidos, la menor producción de O_2^- se encontró en el riñón con 0.02 nmol/mg. min seguido del riñón con 0.04 nmol/mg. min de O_2^- y finalmente al hígado con 0.08 nmol/mg. min de O_2^- (Fig. 14).

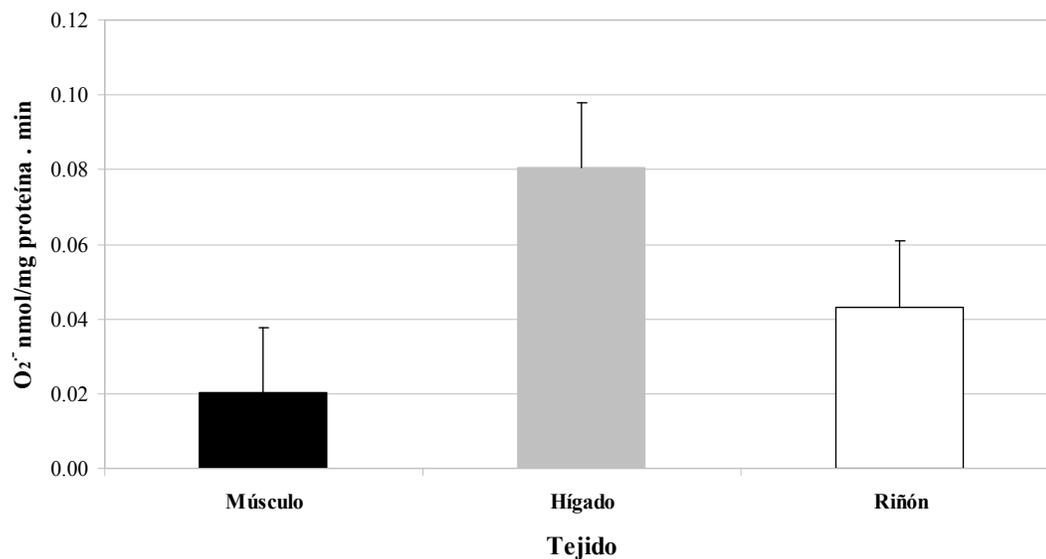


Figura 14. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$, nmol/mg proteína . min) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, $p>0.05$.

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre sexos para ningún tejido; en músculo ambos grupos presentan un valor de 0.02 nmol/mg. min de $O_2^{\cdot-}$, en hígado las hembras presentan un valor de 0.01 y los machos 0.16 nmol/mg. min de $O_2^{\cdot-}$, y en el riñón 0.04 nmol/mg. min de $O_2^{\cdot-}$ para hembras y machos. (Fig. 15).

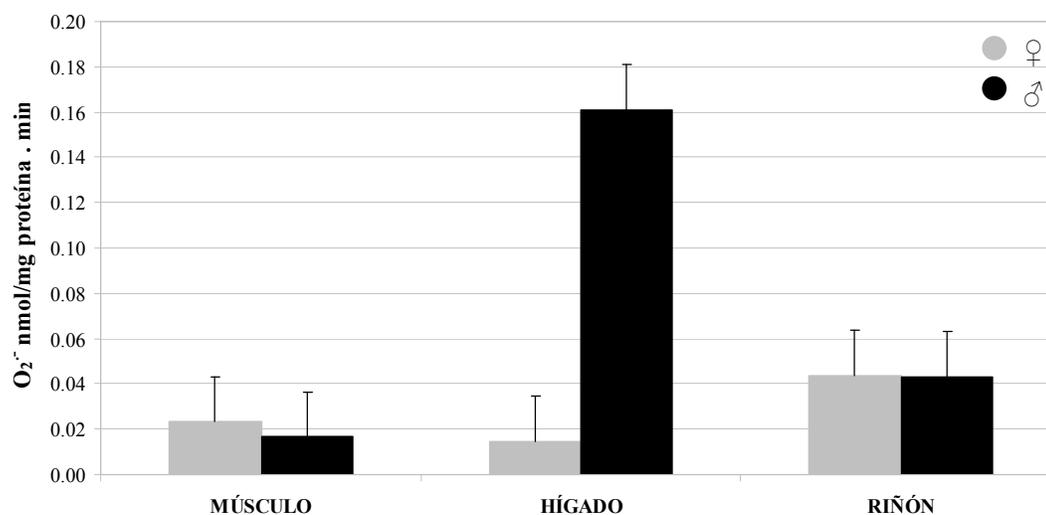


Figura 15. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$, nmol/mg proteína . min) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. n ♀=11, n ♂=9, $p>0.05$.

Daño oxidativo

Peroxidación de Lípidos (TBARS)

Se encontró que el hígado presentó un mayor daño a lípidos (475.60 nmol TBARS/mg proteína, $p < 0.05$), seguido del riñón (154.91 nmol TBARS/mg proteína, $p > 0.05$) y el músculo (52.76 nmol TBARS/mg proteína, $p > 0.05$) (Fig. 16).

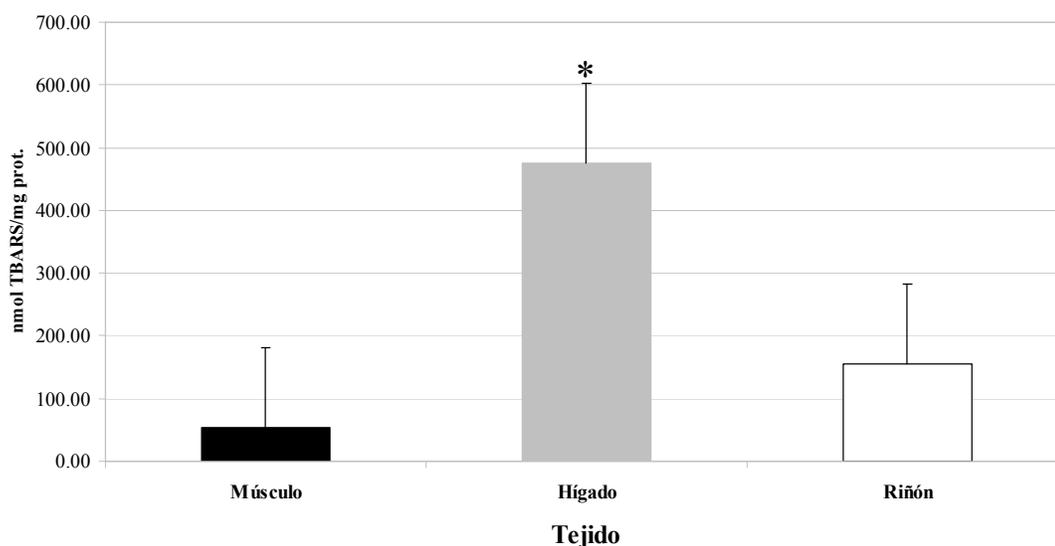


Figura 16. Producción de lípidos peroxidados (nmol TBARS/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, * $p < 0.05$.

En músculo las hembras presentan un valor de 63.33 nmol TBARS/mg proteína, los machos 39.85 nmol TBARS/mg proteína ($p < 0.05$). En el hígado las hembras registraron un valor de 144.90 nmol TBARS/mg proteína, los machos 879.79 nmol TBARS/mg proteína ($p < 0.05$) y en el riñón las hembras obtuvieron 210.68 nmol TBARS/mg proteína y los machos machos 86.75 nmol TBARS/mg proteína ($p < 0.05$) (Fig. 17).

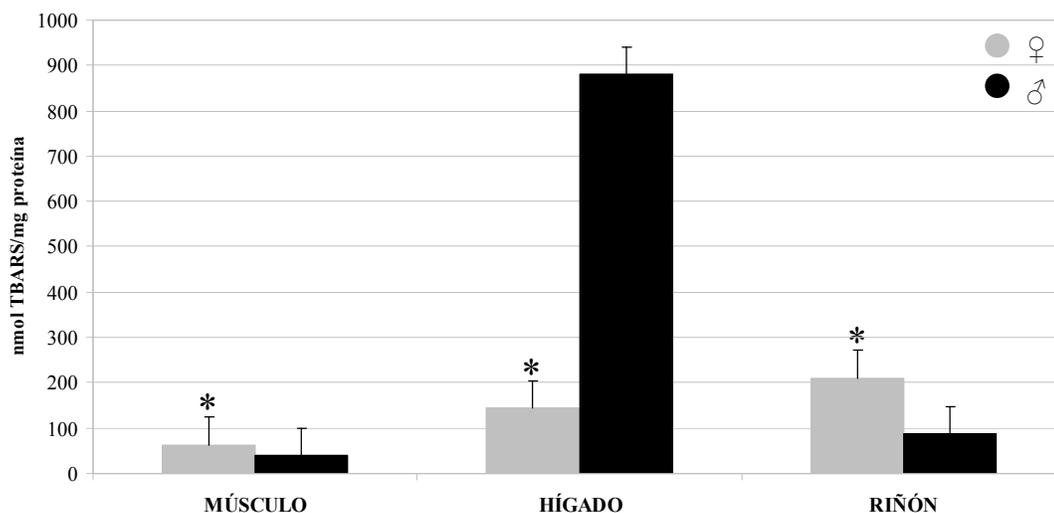


Figura 17. Producción de lípidos peroxidados (nmol TBARS/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. n ♀=11, n ♂=9, *p<0.05.

Proteínas carboniladas

Se encontró el mayor daño oxidativo a proteínas en el hígado (104.23 μ m Prot. Carb./gr tejido, p>0.05), en comparación con el riñón (71.90 μ m Prot. Carb./gr tejido, p>0.05) y el músculo (55.56 μ m Prot. Carb./gr tejido, p<0.05) (Fig. 18).

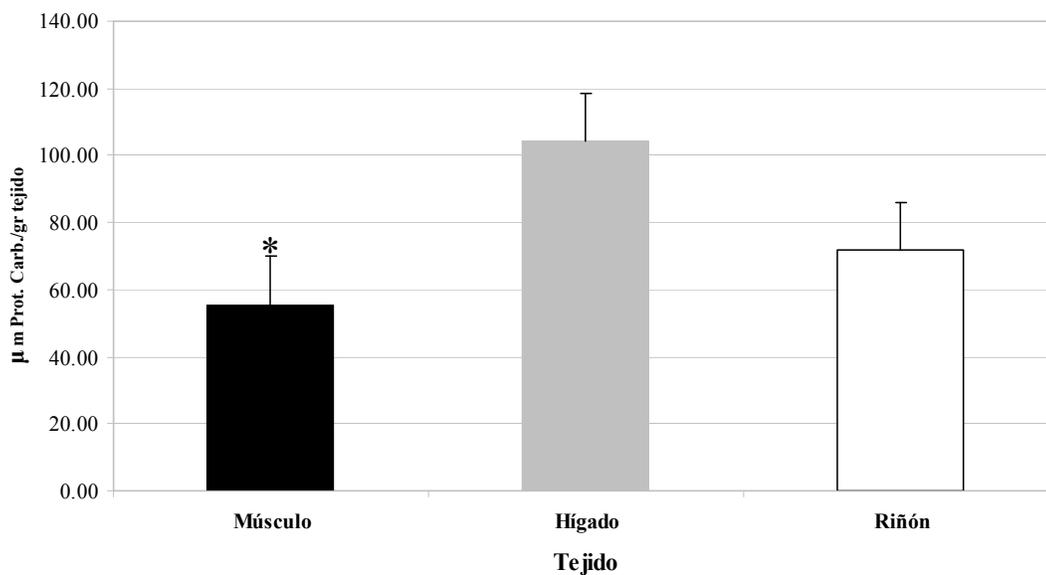


Figura 18. Producción de proteínas carboniladas (μ mol/gr. tejido) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, *p<0.05.

De igual forma, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sexos para los tres tejidos; músculo de hembras 65.56 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$, machos 43.33 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$ ($p < 0.05$); hígado hembras 90.32 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$, machos 121.23 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$ ($p < 0.05$); riñón hembras 58.28 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$, machos 88.55 $\mu\text{m Prot. Carb./gr tejido}$ ($p < 0.05$) (Fig. 19).

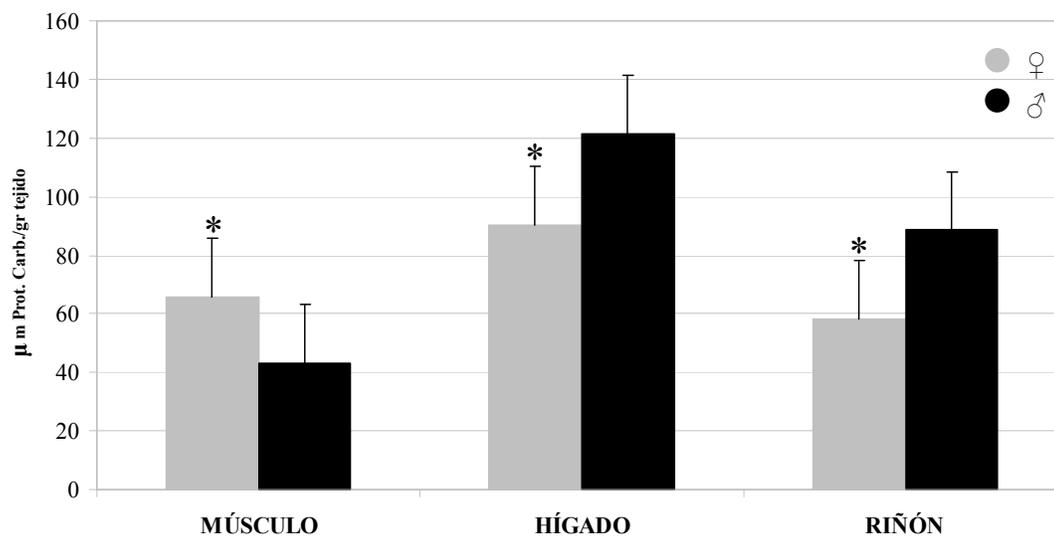


Figura 19. Producción de proteínas carboniladas ($\mu\text{mol/gr. tejido}$) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p < 0.05$.

Tabla II. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), lípidos peroxidados y proteínas carboniladas en tejidos de hembras y machos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

Daño oxidativo	Tejido			
Producción de $O_2^{\cdot-}$ (nmol/mg proteína.min)	<i>Músculo</i>	0.02 \pm 0.01	Hembras (n=11)	0.02 \pm 0.01
			Machos (n=9)	0.02 \pm 0.01
	<i>Hígado</i>	0.08 \pm 0.05	Hembras (n=11)	0.01 \pm 0.007
			Machos (n=9)	0.16 \pm 0.12
	<i>Riñón</i>	0.04 \pm 0.01	Hembras (n=11)	0.04 \pm 0.01
			Machos (n=9)	0.04 \pm 0.03
Peroxidación de lípidos (nmol TBARS/mg proteína)	<i>Músculo</i>	52.76 \pm 18.96	Hembras (n=11)	63.33 \pm 28.19
			Machos (n=9)	39.85 \pm 25.42
	<i>Hígado</i>	475.60 \pm 327.07	Hembras (n=11)	144.90 \pm 57.16
			Machos (n=9)	879.79 \pm 722.82
	<i>Riñón</i>	154.91 \pm 44.56	Hembras (n=11)	210.68 \pm 69.09
			Machos (n=9)	86.75 \pm 46.16
Proteínas carboniladas (μ m Prot. Carb./gr tejido)	<i>Músculo</i>	55.56 \pm 9.95	Hembras (n=11)	65.56 \pm 15.43
			Machos (n=9)	43.33 \pm 11.20
	<i>Hígado</i>	104.23 \pm 14.82	Hembras (n=11)	90.32 \pm 19.22
			Machos (n=9)	121.23 \pm 23.00
	<i>Riñón</i>	71.90 \pm 6.86	Hembras (n=11)	58.28 \pm 6.43
			Machos (n=9)	88.55 \pm 11.08

Defensas antioxidantes

Glutación Reductasa

Se encontró que el tejido que presentó mayor actividad de ésta enzima fue el riñón con 72.16 U GR/mg proteína ($p < 0.05$), seguido del hígado con 33.80 U GR/mg proteína ($p > 0.05$) y finalmente el músculo con 18.73 U GR/mg proteína ($p > 0.05$) (Fig. 20).

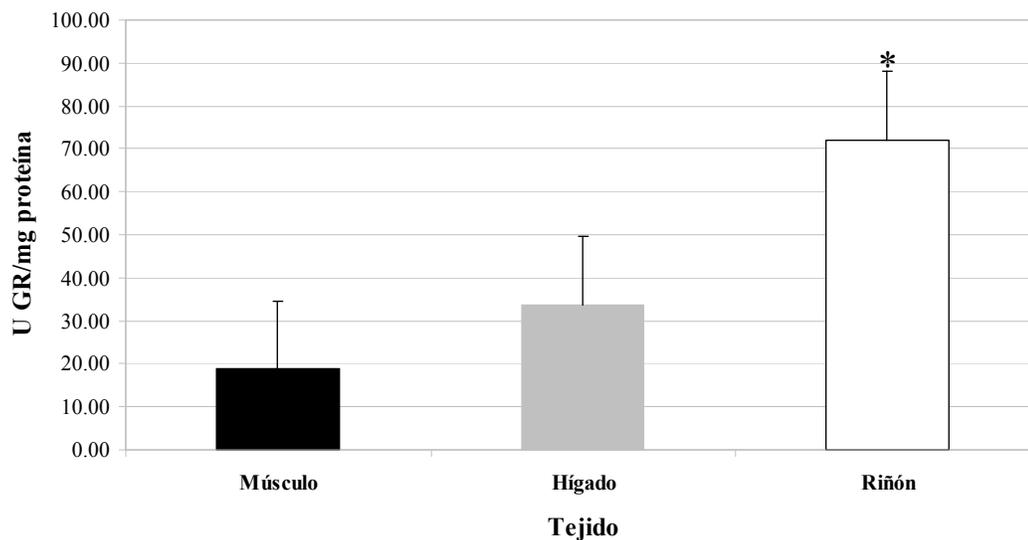


Figura 20. Actividad de glutatión reductasa (U GR/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, *p<0.05.

Se observó que en músculo e hígado de tiburón mako, los valores más altos de la actividad enzimática de GR fueron para los machos con los siguientes valores; músculo hembras 16.01 U GR/mg proteína, machos 22.04 U GR/mg proteína ($p < 0.05$); hígado hembras 19.40 U GR/mg proteína, machos 51.40 U GR/mg proteína ($p < 0.05$). En riñón el valor más alto de la actividad de GR se observó en hembras con 89.56 U GR/mg proteína, machos 50.90 U GR/mg proteína ($p < 0.05$) (Fig. 21).

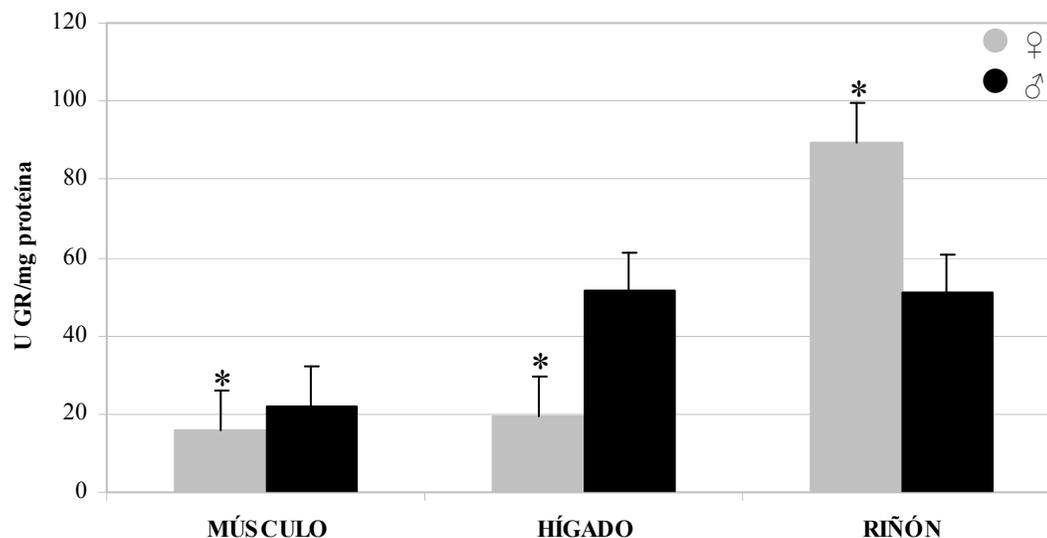


Figura 21. Actividad de glutatión reductasa (U GR/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p<0.05$.

Glutatión Peroxidasa

El tejido que presentó mayor actividad de GPx fue el riñón con 114.10 U GPx/mg ($p>0.05$) de proteína, seguido del músculo con 62.08 U GPx/mg de proteína ($p>0.05$) y finalmente el hígado con 23.53 U GPx/mg de proteína ($p<0.05$) (Fig. 22).

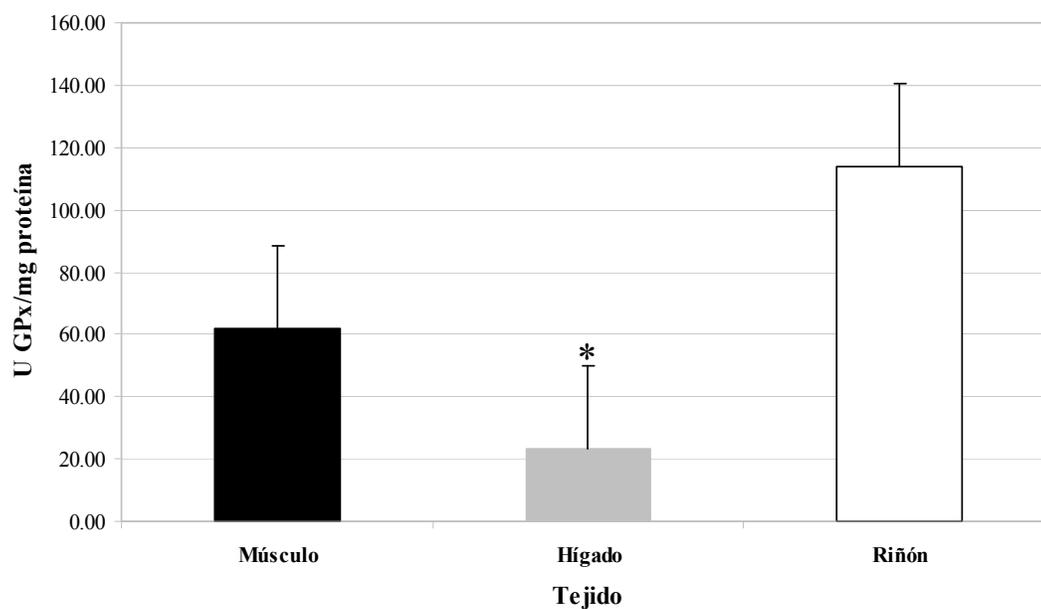


Figura 22. Actividad de glutatión peroxidasa (U GPx/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $N=20$, $*p<0.05$.

En músculo y riñón, los valores más altos de actividad de GPx fueron observados para las hembras con 67.42 U GPx/mg de proteína y 152.68 U GPx/mg de proteína, respectivamente, mientras que los machos tuvieron valores de 55.55 U GPx/mg de proteína en músculo ($p < 0.05$) y 66.96 U GPx/mg de proteína en riñón ($p < 0.05$). En hígado, los machos presentaron mayor actividad de GPx con 28.35 U GPx/mg de proteína y las hembras 19.59 U GPx/mg de proteína ($p < 0.05$) (Fig. 23).

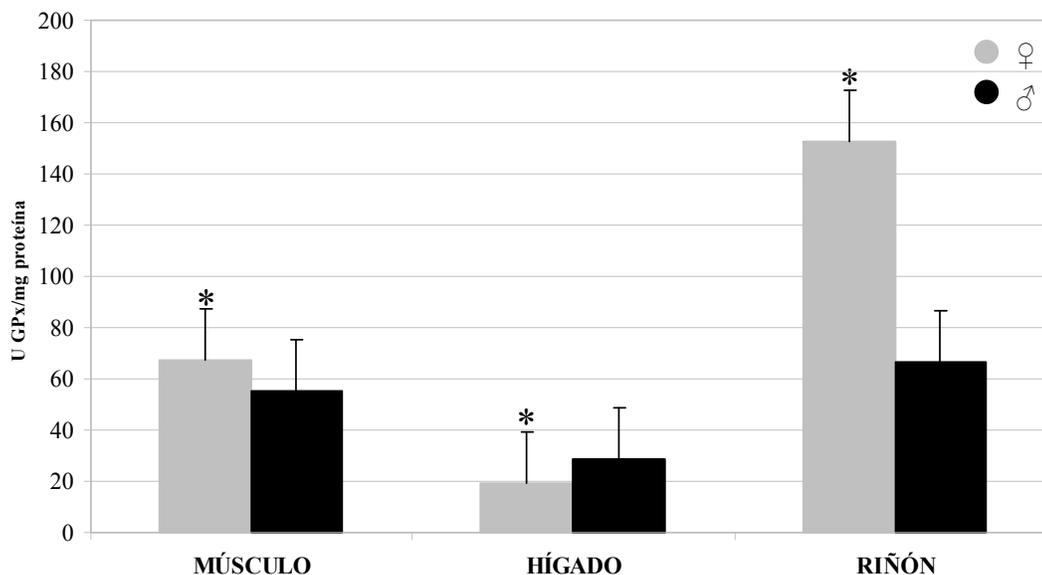


Figura 23. Actividad de glutatión peroxidasa (U GPx/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p < 0.05$.

Glutación-S-Transferasa

La mayor actividad de GST se observó en riñón con un valor de 25.42 U GST/mg de proteína ($p < 0.05$) seguido del hígado con 10.10 U GST/mg de proteína ($p > 0.05$) y el músculo con 6.23 U GST/mg de proteína ($p > 0.05$) (Fig. 24).

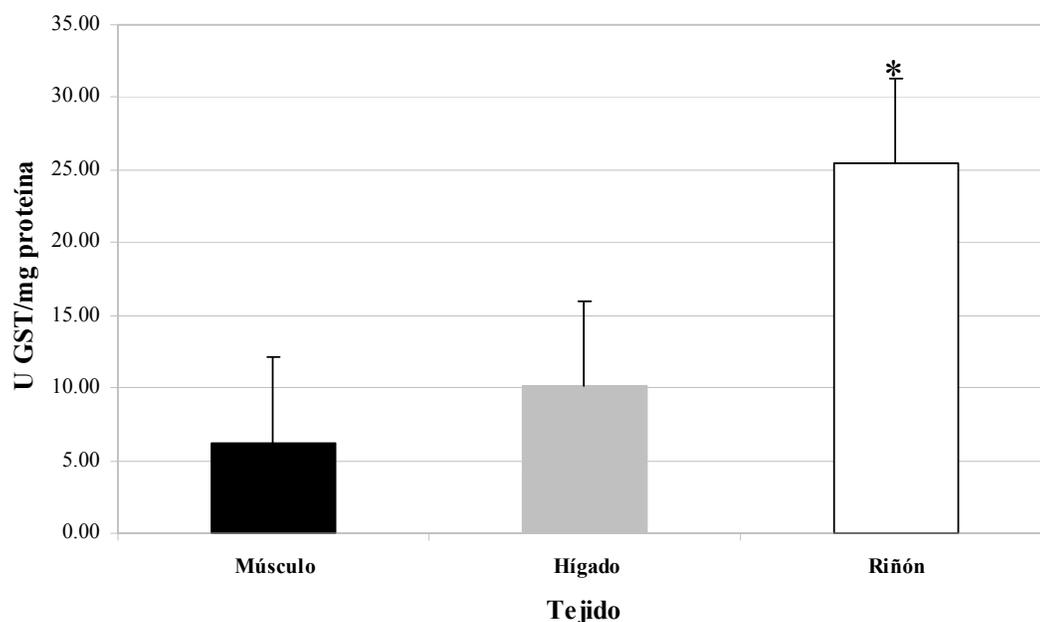


Figura 24. Actividad de glutatión-s-transferasa (U GST/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, * $p < 0.05$.

No se observaron diferencias significativas en la actividad de GST entre sexos para el músculo (hembras 6.33 U GST/mg de proteína, machos 6.09 U GST/mg de proteína, $p > 0.05$) ni para el hígado (hembras 10.03 U GST/mg de proteína, machos 10.19 U GST/mg de proteína, $p > 0.05$). En riñón las hembras tuvieron una mayor actividad de GST (30.19 U GST/mg de proteína) que los machos (19.59 U GST/mg de proteína, $p < 0.05$) (Fig. 25).

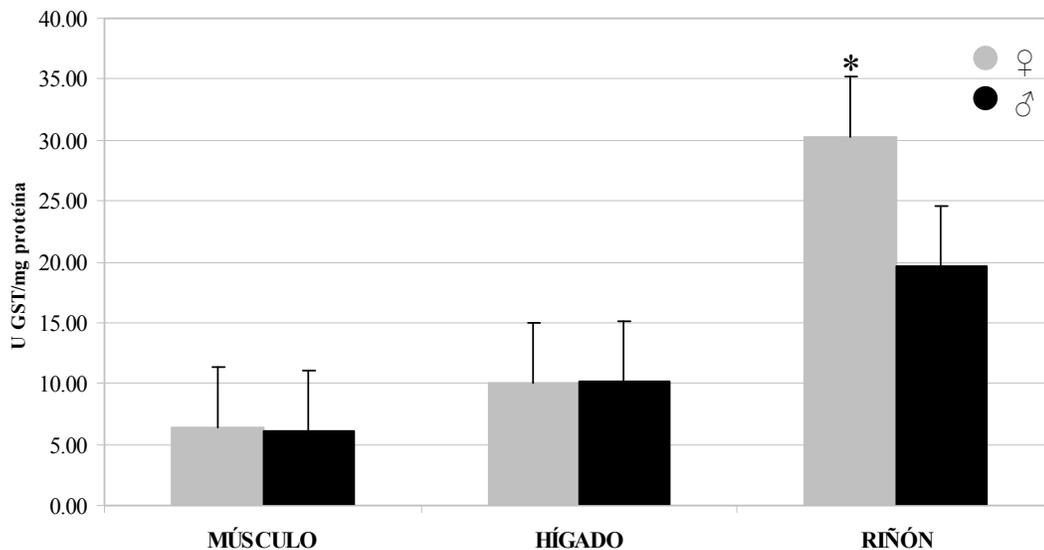


Figura 25. Actividad de glutatión-s-transferasa (U GST/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p<0.05$.

Catalasa

La actividad de la CAT en el hígado (48319.95 U CAT/mg de proteína) de tiburón mako es significativamente mayor al riñón (4553.75 U CAT/mg de proteína, $p>0.05$) y el músculo (2108.60 U CAT/mg de proteína, $p>0.05$) (Fig. 26).

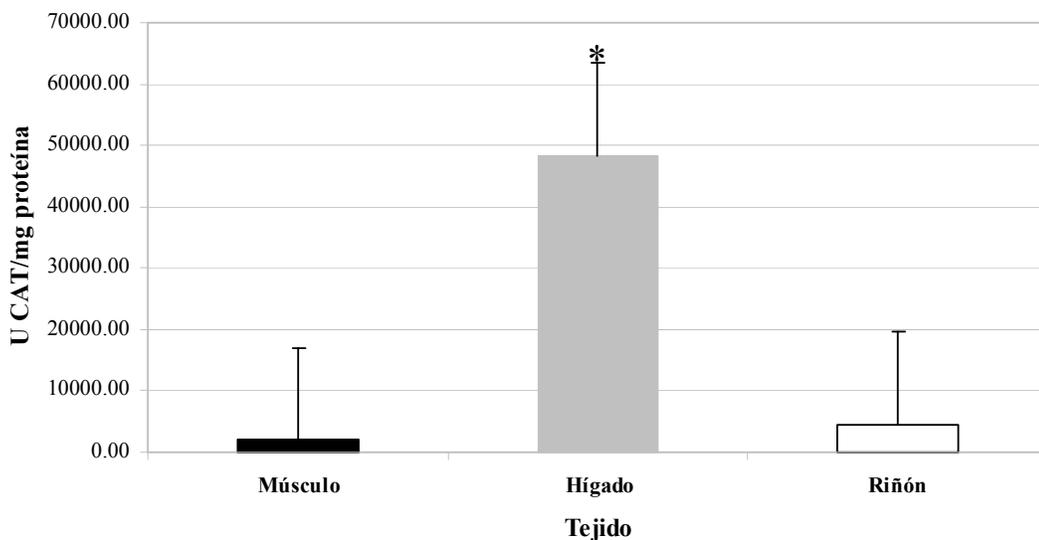


Figura 26. Actividad de catalasa (U CAT/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $N=20$, $*p<0.05$.

De igual manera, se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos para los tres tejidos. Los valores obtenidos fueron los siguientes; en músculo, hembras 1664 U CAT/mg de proteína, machos 2651.79 U CAT/mg de proteína ($p < 0.05$); en hígado, hembras 36447.54 U CAT/mg de proteína, machos 62830.67 U CAT/mg de proteína ($p < 0.05$); riñón, hembras 5613.21 U CAT/mg de proteína, machos 3258.58 U CAT/mg de proteína ($p < 0.05$) (Fig. 27).

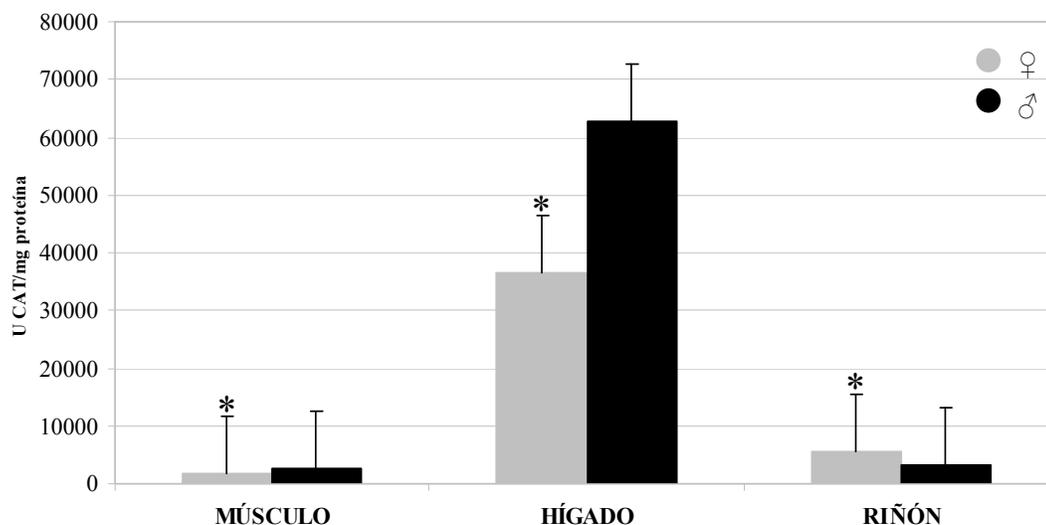


Figura 27. Actividad de catalasa (U CAT/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. $n_{\text{♀}}=11$, $n_{\text{♂}}=9$, $*p < 0.05$.

Superóxido dismutasa

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la actividad enzimática de SOD en el riñón (2714.77 U SOD/mg de proteína) con respecto a músculo (778.53 U SOD/mg de proteína, $p > 0.05$) e hígado (788.29 U SOD/mg de proteína, $p > 0.05$) (Fig. 28).

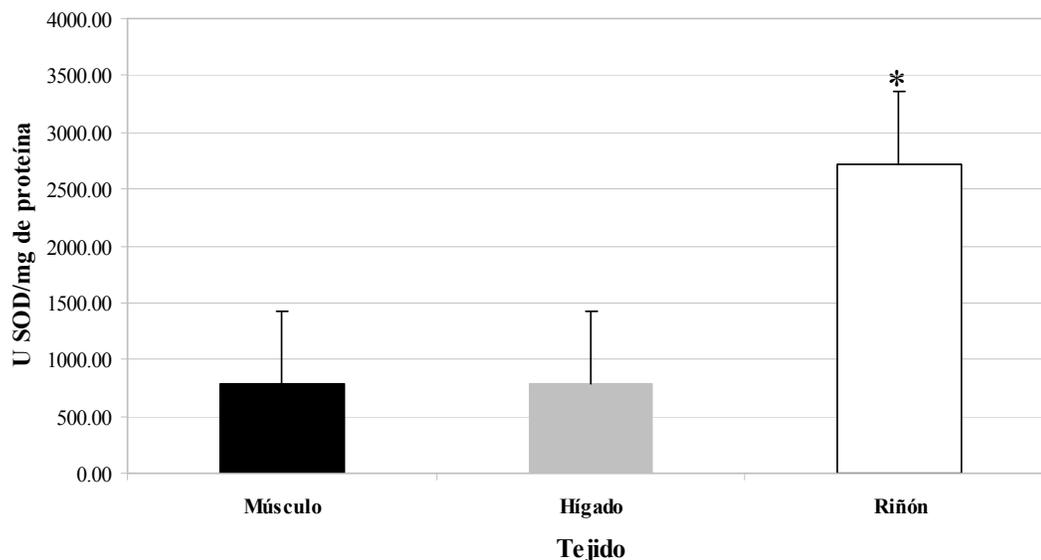


Figura 28. Actividad de superóxido dismutasa (U SOD/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. N= 20, * $p < 0.05$.

En músculo las hembras de tiburón mako presentaron menor actividad de SOD (374.10 U SOD/mg de proteína), que los machos (1272.84 U SOD/mg de proteína, $p < 0.05$); en hígado las hembras presentaron menor actividad de SOD (459.44 U SOD/mg de proteína) que los machos (1190.22 U SOD/mg de proteína, $p < 0.05$) y, finalmente en el riñón, las hembras registraron mayor actividad de SOD (3340 U SOD/mg de proteína) que los machos (1950 U SOD/mg de proteína, $p < 0.05$) (Fig. 29).

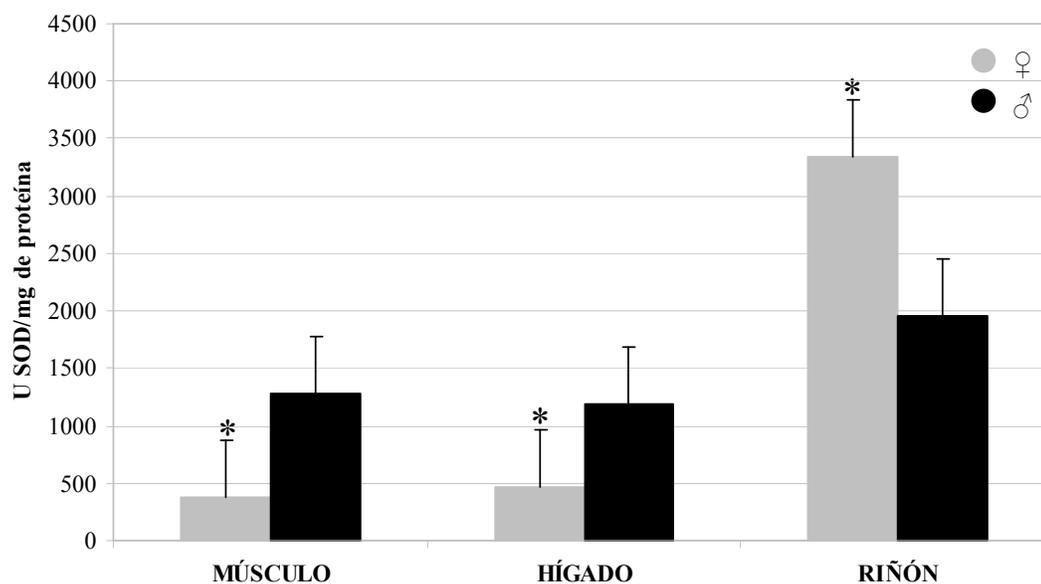


Figura 29. Actividad de superóxido dismutasa (U SOD/mg proteína) en tejidos de tiburón mako en Isla Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. n ♀=11, n ♂=9, *p<0.05.

Tabla III. Actividad de las enzimas antioxidantes en tejidos de hembras y machos de tiburón mako de Isla Magdalena Baja California Sur. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

Enzima	Tejido			
Glutación Reductasa (U GR/mg proteína)	Músculo	18.73 \pm 5.79	Hembras (n=11)	16.01 \pm 5.25
			Machos (n=9)	22.04 \pm 11.52
	Hígado	33.80 \pm 18.01	Hembras (n=11)	19.40 \pm 13.22
			Machos (n=9)	51.40 \pm 37.07
	Riñón	72.16 \pm 17.19	Hembras (n=11)	89.56 \pm 23.35
			Machos (n=9)	50.90 \pm 25.00
Glutación Peroxidasa (U GPx/mg proteína)	Músculo	62.08 \pm 17.74	Hembras (n=11)	67.42 \pm 21.91
			Machos (n=9)	55.55 \pm 30.31
	Hígado	23.53 \pm 9.79	Hembras (n=11)	19.59 \pm 12.20
			Machos (n=9)	28.35 \pm 16.54
	Riñón	114.10 \pm 33.23	Hembras (n=11)	152.68 \pm 48.32
			Machos (n=9)	66.96 \pm 41.89

Enzima	Tejido			
Glutación-S-Transferasa (U GST/ mg proteína)	<i>Músculo</i>	6.23 ± 1.62	Hembras (n=11)	6.33 ± 2.19
			Machos (n=9)	6.09 ± 2.55
	<i>Hígado</i>	10.10 ± 4.44	Hembras (n=11)	10.03 ± 6.29
			Machos (n=9)	10.19 ± 6.60
	<i>Riñón</i>	25.42 ± 6.89	Hembras (n=11)	30.19 ± 8.30
			Machos (n=9)	19.59 ± 11.75
Catalasa (U CAT/mg proteína)	<i>Músculo</i>	2108.60 ± 653.36	Hembras (n=11)	1664.17 ± 756.86
			Machos (n=9)	2651.79 ± 1144.87
	<i>Hígado</i>	48319.95 ± 23083.26	Hembras (n=11)	36447.54 ± 22114.85
			Machos (n=9)	62830.67 ± 44912.75
	<i>Riñón</i>	4553.75 ± 1145.78	Hembras (n=11)	5613.21 ± 1561.34
			Machos (n=9)	3258.84 ± 1680.28
Superóxido Dismutasa (U SOD/mg proteína)	<i>Músculo</i>	778.53 ± 256.15	Hembras (n=11)	374.10 ± 172.77
			Machos (n=9)	1272.84 ± 495.13
	<i>Hígado</i>	788.29 ± 442.85	Hembras (n=11)	459.44 ± 372.69
			Machos (n=9)	1190.22 ± 886.66
	<i>Riñón</i>	2714.77 ± 607.35	Hembras (n=11)	3340.18 ± 781.19
			Machos (n=9)	1950.38 ± 938.99

Relación entre elementos traza e indicadores de estrés oxidativo

Se encontraron correlaciones entre la actividad de GPx y la concentración de Pb ($r= 0.2582$, $p<0.05$) Cd ($r= -0.2966$, $p<0.05$) y As ($r= -0.3123$, $p<0.05$), así como entre la concentración de As con CAT ($r= -0.2841$, $p<0.05$) y SOD ($r= -0.2757$, $p<0.05$) en músculo de tiburón mako. Para el hígado se encontró una correlación entre la concentración de As y la actividad de GR ($r= -0.1732$, $p<0.05$). Para el riñón no se encontraron correlaciones significativas entre las concentraciones de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo.

DISCUSIÓN

Las tallas obtenidas para hembras y machos de tiburón mako coinciden con las tallas reportadas para organismos jóvenes que no han alcanzado la madurez sexual (Stevens, 1983).

Concentración de elementos traza

En este estudio se encontraron concentraciones muy bajas de Pb en tejidos de hembras (M=0.28 mg/kg, H=0.15 mg/kg, R=0.31 mg/kg) y machos (M=0.29 mg/kg, H=0.12 mg/kg, R=0.22 mg/kg) de tiburón mako en Isla Magdalena, lo que quizá se deba a la corta edad de los individuos muestreados y a su composición pobre en grasa. Nuestros resultados coinciden con reportes anteriores. Se reportó que los tiburones de profundidad del Mar Mediterráneo (*Centrophorus granulosus* y *Galeus melastomus*) presentan niveles de Pb debajo del límite detectable (Hornung *et al.*, 1993). Se presume que los bajos niveles de Pb, que es un compuesto liposoluble (Alday *et al.*, 1988), en tiburón podían deberse a la composición del músculo ya que es una especie rica en proteína pero pobre en grasa (Hardisson *et al.*, 1997). Por otro lado, Tarley *et al.* (2001) reportaron niveles de Pb (0.77 a 2.15 µg/g) en sardinas enlatadas producidas en Brasil y comprobaron que las concentraciones presentes no superaban los niveles autorizados por la legislación brasileña (2,0 µg/g).

Los niveles de Pb encontrados en tejidos de tiburón mako (M=0.29 mg/kg, H=0.14 mg/kg, R=0.27 mg/kg) en este estudio no rebasan la concentración máxima permisible de Pb en carne de pescado (1mg/kg) en México según la NOM-027. Sin embargo, de acuerdo a las normas establecidas por la Unión Europea que establecen la concentración máxima permisible de Pb en carne de tiburón que es de 0.2 mg/kg, los

resultados obtenidos en músculo (0.29 mg/kg) y riñón (0.27 mg/kg), están dentro del límite del máximo permisible.

Se observó que la mayor concentración de Cd fue en el hígado de tiburón mako. De manera similar, Nuñez-Nogueira en 2005 encontró la mayor concentración de Cd en el hígado en comparación con músculo, branquias y cerebro del cazón picudo *Rhizoprionodon terraenovae* en el Golfo de México. Por otra parte, se reporta mayor concentración de Cd en el músculo de hembras que en machos del tiburón puntas negras *Carcharhinus limbatus* del Golfo de México. Las diferencias entre sexos en la concentración de Cd puede deberse al estado de madurez de los individuos, lo cual está asociado con cambios fisiológicos en las gónadas y/o en la movilización de lípidos de reserva (Betka & Callard, 1999). En contraste, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en los niveles de Cd entre sexos en los tejidos de tiburón mako, quizá debido a que todos los organismos colectados fueron juveniles.

Los niveles de Cd encontrados en hígado y riñón de tiburón mako en Isla Magdalena rebasan las normas Mexicana (NOM-027) y de la Unión Europea, las cuales son de 0.5 mg/kg y 0.05 mg/kg, respectivamente. La toxicidad de los metales en peces está relacionada con anemia, hipoglicemia, cáncer, patología en branquias, inmunodeficiencia, etc. (Heat, 1987; Sinderman, 1989), y puede aumentar por combinación del metal con otros elementos (Reichenback-Klinke, 1980). Además, en humanos puede causar algunos síntomas de toxicidad crónica, incluyendo deterioro de la función renal, baja capacidad reproductiva, hipertensión, tumores y disfunción hepática (Luckey & Venugopal, 1977).

En hembras de tiburón mako se encontró una mayor concentración de Hg en músculo e hígado que los machos. Lo anterior puede estar relacionado con la talla de los

individuos ya que, aunque todos los tiburones analizados fueron juveniles, las hembras fueron de mayor talla que los machos. Por lo general, los organismos de mayor tamaño presentan tasas metabólicas más elevadas (Marcotrigiano & Storelli, 2003). Ya que la asimilación de Hg está asociada con la dieta (Storelli *et. al.*, 2002; 2003), se podría sugerir que las hembras de tiburón mako ingieren mayor cantidad de alimento y, por ende, Hg que los machos. Los tiburones son susceptibles a la presencia de Hg, ya que son considerados como organismos longevos (Lyle, 1984). Esta longevidad, en conjunto con una tasa de crecimiento relativamente baja y el alto nivel trófico en que se posicionan los tiburones, contribuye a la acumulación de Hg. Pelletier (1995) considera que la bioacumulación de Hg es resultado de múltiples factores, incluyendo factores medioambientales, como hábitat y estación del año, factores biológicos, como mecanismos excretores, tasas de crecimiento bajas y nivel trófico, y factores antropogénicos como sobrepesca. Las complejas interacciones entre estos factores también contribuyen a determinar el contenido de Hg en cada organismo o especie (Núñez-Nogueira, 2005).

Por otro lado, se encontraron bajas concentraciones de As en los tejidos analizados del tiburón mako, lo cual puede deberse a la corta edad de los individuos o al tamaño de muestra muy pequeño. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre tejidos, se observaron diferencias en los niveles de As entre sexos en músculo e hígado siendo mayor en machos para el músculo, y mayor en hembras para el hígado. Ello quizá sugiere que los machos tienen un mayor grado de exposición al metaloide, ya que el músculo es conocido como el mejor indicador de una exposición crónica a contaminantes, mientras que el hígado es reconocido como el tejido que refleja exposición a contaminantes por un corto tiempo (Albaigés *et. al.*, 1987). De igual

forma, la alimentación quizá juegue un papel importante ya que se sabe que aunque la dieta de hembras y machos es similar, las hembras tienden a ser más selectivas con su alimento (Velasco, 2005). Se puede asumir que la dieta y los hábitos alimenticios de los tiburones explican la presencia de As en sus cuerpos (Turozcy *et. al.*, 2000). Sin embargo, una parte puede ser absorbida desde solución, ya que el As en los océanos es uno de los más concentrados (entre 1.1-1.9 $\mu\text{g L}^{-1}$), comparado con otros metales no esenciales como Hg, Cd y Pb; los cuales normalmente se encuentran por debajo de los 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ o menos (Summerhayes & Thorpe, 1996).

Elementos traza y daño oxidativo

No se encontraron correlaciones significativas entre los elementos traza estudiados y los indicadores de daño oxidativo, como producción de O_2^- , peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas, en ninguno de los tejidos de tiburón mako estudiados. Es posible que el daño oxidativo encontrado en los tejidos de tiburón mako puede deberse a otros factores, como la actividad física. Compagno (2001) y Bernal (2003), sugieren que *I. oxyrinchus* es un nadador sumamente activo, capaz de perseguir presas muy veloces como los atunes y otros tiburones. Lo anterior sugiere que el metabolismo de esta especie es acelerado y, por lo tanto, se esperaría que generara cantidades elevadas de O_2^- .

La producción de O_2^- en tejidos de tiburón mako en este estudio son menores a lo reportado por López (2007), quién estableció que el tiburón mako es un organismo cuyas características fisiológicas y de alimentación lo hacen más susceptible a la formación de EROS que otros tiburones, por ejemplo, *Sphyrna zygaena*. Los factores que pueden relacionarse con la menor producción de O_2^- en los tiburones del presente estudio son: la edad de los individuos y los hábitos de alimentación que presentan. Por

ejemplo, de manera general, se sabe que el tiburón mako en la costa occidental de Baja California Sur presenta una baja amplitud de dieta, que indica una conducta alimenticia especialista y gran selectividad por sus presas (Velasco, 2005). Sin embargo, las hembras muestran selectividad por el alimento mientras que los machos tienen una dieta menos selectiva, aunque el consumo de presas en ambos es similar indicando que existe una sobreposición de dieta. Por otro lado, juveniles de tiburón mako tienen selectividad por su alimento, mientras que para los adultos la alimentación tiende a ser generalista; así mismo, presentan una baja sobreposición de dieta, por lo que se deduce que sus presas son diferentes (Velasco, 2005).

En este estudio se trabajó con organismos juveniles, los cuales consumen principalmente una presa, el trígido *Prionotus albirostris* (Rubio rey), el cual es considerado como una especie poco abundante de la familia de los trígidos en la costa occidental de Baja California Sur, y no parece migrar en ninguna época. Esta presa se encuentra entre 40 y 100 m, con preferencia por los 80 m de profundidad (Schmitter-Soto, 1992), por lo que se infiere que los tiburones realizan migraciones hacia el bentos a una profundidad máxima de 100 m para la captura de esta presa. La segunda especie de pez en importancia en la dieta del tiburón mako es *Scomber japonius*, el cual es un organismo abundante en el área pelágico-costera, ocasionalmente epipelágica (Fischer *et. al.*, 1995). Es considerado un nadador rápido y activo formador de cardúmenes grandes, lo cual permite a sus depredadores maximizar la eficiencia de captura debido a la mayor disponibilidad y abundancia de este tipo de presas (Galván *et. al.*, 1989). Estas características de las principales presas de los juveniles de tiburón mako indican que posiblemente requieran un menor esfuerzo físico para obtener su alimento, al no bajar a profundidades muy grandes, y al capturar fácilmente a sus presas. Posiblemente, por

ello no se encontraron diferencias significativas en la producción de O_2^- entre tejidos y sexo. Wdzieczak *et al.* (1982), reportaron en un estudio comparativo de las actividades de SOD y CAT y peroxidación lipídica en eritrocitos e hígado de diferentes especies de peces, que los peces más jóvenes muestran mayor actividad antioxidante.

Pese a la baja producción de O_2^- se encontraron que si existen diferencias significativas en la peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas entre tejidos y sexos, notándose que el mayor daño se encuentra principalmente en hígado y riñón. Se observó que los machos presentan un valor más alto de peroxidación de lípidos en comparación a las hembras en el hígado y de proteínas carboniladas en hígado y riñón.

Se sabe que el exceso de oxidantes y la lipoperoxidación pueden inducir modificaciones en los niveles de algunos antioxidantes (Brites *et al.*, 1999). Elevadas concentraciones de oxígeno disuelto en los tejidos pueden aumentar la probabilidad de formación de hidroperóxidos lipídicos y activar la cadena de propagación de radicales lipídicos (Abele & Puntarulo, 2004). Es importante mencionar que en el hígado de tiburones y rayas se han encontrado niveles muy altos de productos de peroxidación lipídica, principalmente el MDA (Wilhem-Filho & Boveris, 1993). Según Bernal (2003) en el tiburón mako se encuentran grandes concentraciones de hemoglobina (Hb) y mioglobina (Mb), las cuales pueden generar ERO y aumentar su reactividad por otras vías como la autooxidación a oxihemoglobina y oximioglobina que permiten la formación de O_2^- , y por lo tanto, la formación de H_2O_2 e iniciar la peroxidación lipídica. La producción de ERO proveniente de la Hb se puede aumentar al disminuir la presión parcial del oxígeno en la sangre de capilares y venas asociadas al ejercicio (Cooper *et al.*, 2002).

Por otro lado, se ha demostrado que la síntesis del óxido nítrico (NO), que es un radical libre del nitrógeno, en espermatozoides de ratón y de humano puede inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática (Herrero *et al.*, 1996), en este proceso se involucra adicionalmente el anión superóxido (O_2^-) que es una ERO que al interaccionar con el óxido nítrico forma peroxinitrito, una molécula precursora de radicales $^{\cdot}OH$, que realmente sería la responsable de la lipoperoxidación (Membrillo *et al.*, 2003). Cabe la posibilidad de que participen otros radicales libres que no se hayan medido en este estudio.

Otro factor que podría explicar por qué, de manera general, se observa un mayor daño oxidativo en los machos de tiburón mako es el estado hormonal. Se sabe que en humanos la estructura química de los estrógenos, fundamentalmente del 17β -estradiol, permite atribuirle un papel antioxidante a esta molécula debido a que el anillo A del estradiol presenta un grupo hidroxilo y también dobles enlaces conjugados. Esta particularidad sugiere la posibilidad de una protección antioxidante adicional, a partir de los estrógenos, en las mujeres (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997; Requintina & Oxenkrug, 2005).

Elementos traza y actividad enzimática antioxidante

En los ambientes marinos los diferentes organismos están expuestos de manera crónica a bajas cantidades de contaminantes, entre ellos metales pesados y metaloides; y aunque no les provocan la muerte, sufren alteraciones a nivel molecular que se traducen en cambios estructurales y funcionales, los cuales pueden ser determinados empleando marcadores biológicos, tales como la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (Heath, 1995). Podríamos considerar al tiburón mako como un organismo bioindicador, debido a su importancia en la cadena alimenticia y a su importancia económica. En general, los metales pueden modificar el metabolismo de proteínas y la forma de

afección depende del tipo de tóxico, el tiempo de exposición y la concentración a la que se exponga el organismo (Camacho-Sánchez, 2007).

En el presente trabajo se encontró una correlación positiva entre la actividad de la GPx y la concentración de Pb en músculo del tiburón mako. Se sabe que en humanos, una gran acumulación de Pb en las células puede catalizar la reacción de Fenton generando un mayor estrés oxidativo (Lidner, 1999) lo que quizá explique el aumento en la actividad de GPx observado en tiburón mako. Por otro lado, se observó que la actividad de la GPx disminuye conforme aumenta la concentración de Cd en el músculo del tiburón mako. Al parecer, este metal puede intensificar la peroxidación lipídica a través de la inhibición de la SOD y otras enzimas (Gutiérrez-Reyes *et al.* 1998). El Cd posee una gran capacidad para bioconcentrarse en los tejidos, debido a su alta solubilidad en agua (Prager, 2002), por lo que está más biodisponible al organismo. El mecanismo por el cual el Cd inicia la formación de ERO puede deberse fundamentalmente a que este metal provoca un descenso intracelular del contenido de GSH y reduce la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx, permitiendo la acumulación de ERO y, por lo tanto, un incremento del estrés oxidativo intracelular (Waisberg *et al.*, 2003).

El Cd no es un metal redox activo y no puede desencadenar por sí mismo reacciones tipo Fenton (Walkees & Poirier, 1984). Este elemento no es directamente genotóxico (I.A.R.C., 1993; Dally & Hartwig, 1997) sino que induce estrés oxidativo mediante mecanismos indirectos, como el descenso de antioxidantes celulares y la liberación de ERO en la mitocondria (Waisberg *et al.*, 2003). La intensificación del metabolismo oxidativo da lugar a la generación de O_2^- , el cual puede transformarse por conversión enzimática o espontánea a H_2O_2 que, a través de la reacción de Fenton puede

generar $\cdot\text{OH}$ que es altamente tóxico. De forma indirecta, esta sobreproducción de moléculas oxidantes podría ser la responsable de un importante número de daños ocasionados en el ADN, así como, de la generación de proteínas con plegamientos defectuosos (Bertin & Averbeck, 2006).

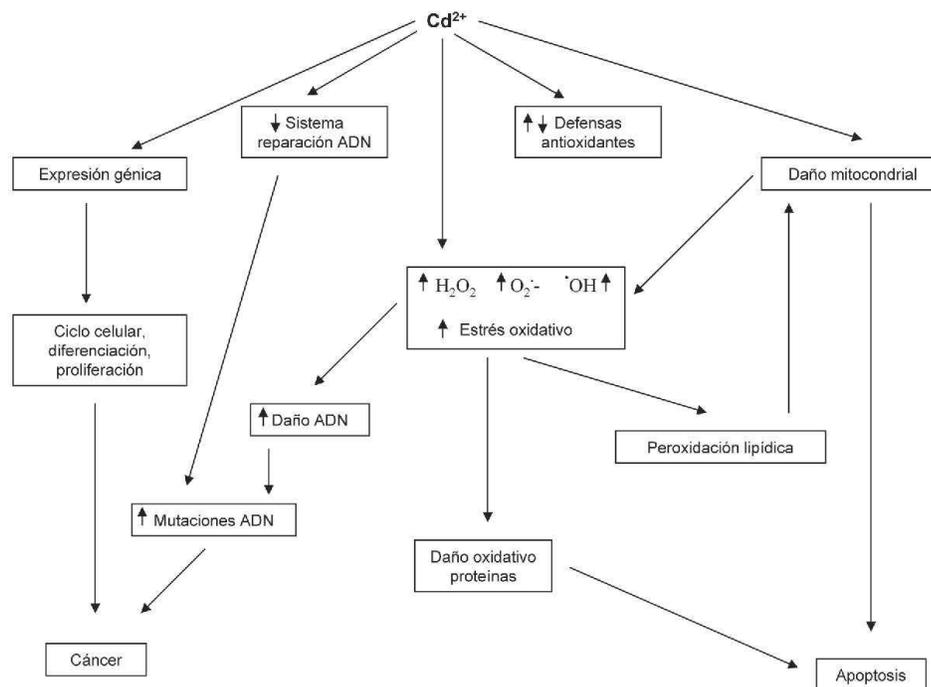


Figura 30. Efectos tóxicos inducidos por el cadmio a nivel celular. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, $\text{O}_2\cdot^-$: radical superóxido, $\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo (Tomado de Romero *et al.*, 2008).

El Cd también puede incrementar la generación de ERO inhibiendo el complejo III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, que parece ser el principal lugar de producción de $\text{O}_2\cdot^-$ (Wang, 2004).

En este estudio también se pudo observar que en músculo e hígado de tiburón mako se registran correlaciones negativas entre la concentración de As y la actividad de las enzimas GPx, CAT, SOD y GR. Si el As está en su forma trivalente, es decir, como arsenito, con una fuerte afinidad a los grupos sulfhidrilo, éste puede poseer un potente riesgo toxicológico por medio de la inhibición de la actividad de varias enzimas (Gorby,

1994). Manna *et al.* (2007) reportaron que el As causa un significativo daño hepático en hígado de ratón. Además, causa un incremento en la tasa de producción de ERO, como el O_2^- , $\cdot OH$ y H_2O_2 . Este aumento en la producción de ERO propicia peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (Yamauchi, 2004), puede disminuir los niveles de GSH y conducir a la supresión de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT, GST, GR y GPx en células de hígado (Manna *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- De los cuatro elementos traza analizados, el Pb y Cd presentaron concentraciones por arriba de los límites máximos permisibles en un 45% de los organismos muestreados, siendo éstos considerados como metales tóxico y muy tóxico, respectivamente. Las concentraciones más elevadas de Hg y As fueron reportadas para las hembras de tiburón mako.

-No se encontraron diferencias en la producción de O_2^- entre los tejidos estudiados y entre sexos de tiburón mako.

-Tanto la peroxidación de lípidos como las proteínas carboniladas sugieren mayor daño oxidativo en el hígado y, particularmente en los machos de tiburón mako, en hígado y riñón.

-De manera general se observa que la mayor actividad antioxidante se expresa en hígado y riñón, tanto en hembras como machos de tiburón mako.

-El metaloide As y el metal pesado Cd pueden jugar un papel importante como inhibidores de ciertas enzimas antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

AAFCO. 1996. Association of American Feed Control Officials. Official Publication. American Academy of Pediatrics. 97(3): 413-416.

Abele , D. & Puntuarlo, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138: 405-415.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. En: Packer, L. (Ed.). *Methods in enzymology, Oxygen radicals in biological systems*. Academic Press, Inc. E.U.A. 105: 121-126.

Albaigés, J., Farran, A., Soler, M., Gallifa, A. & Martin, P. 1987. Accumulation and distribution of biogenic and pollutant hydrocarbons, PCBs and DDT in tissues of Western Fishes. *Mar Environ Res* 22: 1-18.

Alday, E., Bartual, J., Berenguer, M. J., Delgado, P., Huici, A., Márquez, F., Martí, A., Porcel, J. & Urbieto, M.J. 1988. *Toxicología laboral básica*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Madrid.

Alloway, B. J. & Ayres, D. C. 1997. *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Blackie Academic and Professional. London. 393 p.

Álvarez-Borrego, S., Galindo-Bect, L.A., Chee-Barragán, A. 1975. Características hidroquímicas de Bahía Magdalena, BCS. *Cienc Mar* 2:94-110.

Asada, K., & Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition*, ed. DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, p. 228-87. Elsevier: Amsterdam.

Bernal, D., Sepulveda, C., Mathieu-Costello O. & Graham, J. B. 2003. Comparative studies of high performance swimming in sharks I. Red muscle morphometrics, vascularization and ultrastructure. *Journal of Experimental Biology*. 206: 2831-2843.

Bertin, G. & Averbeck, D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. 88: 1549-1559.

Betka, M. & Callard, G. V. 1999. Stage-dependent accumulation of cadmium and induction of metallothionein-like binding activity in the testis of the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Biology of Reproduction*. 60: 14-22.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-54.

Brites, F. D., Evelson, P. A., Christiansen, M. G., Nicol, M. F., Basitio, M. J., Wikinski, R. W. & Llesuy, S. F. 1999. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clinical Science. Great Britain*. 96: 381-385.

Buencuerpo, V., Ríos, S., & Morón, J. 1998. Pelagic sharks associated with the swordfish, *Xiphias gladius*, fishery in the eastern North Atlantic Ocean and the Strait of Gibraltar. *Fish. Bull*. 96:667-685.

Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem*. 58: 79-110.

Camacho-Sánchez, M. I. 2007. Bioconcentración y toxicidad de metales en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Rev. Toxicol. México*. 24: 14-17.

Castro, J. I. 1987. The position of sharks in marine biological Communities. In: S Cook (DE) Sherks, *An Inquiry Into Biology, Behavior Fisheries, and Use*, Oregon State University Extension Service, Corvallis. pp. 11-17.

Cohen, T., Que Hee, S.S. & Ambrose, R. F. 2001. Trace metals in fish and invertebrates of three California coastal wetlands. *Mar Pollut Bull.* 42: 224-232.

Compagno, L. J. V. 1984. *FAO species catalogue. Vol.4 Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes.* *FAO Fish.Synop.*(125) 4 (parte 1): 221-655.

Compagno, L. J. V. 1990. Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes.* 28: 33-75.

Compagno, L. J. V. 2001. *Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes).* *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 1, Vol. 2.* Rome, FAO. 269 p.

Conde-Moreno, M. 2005. Aspectos de la Biología Reproductiva del tiburón mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810) en la costa occidental de Baja California Sur. Tesis de Licenciatura. UABCS. 72 p.

Cooper, C. E., Vollaard, N. B. J., Choueiri, T. & Wilson, M. T. 2002. Exercise free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions.* 30: 280-285. Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES. Jou. Mar. Sci.* 56:707-717.

Dally, H. & Hartwig, A. 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 18: 1021-1026.

Dalton, T., Shertzer, H.G. & Puga, A. 1999. Regulation Of Gene Expression By Reactive Oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67-101

Delatre J. & Bonnefont-Rousselot, D. 1998. Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech Lab Int.* 3 (2): 21-23.

Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E., Manno, M. & Albores, A. 2001. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 177: 132-148.

Durán, A., Cisneros, A. & Vargas, A. 2003. *Bioestadística.* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 222 p.

Folhé, L. & Günzler, W. A. 1984. Assays for Glutathione peroxidase. En: Packer, L. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. E.U.A. pp. 114-120.

Fisher, N. S. & Reinfelder, J. R. 1995. The trophic transfer of metals in marine systems. In: A. Tessier and D. R. Turner (Eds). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems.* John Wiley & Sons. Toronto, Canada. pp. 363-406.

Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. & Niem, V. H. (Red.) 1995. *Pacífico Centro-Oriental; Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca.* FAO. Roma. (Vol-II-III) pp. 648-1652.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-9.

Galván-Magaña, F., Nienhuis, H. J. & Klimley, A. P. 1989. Seasonal abundance and feeding habits of sharks of the lower Gulf of California, México. *Calif. Fish and Game.* 75(2): 74-84.

Gamaley, I. A. & Kluybin, I. V. 1999. Roles of Reactive Oxygen Species: Signaling and Regulation of Cellular Functions. *Int. Review Cytology.* 188:203-255.

Gárate-Lizárraga, I. & Siqueiros-Beltrones, D. A. 1998. Time variation in phytoplankton assemblages in a subtropical lagoon system after the 1982-1983 "El Niño" event (1984 to 1986). *Pac Sci.* 52:79-97.

Goldberg, D. M. & Spooner, R. J. 1987. Glutathione Reductase. En: Bermeyer-Ulrich, H. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis, Vol III: Enzymes, I:Oxidoreductases transferases.* VCH. Alemania. pp. 258-265.

Gomes, A., Vieira, V., Veiga de Carvalho, C., Teixeira, R. & Marcante, F. 2004. Total Mercury in the Night Shark, *Carcharhinus signatus* in the Western Equatorial Atlantic Ocean. 47(4): 629-634.

Gorby, M. S. 1994. Arsenic in human medicine. In Nriagu J. O. ed. *Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects.* John Wiley. New York, USA. pp. 1-16.

Gutiérrez-Galindo, E. A., Villaescusa-Celaya, J. A. & Arrelola-Chimal, A. 1999. Bioaccumulation of metals in mussels from four sites of the coastal region of Baja California. *Ciencias Marinas.* 25:557-577.

Gutiérrez-Reyes, E. Y., Albores, A. & Ríos, C. 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology* 131: 145-154.

Gutteridge, J. & Halliwell, B. 1999. Antioxidant Protection and Oxygen Radical Signaling: En: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach.* D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds.) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York. pp. 189-218.

Habig, W. H. & Jakoby, H. B. 1981. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). En: Jakoby, W. B. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol. 77. Academic Press, Inc. E.U.A. pp. 218-235.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford: Clarendon. pp. 94-96.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. 1998. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. 936 p.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford Univ. Press. 936 p.

Hardisson, A., Báez-Acosta, A., González, T., Pascual-Alayón, P. & Lozano, G. 1997. Trace metal content in deep sea Waters. *J. Vet. Pharm. Ther.* Volume 20, Supplement 1. Proceedings of the 7th European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT). International Congress. Madrid, España. pp. 6-10.

Heat, G. A. 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press. Boston. 245 p.

Heath, A. G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. Lewis Publishers Boca Raton, New York, London, Tokio. 359 p.

Hermes-Lima, M. 2004. Oxidative stress and medical sciences. En *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Storey KB (Ed). John Wiley and Sons, Inc. pp. 369-382.

Hermes-Lima, M., Storey, J. & Storey, K. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 120. pp. 437-448.

Hernández-Rivas, M. E., Gómez-Gutiérrez, J., Sánchez-Ortíz, C.A., Saldierna-Martínez, R. J. & Vera-Alejandre, G. R. 1993. Atlas de temperatura superficial en el complejo lagunar de Bahía Magdalena-Bahía Almejas, Baja California Sur. México. 1980-1989. Secretaria de Marina. Centro Nacional de Datos Oceanográficos de la Secretaría de Marina. Sección Físico-Químico 2:1-87.

Herrero, M. B., Pérez, M. S., Viggiano, J. M., Polak, J. M. & de Gimeno, M. F. 1996. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 931-934.

Hidalgo, J. & Flos, R. 1986. Dogfish metallothionein. Purification and characterization and comparison with rat metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology-C.* 83(1): 99-103.

Hornung, H., Krom, M. D., Cohen, Y. & Bernhard, M. 1993. Trace metal content in deep water sharks from the eastern Mediterranean sea. *Mar Biol.* 115: 331-338.

Hoyos-Padilla, E. M. 2001. Las áreas de crianza de tiburones en el caribe y Golfo de México con un enfoque especial a la laguna de Yalahau en Quintana Roo. Tesis de Licenciatura. UNAM. 90 p.

IPCS. 1981. Environmental Health Criteria 18. Arsenic; World Health Organization: Geneva, Switzerland.

I.A.R.C. (International Agency for Research on Cancer). 1993. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. En: International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 58. IARC Scientific Publications, Lyon. pp. 119-237.

Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México. 636 p.

Lesser, M. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 253-78.

Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.

Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Naccari, C., Martino, D., Calo, M. & Naccari, F. 2005. Heavy metals in liver and muscle of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) caught in the straits of messina (Sicily, Italy). *Environmental Monitoring and Assessment.* 107: 239-248.

Lidner, A., Hinds, T. R., Davidson, R. & Vicenzi, F. 1999. Increased Cytosolic Free Calcium in Red Blood Cells Is Associated With Essential Hypertension Humans, *American Journal of hypertension.* 36: 771-779.

Loon, V. 1985. Selected Methods of Trace Metal Analysis-Biological and Environmental Samples. *Chemical Analysis.* Vol. 80. Wiley-Interscience. Canadá. pp. 44-49.

Luckey, T. D. & Venugopal, B. 1977. *Metal Toxicity in Mammals* (Plenum Press, New York).

Lyle, J. M. 1984. Mercury concentrations in four carcharhinid and three hammerhead sharks from coastal waters of the Northern Territory. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research.* 35:441-451.

Macías-Zamora, J. V., Sánchez, J. L., Ríos, L. M., Ramírez, N., Huerta, M. A. & López, D. 2007. Trace metals in sediments and *Zostera marina* of San Ignacio and Ojo de Liebre Lagoons in the Central Pacific Coast of Baja California, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol.*

Marcotrigiano, G. O. & Storelli, M. M. 2003. Heavy metal, polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues in marine organisms: Risk evaluation for Consumers. *Veterinary Research Communications*, 27 Suppl. 1: 183-195.

Market, M., Andrews, P. C. & Babior, B. M. 1984. Measurement of O² production by human neutrophils. Academic Press, Orlando, Florida. pp. 358-365.

Drossos, G., Lazou, A., Panagopoulos, P. & Westaby, S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Annals of Thoracic Surgery* 59: 169-172.

Manna, P., Sinha, M. & Sil, P. 2007. Protection of Arsenic-Induced Hepatic Disorder by Arjunolic Acid. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 101: 333-338.

Martin, J. H. & Broenkow, W. W. 1975. Cadmium in Plankton: elevated concentrations off Baja California. *Science*. 190: 884-885.

Membrillo, A., Cordova, A. & Hicks, J. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *INCI, dic.* 28(12): 699-704. ISSN 0378-1844.

Méndez, L., Acosta, B., Alvarez-Castañeda, S.T. & Lechuga-Devéze, C. H. 1998. Trace metal distribution along the southern coast of Bahía de La Paz (Gulf of California), Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*. 61: 616-622.

Núñez-Nogueira, G. 2002. Accumulation of zinc and Cadmium in a tropical prawn *Penaeus indicus*. Ph D. University of London. 213 p.

Núñez-Nogueira, G. 2005. Concentration of essential and non-essential metals in two sharks species commonly caught in mexican (Gulf of Mexico) coastline, p. 451-474. In: A. V. Botello. J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hd Hernández

(Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición. Univ. Autón. de Campeche. Univ. Nal. Autón. de México. Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Núñez-Nogueira, G., Bautista, J. & Rosiles, R. 1998. Concentración y distribución de mercurio en tejidos del cazón (*Rhizoprionodon terraenovae*) del Golfo de México. Vet. Méx. 29 (1): 15-21.

Paust, B. & Smith, R. 1986. Salmon shark manual. The development of a commercial salmon shark, *Lamna ditropis*, fishery in the North Pacific. Alaska Sea Grant Rep. 86-01, 430 p.

Pelletier, E. 1995. Environmental organometallic chemistry of mercury, tin and lead: Present status and perspectives. In: A. Tessier and D. R. Turner (Eds). Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons. Toronto. Canada. pp. 103-148.

Pérez, P. & Pérez, J. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev Cub Med Mil. 29(3): 192-198.

Persky, A. M., Green, P. S., Stublely, L., Howell, C. O., Zaulyanov, L., Brzaeau, G. A. & Simpkins J. W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 223: 59-66.

Prager, J. C. 2002. Environmental contaminant refererence data book, volumen I, Wiley-Interscience, USA. pp. 376-379, 800-807, 870-874.

Prange, J. A. & Dennison, W. C. 2000. Physiological responses of five seagrass species to trace metals. Mar Pollution Bull. 41 (7-12): 327-336.

Pratt, H. L., Jr. & Casey, J. G. 1983. Age and growth of the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, using four methods. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40(11): 1944-1957.

Ramírez- González, J. 2002. Captura comercial de tiburones pelágicos en la costa occidental de B. C. S. Tesis de Licenciatura. UABCS. 56 p.

Reinchenback-Klinke, H. H. 1980. Enfermedades de los peces. Acribia. España. 507 p.

Requintina, P. J. & Oxenkrug, G. F. 2005. The In Vitro Effect of Estradiol and Testosterone on Iron-Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain and Kidney Tissues Ann. N.Y. Acad. Sci. 1053: 400-404.

Ribot-Carballal, M. C. 2003. Edad y crecimiento del tiburón mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque 1810) capturado en la costa occidental de B. C. S. sur México. Tesis de Maestría. CICIMAR. 52 p.

Rojas, E., Herrera, L. A., Poirier, L.A. & Ostrosky-Wegman P. 1999. Are metals dietary carcinogens? Mutation Research. 443: 157-181.

Romero, A., Cabaleiro, T., Caride, A. & Lafuente, A. 2008. Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio. Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus de Orense, Las Lagunas, 32004-Orense, España. Rev. Toxicol. 25: 3-11.

Ruiz-Larrea, M. B., Leal, A. M., Martí, C., Martínez, R. & Lacort, M. 1997. Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. J. Physiol. Biochem. Rev. Esp. Fisiol. 53:225-230.

Sañuda-Wihelmy, S. A. & Flegal, A. R. 1996. Trace metal concentrations in the surf zone and in coastal waters off Baja California, Mexico. Environ Sci Technol. 30:1575-1580.

Schmitter-Soto, J. J. 1992. Aspectos autoecológicos de los triglidos (Pisces: Scorpaeniformes) en la costa occidental de B. C. S. Tesis de Maestría. CICIMAR. 98 p.

Shumilin, E., Paez-Osuna, F., Green- Ruíz, C., Sapozhnikov, D., Rodríguez-Meza, G. D. & Godinez-Orta, L. 2001. Arsenic, antimony, selenium and other trace elements in sediments of the La Paz lagoon, Peninsula of Baja California, Mexico. *Mar Pollut Bull.* 42:174-178.

Shumilin, E. N., Rodríguez-Figueroa, G., Bermea, O. M., Baturina, E. L., Hernández, E. & Meza, G. D. R. 2000. Anomalous trace element composition of coastal sediments near the copper mining district of Santa Rosalía, Península of Baja California, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 65: 261-268.

Shiraishi, T., Takahashi, M. & Asada, K. 1994. Generation of superoxide anion radicals and hydroxyl radicals in chloroplast thylakoids. In *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and medicine*, ed. K. Asada, T. Yoshikawa. Amsterdam: Elsevier Sci. pp 31-32.

Sigaud-Kutner, T., Leitão, M. & Okamoto Oswaldo. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39:1008-1018.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295.

Sinderman, C. J. 1989. *Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish.* Vol. 1. Academic Press. San Diego, Calif. 521 p.

Spector, A. 1991. The Lens and Oxidative Stress. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants.* H. Sies (ed). Academic Press Limited. pp. 529-557.

Stadtman, E. R. & Levine, R. L. 2000. Protein oxidation. *Ann.NY Acad. Sci.* 899: 191-208.

Stevens, J. D. 1983. Observations on reproduction in the shortfin mako *Isurus oxyrinchus*. *Copeia*, 1:126-130.

Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K. & Walker, P. A. 2000. The effects of fishing on sharks, rays and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES J. of Mar. Sci.* 57: 476-494.

Storelli, M. M., Ceci, E., Storelli, A., & Marcotrigiano, G. O. 2003. Polychlorinated biphenyl, a heavy metal and methylmercury residue in hammerhead sharks: contaminant status and assessment. *Marine pollution Bulletin.* 46: 1035-1048.

Storelli, M. M., Giacomini-Stuffer, R. & Marcotrigiano G. O. 2002. Mercury accumulation and speciation in muscle tissue of different species of sharks from Mediterranean Sea. Italy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 68: 201-210.

Summerhayes, C. P. & Thorpe, S. A. 1996. *Oceanography. An illustrated Guide.* Manson Publishing. London, UK. 352 p.

Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu,Zn-SOD. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Eds.). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species.* Oxford University Press. R. U. pp. 91-95.

Takahashi, M. & Asada, K. 1988. Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 714-22.

Tarley, C. R. T., Coltro, W. K. T., Matsushita, M. & de Souza, N. E. 2001. Characteristic levels of some heavy metals from brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *J Food Comp Anal.* 14: 611-617.

Taylor, C.G., Nagy, L. E. & Bray, T. M. 1996. Nutritional and Hormonal Regulation of Glutathione Homeostasis. *Current Topics in Cellular Regulation*. 34:189-208.

Turoczy, N. J., Laurenson, L. J. B., Allison, G., Nishikawa, M., Lambert, D. F., Smith, C., Cottier, J. P. E., Irvine, S. B. & Stagnitti, F. 2000. Observations on metal concentrations in three species of sharks (*Daenia calcea*, *Centroscymnus crepidater*, and *Centroscymnus owstoni*) from Southeastern Australian waters. *Journal of Aquaculture, Food and Chemistry*. 48: 4357-4364.

Valeiras, J. & Abad, E. 2006. Descripción del marrajo dientuso (SMA). In: *Field Manual*. International Commission for the conservation of atlantic tunas. pp. 1-9.

Vas, P., 1987. Observation on trace metal concentration in a carcharinid shark *Galeorhinus galeus* from the Liverpool Bay. *Marine Pollution Bulletin*. 18: 193-194.

Velasco, P. 2005. Hábitos alimenticios e isótopos de ^{13}C y ^{15}N del tiburón mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810) en la costa occidental de Baja California Sur. Tesis maestría. CICMAR-IPN. La Paz, BCS. México. 97 p.

Venereo, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*. 31 (2):126-33.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. & Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 192: 95-117.

Walkees, M. P. & Poirier, L. A. 1984. In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium. *Toxicol Appl Pharmacol*. 75: 539- 46.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S. & Rao, K. M. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 36: 1434-1443.

Watling, R. J., McClurg, T. P. & Stanton, R. C. 1981. Relation between Mercury Concentration and Size in the Mako Shark. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 26: 352-358.

Wdzieczak, J., Zalesna, G., Wujec, E. & Peres, G. 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 361-365.

Wilhelm- Filho, D. & Boveris, A. 1993. Antioxidant defences in marine fish-II. Elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 106C: 415-418.

Wintner, S. P. & Cliff, G. 1999. Age and growth determination of the white shark, *Carcharodon carcharias*, from the east cost of the South Africa. *Fish. Bull.* 97(1):153-169.

Wourms, J. P. & Demski, L. S. 1993. The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future prospects. *Environmental Biology of Fishes.* 38: 7-21.

Yamauchi, H., Aminaka, Y., Yoshida, K., Sun, G., Pi, J. & Waalkes, M. P. 2004. Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198:291-6.