



Casa abierta al tiempo

**Empleo de biomarcadores para evaluar la exposición ambiental a tóxicos en *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) de Tecolutla, Veracruz.**

Tesis que presenta  
**Biól. Verónica Ramírez Trejo**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias (Energía y Medio Ambiente)**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
POSGRADO EN ENERGÍA Y  
MEDIO AMBIENTE**

---

**Empleo de biomarcadores para evaluar la exposición ambiental a tóxicos en  
*Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) de Tecolutla, Veracruz.**

---

**TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)**

**PRESENTA:**

**Bióloga Verónica Ramírez Trejo**

Codirectoras:

**Dra. Xochitl Guzmán García**

**Dra. Patricia Ramírez Romero**

Asesor:

**Dr. Alfonso Vázquez Botello**

México D.F., 25 de mayo de 2015

## **Agradecimientos**

La Maestría en Ciencias (Energía y Medio Ambiente) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio 003893; por lo que agradece la beca recibida para el desarrollo de esta tesis, con No. de becario: 303657.

Esta tesis fue desarrollada gracias al apoyo recibido del proyecto *Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental* aprobado por la *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa* (2010-2014), bajo la responsabilidad de la Dra. Xochitl Guzmán García de la UAM-I.

## **Agradecimientos personales**

Doy gracias a Dios por darme las fuerzas necesarias en este difícil camino y permitirme llegar a esta etapa de mi vida al lado de las personas que más amo, así como velar por mí y por toda mi familia.

A mis queridos padres, el Prof. Juan Ramírez Pedraza y la Sra. Sofía Trejo Escamilla. Es imposible agradecerles en un párrafo todo lo que han hecho por mí. Gracias por todos sus esfuerzos, dedicación y sacrificios. Por sembrar en mí la semilla de la superación profesional y darme la oportunidad de salir de casa para perseguir mis sueños y poder alcanzarlos, gracias por el apoyo incondicional y por sus sabios consejos. Ustedes siempre han estado a mi lado motivándome día con día, sin lugar a dudas, SON MI EJEMPLO A SEGUIR.

Un agradecimiento muy especial a mi esposo y compañero de vida Eber Moreno Vázquez, por el apoyo incondicional durante este trayecto, pero sobre todo por tu paciencia y comprensión en momentos difíciles, por escucharme, por nunca dejarme caer a pesar de las circunstancias, por tu confianza y por el cariño que me brindas a cada instante. Este logro es de los dos mi vida. TE AMO MI VIEJITO!!!

También agradezco con mucho cariño a mis hermanas, Rosario, Sandra, Lupita y Reyna, quienes con su ejemplo como la hermana menor que soy, me han enseñado el camino para crecer profesionalmente. Gracias porque además de ser mis hermanas son también mis mejores amigas, LAS QUIERO MUCHO. Mis agradecimientos sinceros a la Dra. Xochitl Guzmán García por aceptar dirigir este proyecto y ser parte de mi crecimiento y formación profesional. Gracias por creer en mí e impulsarme a seguir adelante. Y personalmente quiero agradecerle por todas las oportunidades que me brindó tanto académicamente como laboralmente.

Un agradecimiento profundo a la Dra. Patricia Ramírez Romero, quien dirigió también esta tesis, y me apoyó en todo momento no solo como Codirectora, sino también como Coordinadora del Posgrado e incluso como mi profesora. Muchas gracias Dra. por ayudarme a lograr uno de mis sueños.

De igual manera, a mi asesor el Dr. Alfonso Vázquez Botello, por aceptar formar parte de este proyecto aún sin conocerme y formar parte de mi Jurado. Mil gracias por su apoyo y valiosas aportaciones para este trabajo y por los libros maravillosos que me otorgó, los cuales conservaré con mucho cariño.

A la Dra. Guadalupe Barrera Escorcía, por ser revisora y parte del jurado de este proyecto. Pero mil gracias porque desde mis inicios con este grupo de trabajo siempre he podido contar con su apoyo y sabios consejos.

A la Dra. Marcela Arteaga Silva, la cual tuve la gran oportunidad de tener como profesora, gracias por aceptar la revisión de este proyecto y ser miembro de mi jurado. Le agradezco toda su comprensión y atenciones hacia mi persona.

Al M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez, por formar parte del Jurado y revisor de mi tesis. Es muy grato que uno de mis compañeros y amigos, al cual conozco desde la Licenciatura, haya participado directamente en este proyecto. Gracias Roberto por todos tus consejos y apoyo no solo en el ámbito profesional sino personal.

Mi más sincero agradecimiento a la Biol. e HT. Irma Hernández Calderas quien me enseñó y apoyó con el procesamiento de las muestras, así como en la interpretación de los resultados, además compartió sus conocimientos conmigo y me contagió su amor por la ciencia; también te agradezco Irmita por tu gran amistad, apoyo y comprensión para esos momentos difíciles y de felicidad que compartimos juntas, nunca olvidaré esas vivencias en el laboratorio un tanto chuscas pero que nos hacían el día. Mil gracias mi querida Irmita y a Mario por ser excelentes personas.

A mi gran amiga la Hbiol. Sonia González Rebollar. Tuvimos la oportunidad de conocernos y formar una bonita amistad durante todo este tiempo compartiendo vivencias académicas y personales, que permitieron crecer aceleradamente nuestra amistad. Gracias chinita porque aprendí muchas cosas de ti...Sabes que siempre podrás contar conmigo.

A mis queridos compañeros y amigos del laboratorio, al M. en B. Pedro Román Zepeda, al Biol. José Ángel Vázquez Castro, al pasante en Hidrobiol. Misael Hernández Díaz, a la Hidrobióloga Patsy Ramos y a la M. en C. Pamela Becerra Amezcua, por hacerme los días mas amenos durante este periodo y brindarme su amistad, consejos y su apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Abraham Kobelkowsky Díaz por el apoyo para la identificación taxonómica de la especie en estudio. Gracias por su amable atención y disposición para recibirme en todo momento. Lo admiro como profesor porque es una persona comprometida con su trabajo.

Al laboratorio de Ecotoxicología, lugar que fue como mi segunda casa, en el cual tuve la oportunidad de iniciar y concluir mis estudios de Maestría, muy en especial al área de Histología que extrañaré enormemente.

Agradezco al Laboratorio de Fisiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, por la cuantificación de metales que contribuyeron para los resultados de este proyecto.

Al Sr. Abel Salas Salazar y su apreciable familia, quienes en campo me apoyaron para la obtención de las muestras y aún más porque prestaron parte de su casa para el trabajo en campo.

Muchas gracias a todos que directa o indirectamente colaboraron para realizar este maravilloso trabajo.

## **Comité tutorial**

### **Codirectora:**

**Dra. Xochitl Guzmán García. Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.**

### **Codirectora:**

**Dra. Patricia Ramírez Romero. Departamento Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.**

### **Asesor:**

**Dr. Alfonso Vázquez Botello. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.**

El jurado designado por la  
**Comisión Académica del Posgrado en Energía y Medio Ambiente**  
de la Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis que presentó

**VERÓNICA RAMÍREZ TREJO**

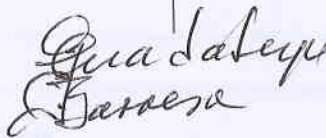
El día **25 de mayo** del año **2015**

**Miembros del Jurado**



**Dr. Alfonso Vázquez Botello**

*Presidente*



**Dra. Guadalupe Barrera Escorcía**

*Secretario*



**Dra. Marcela Arteaga Silva**

*Vocal*



**M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez**

*Vocal*



## Índice general

Resumen .....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Capítulo 1. Antecedentes .....	9
Justificación .....	12
Capítulo 2. Pregunta de investigación e Hipótesis .....	13
Pregunta de investigación.....	13
Hipótesis.....	13
Capítulo 3. Objetivos .....	14
3.1. Objetivo general.....	14
3.2. Objetivos particulares .....	14
Área de estudio .....	15
Capítulo 4. Materiales y métodos .....	16
Determinación taxonómica de la especie .....	16
Parámetros morfométricos e índice de condición .....	16
Parámetros biológicos .....	16
Cuantificación de Hg, Pb y Cr.....	17
Análisis Tisular.....	18
Análisis Histopatológico .....	18
Análisis proteínico.....	18
Integración de resultados.....	19
Capítulo 5. Resultados .....	20
Determinación taxonómica de la especie. ....	20
Parámetros morfométricos e índice de condición .....	21
Parámetros biológicos .....	21
Concentración de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo.....	21
Análisis tisular .....	25
Análisis histopatológico del hígado y músculo .....	28
Matriz de prevalencia o evidencias tisulares .....	30
Biomarcadores proteínicos mediante inmunohistoquímica .....	32
Integración de resultados.....	34
Discusión .....	35

Conclusiones.....	41
Recomendaciones.....	42
Referencias .....	43
Anexos .....	51

## Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de <i>Scomberomorus cavalla</i> , con cuerpo elongado y comprimido dorso-lateralmente. ....	8
Figura 2. Área de estudio. Municipio de Tecolutla, Veracruz.....	15
Figura 3. Caracteres distintivos de la especie <i>Scomberomorus cavalla</i> . ....	20
Figura 4. Concentración de Hg y Cr en hígado y músculo por organismo. ....	22
Figura 5. Concentraciones promedio de metales en hígado y músculo de <i>S. cavalla</i> . ....	24
Figura 6. Aspecto tisular del hígado. En A, se observan hepatocitos de forma poliédrica (1) con su núcleo central característico (flechas) y la disposición de los hepatocitos hacia la vena fue evidente; en B, un vaso sanguíneo en el centro (2) con eritrocitos en su interior (flecha). Tinción H-E. ....	25
Figura 7. Composición tisular de la sección muscular del pez <i>S. cavalla</i> . En A, se distinguen la epidermis (1), la dermis (2) con células de pigmento (flecha), fibras y paquetes musculares en sección longitudinal y transversal respectivamente (3 y 4); en B, acercamiento de las capas de la piel, epidermis (1), dermis (2) con las células de pigmento (flecha) y fibras musculares longitudinales (3). Tinción: H-E. ....	26
Figura 8. Disposición de las fibras y paquetes musculares en <i>S. cavalla</i> . En A, se observan fibras musculares (1) en sección longitudinal con núcleos ovoides periféricos (2) así como estriaciones características (flecha) y un conducto sanguíneo con eritrocitos nucleados (3); en B, en una sección transversal se observan paquetes musculares (2) con núcleos ovoides periféricos (flechas). Se observan en C, los paquetes musculares (1) y la presencia de vasos sanguíneos (3) inmersos en tejido conectivo (2); en D, acercamiento de un vaso sanguíneo (1) y tejido conectivo (2).Tinción H-E. ....	27
Figura 9. Lesiones hepáticas relacionadas con el sistema circulatorio, inflamaciones, centros melanomacrófagos y granulomas. En A, se observa una inflamación focal (3) así como algunos eritrocitos nucleados (flechas); en B, es posible observar un centro melanomacrófago (4) e infiltración en el estroma (flechas); en C y D, se observan granulomas (5). Tinción H-E. ....	28
Figura 10. Lesiones histopatológicas en la unidad morfológica del hígado. En A, se aprecia un centro melanomacrófago en el estroma (1); en B, se observa una zona congestiva (2) considerable; en C, es posible observar secreciones eosinófilas (flechas) así como atrofia de algunos hepatocitos (3); en D, hepatocitos vacuolados (flecha). Tinción H-E. ....	29
Figura 11. Aspecto de áreas congestivas en el músculo de <i>S. cavalla</i> . En A y B, se observa la presencia de un vaso sanguíneo congestivo (1 y 2) con eritrocitos nucleados (flecha). Tinción: H-E. ....	29
Figura 12. Porcentaje de organismos que presentan lesiones de tipo circulatorio, regresivo y progresivo.	30
Figura 13. Localización de proteínas Hsp70 en secciones del hígado (organismo 06) y músculo de <i>S. cavalla</i> . En A, se observa el testigo negativo; en B y C, la presencia de proteínas Hsp70 es evidente por la reacción que se visualiza en rojo en el citoplasma de los hepatocitos (flechas); en D, no se observó la reacción en el tejido muscular. ....	32
Figura 14. Localización de Metalotioneínas en hígado y músculo de <i>S. cavalla</i> . En A, se observa el testigo negativo; en B y C, no se observó la presencia de proteínas MTs en hígado y músculo, respectivamente. ....	33

## Índice de tablas

Tabla 1. Concentración de Hg, Pb y Cr en especies marinas del Golfo de México comparado con los valores de referencia para consumo humano. ....	10
Tabla 2. Parámetros morfométricos e índice de condición de los organismos colectados. ....	21
Tabla 3. Concentración de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo de <i>S. cavalla</i> . ....	23
Tabla 4. Matriz de prevalencia de lesiones asociada al factor de impacto en el hígado de los organismos analizados. ....	31
Tabla 5. Reacción de los anticuerpos Hsp70 y Metalotioneínas en diferentes organismos. ....	32
Tabla 6. Integración de los biomarcadores para el diagnóstico de salud en <i>S. cavalla</i> . ....	34

## Resumen

La cuenca del Golfo de México ha sido gravemente deteriorada, principalmente por algunos contaminantes como plaguicidas, detergentes, fármacos, descargas de aguas residuales, hidrocarburos, metales pesados, entre otros; los cuales generan efectos adversos sobre los organismos. Por esta razón, en los estudios ecotoxicológicos se han propuesto y utilizado biomarcadores tisulares para evaluar el efecto del estrés ambiental. El objetivo del presente trabajo fue realizar un diagnóstico de salud, utilizando biomarcadores en el hígado y músculo del pez *Scomberomorus cavalla* capturado en la zona de Tecolutla, Veracruz. Se colectaron diez organismos de talla comercial y de acuerdo a la recomendación de Padrós (2005); se obtuvieron parámetros morfométricos, biológicos e índice de condición (Barnabé *et al.*, 1996). Se realizó la cuantificación de Hg, Pb y Cr en el hígado y músculo mediante la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Para el análisis tisular se procesaron las muestras histopatológicamente. Se examinaron en el microscopio óptico 75 cortes seriados de hígado y 129 de músculo teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se elaboró una tabla de prevalencia de lesiones a las cuales se asoció al factor de impacto (Bernet *et al.*, 1999). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se determinó la presencia de Hsp70 y Metalotioneínas. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de evidencias para establecer el diagnóstico de salud. La longitud y peso total promedio fue de 83 cm y 3400 g respectivamente. El índice de condición fue de 0.6, el cual corresponde a organismos “delgados y alargados”. Los parámetros biológicos en general demuestran ausencia de parásitos y lesiones macroscópicas. El análisis de metales reveló presencia de Hg en hígado (0.81, 1.13 y 1.6 mg/Kg de peso húmedo) y músculo (0.67, 0.71 y 1.38 mg/Kg de peso húmedo); El promedio obtenido de Hg para ambos tejidos estuvo dentro del mismo orden de magnitud; en el hígado 1.19 mg/Kg y en el músculo 0.92 mg/Kg de peso húmedo Hg; no existe diferencia significativa en la concentración de los dos órganos analizados ( $t=0.8098$ ;  $P=0.46$ ). El Pb fue registrado por debajo del límite de detección ( $<0.01$  mg/Kg) en hígado y músculo. Con respecto al Cr se registraron concentraciones en el hígado de 0.41, 0.45 y 0.53 mg/Kg de peso húmedo y en el músculo 0.46, 0.47 y 0.49 mg/Kg de peso húmedo; El promedio obtenido de Cr en hígado (0.46 mg/Kg de peso húmedo) comparado con el del músculo (0.45 mg/Kg de peso húmedo), no presentó diferencias significativas ( $t=-0.2850$ ;  $P=0.79$ ). Los valores obtenidos de Hg en el músculo, rebasaron los valores de referencia establecidos para el consumo de carne de pescado en la legislación de la UE y solo uno de la nacional. El hígado mostró la estructura tisular característica; se observaron hepatocitos con núcleos centrales y vasos sanguíneos con eritrocitos nucleados. El músculo presentó fibras musculares con estriaciones características rodeadas por tejido conectivo y núcleos ovoides periféricos; El tejido conectivo presentó vasos sanguíneos con eritrocitos nucleados ovalados. Algunas de las lesiones observadas en el hígado fueron vasos congestivos, infiltraciones, inflamaciones focales, secreciones eosinófilas, centros melanomacrófagos y granulomas principalmente; lesiones con factor de impacto entre 1 y 3 (mínima, moderada y severa importancia patológica); El músculo presentó vasos congestivos con factor de impacto 1. La técnica inmunohistoquímica reveló la presencia de Hsp70 en el citoplasma de los hepatocitos y no se detectaron en el músculo; con respecto a las Metalotioneínas, no fueron inmunodetectadas. Los biomarcadores empleados mostraron evidencias de un bajo índice de condición, daños reversibles y progresivos así como la presencia de Hsp70, asociado con la presencia de Hg y Cr. El músculo no está comprometido tisularmente, sin embargo, la presencia de Hg representa un riesgo también para los consumidores, por lo cual es necesario continuar con el monitoreo en la zona de Tecolutla, Veracruz.

## Abstract

The Gulf of Mexico basin has been severely impaired, by the presence of contaminants such as pesticides, detergents, pharmaceuticals, wastewater discharges, oil, and heavy metals, among others, which generate adverse effects on organisms. For this reason, in ecotoxicological studies, tissue biomarkers have been proposed and utilized to evaluate the effect of environmental stress. The aim of this work was to carry out a health diagnosis using biomarkers in the liver and muscle of *Scomberomorus cavalla* caught in the Tecolutla area, Veracruz. Ten organisms of commercial size were collected according to the recommendation of Padrós (2005); morphometric, biological and status index (Barnabé *et al.*, 1996) parameters were obtained. Quantification of Hg, Pb and Cr were obtained for liver and muscle through Inductively Coupled-Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS) technique. For the tissue analysis the samples were processed histopathologically. 75 liver and 129 muscle serially cuts stained with hematoxylin-eosin were analyzed with compound microscope. A lesion prevalence table was elaborated in which an impact factor was associated to them (Bernet *et al.*, 1999). With an immunohistochemical analysis the presence of Hsp70 and Metallothioneins was determined. With the data obtained evidence analysis was conducted to establish the health diagnosis. The average of total weight and length was 83 cm and 3400 g respectively. Index status was 0.6, which corresponds to "thin and elongated" organisms. In general, biological parameters showed an absence of parasites and macroscopic lesions. The metal analysis showed the presence of Hg in liver (0.81, 1.13 and 1.6 mg/Kg wet weight) and muscle (0.67, 0.71 and 1.38 mg/Kg wet weight); the average of Hg for both tissues was within the same order of magnitude; in liver 1.19 mg/Kg and muscle 0.92 mg/Kg wet weight Hg; there was no significant difference in the concentration of the two organs analyzed ( $t = 0.8098$ ,  $P = 0.46$ ). Pb was registered below the detection limit ( $<0.01$  mg/Kg) in liver and muscle. Regarding Cr, concentrations registered in liver were 0.41, 0.45 and 0.53 mg/Kg and muscle 0.46, 0.47 and 0.49 mg/Kg wet weight; the liver Cr average (0.46 mg/Kg wet weight) was not significantly different ( $t = -0.2850$ ;  $P = 0.79$ ) from that of muscle (0.45 mg/Kg wet weight). Hg muscle values exceeded the reference standard established for the consumption of fish meat in the EU and only one exceeded the national legislation. The liver showed the characteristic tissular structure; hepatocytes with central nuclei and blood vessels with nucleated erythrocytes were observed. The muscle presented muscle fibers with characteristic striations surrounded by connective tissue and peripheral ovoid nuclei; the connective tissue presented blood vessels with oval nucleated erythrocytes. Some of the lesions observed in the liver were congestive vessels, infiltration, focal inflammation, eosinophilic secretions, melanomacrophage centers and granulomas; lesions with impact factor between 1 and 3 (minimal, moderate and severe pathological importance). The muscle presented congestive vessels with impact factor of 1. The immunohistochemical technique revealed the presence of Hsp70 in the cytoplasm of hepatocytes but not in the muscle; with respect to metallothioneins, they were not immunodetected. Biomarkers used showed evidence a low status index, progressive and reversible damage and the presence of Hsp70, associated with the presence of Hg and Cr. The muscle is not compromised; however, the presence of Hg may represent a risk to consumers, therefore it is necessary to continue monitoring in the area of Tecolutla, Veracruz.

## Introducción

La Ecotoxicología puede ser definida como la ciencia que estudia los efectos que los contaminantes químicos ejercen sobre la biota (Di Giulio & Hinton, 2008). Esta disciplina juega un papel fundamental en el establecimiento de los criterios de calidad ambiental y su desarrollo es indispensable para la protección de los ecosistemas acuáticos, que incluyen especies de interés comercial que se pescan y cultivan, las cuales, al desarrollarse en ambientes sanos garantizan a su vez la protección de la salud humana (Ramírez-Romero *et al.*, 2012). En los últimos años, esta ciencia ha tomado gran importancia por el aumento y continua presencia de los contaminantes, sobre todo en los ecosistemas acuáticos.

Un claro ejemplo de lo anterior lo constituye la cuenca del Golfo de México, que ha sido gravemente deteriorada, principalmente por la contaminación con plaguicidas, detergentes, blanqueadores, cosméticos, fármacos, descargas de aguas residuales, hidrocarburos, metales, entre otros (Caso *et al.*, 2004).

Los metales están sujetos de forma natural a ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los compartimentos ambientales: suelos, aguas subterráneas y superficiales, aire y seres vivos (Moreno, 2003). Sin embargo, los metales también manifiestan su presencia en las regiones costeras del Golfo de México por las diversas actividades industriales, tales como refinerías de petróleo, la producción de fertilizantes, minería y metalurgia, y desde luego las ciudades costeras con un gran número de habitantes. Las descargas domésticas sin previo tratamiento, aportan grandes volúmenes de lodos enriquecidos con metales como Pb, Zn, Cd y Cr, que se descargan en los ríos o directamente en el mar (Caso *et al.*, 2004). La intervención humana puede modificar considerablemente la concentración de metales en estos compartimentos y facilitar su distribución a partir de las reservas minerales en las que estos se encuentran naturalmente confinados (Moreno, 2003).

Aunque algunos metales son esenciales para los organismos como: Cr, Cu, Fe, Mo, Se y Zn, éstos pueden ser tóxicos si las concentraciones en el medio son elevadas (Espina & Vanegas, 2005). Los metales pesados constituyen un riesgo de contaminación en el medio ambiente, ya que son sustancias con una gran estabilidad química ante procesos de degradación, por lo que no desaparecen del medio ambiente, sino que son transferidos a otros lugares y pueden combinarse con otras sustancias, y dar lugar a formas más tóxicas (Svobodová *et al.*, 1993; Mancera-Rodríguez & Álvarez-León, 2006).

La toxicidad y movilidad relativa de algunos metales tales como el mercurio, el plomo y el cromo, han sido objeto de atención y preocupación entre los científicos y la población en general (Páez-Osuna, 2005a). Cada uno de estos metales presentan diferentes mecanismos tóxicos. El mercurio (Hg) está presente en la naturaleza debido a diferentes fenómenos geológicos que participan en su liberación al ambiente, como el vulcanismo, la desgasificación de la corteza terrestre y la erosión del suelo (Núñez-Nogueira *et al.*, 1998).

Sin embargo, a consecuencia del crecimiento industrial y la contaminación, las concentraciones de este metal han aumentado a nivel mundial y ahora representan una amenaza creciente para la salud humana y la vida silvestre (Stafford & Haines, 1997; Fitzgerald *et al.*, 1998). Existen tres formas químicas del mercurio: mercurio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), monovalente ( $\text{Hg}^{+1}$ ) y mercurio divalente ( $\text{Hg}^{+2}$ ). Cada forma y compuesto del mercurio tiene características específicas. En general, todas las formas químicas del mercurio pueden llegar a bioacumularse, pero el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) se absorbe y acumula más que otras formas (U.S. EPA, 1997). La bioacumulación de mercurio ocurre cuando los organismos vivos, absorben este metal más rápido de lo que sus cuerpos lo pueden eliminar, por lo que el metal se bioacumula en sus tejidos u órganos (Rand *et al.*, 1995; Gray, 2002). El mercurio bioacumulado es transferido de un nivel trófico a otro incrementando su concentración a través de la cadena trófica, lo que se conoce como biomagnificación (Campos, 1987; Regnell & Ewald, 1997; Gray, 2002). En el caso del metilmercurio, la EPA estableció un límite de concentración de 0.3 mg/Kg de peso húmedo, concentración que no debe excederse asumiendo un consumo total de pescado de 0.175 Kg/día. En México, la Norma Oficial Mexicana (NOM-SSA1-027-1993) establece que los peces que contengan concentraciones mayores o iguales a 1.0 mg/Kg de peso húmedo de mercurio total no deben ser consumidos. En las últimas tres décadas se ha incrementado el interés de un importante número de naciones respecto al control y reducción de las emisiones de mercurio, prueba de ello fue la firma del convenio de Minamata en 2013 (UNEP, 2013). Una forma de evaluar la efectividad de la legislación ambiental, es a través de programas de monitoreo, que en el caso del mercurio, deben incluir su acumulación en los ecosistemas acuáticos y sus organismos (Ramírez-Romero, 2011).

El plomo (Pb) es un metal electropositivo con alta afinidad por los grupos sulfhidrilos. Las enzimas que dependen de esos grupos son inhibidas en presencia del Pb. Además, como metal divalente, es similar en algunos aspectos al Ca y puede competir en procesos celulares como la respiración a nivel de las mitocondrias y en algunas funciones neurológicas (Landis & Yu, 1999). Se sabe que el Pb actúa con los ácidos nucleicos, provocando un incremento o decremento en la síntesis protéica. Los efectos por intoxicación crónica del plomo en humanos se agrupan en gastrointestinales, neuromusculares, en sistema nervioso central, hematológicos, renales y reproductivos (Moreno, 2003). Mientras que en peces, la toxicidad aguda por plomo se caracteriza inicialmente por daño al epitelio branquial, provocando que los peces afectados mueran por asfixia. Los síntomas característicos de la toxicidad crónica por plomo incluyen cambios en los parámetros de la sangre con graves daños a los eritrocitos y leucocitos, y cambios degenerativos en los órganos parenquimatosos y daños en el sistema nervioso (Svobodová *et al.*, 1993).

En el caso del cromo (Cr) la forma trivalente y sus sales son las formas más estables. El cromo trivalente es esencial para los seres humanos y se requiere para tener un balance normal en el metabolismo del colesterol, la insulina y la homeostasis de la glucosa (Páez-Osuna, 2005b). Las sales de la forma hexavalente son las menos estables y más reactivas biológicamente (Hellawell, 1989). En el medio marino las especies



dominantes son las formas hexavalentes  $\text{Cr}^{+6}$  (Bruland, 1983) producidas mediante procesos industriales convirtiéndose en un riesgo para la salud de los organismos; sin embargo, las altas concentraciones de este metal en el ambiente también se deben a los lodos de perforación, el procesamiento de combustibles fósiles y la incineración de los sólidos municipales (Páez-Osuna, 2005b). Se reconoce que todos los alimentos contienen cromo en niveles de 0.5 ppm de peso húmedo, sin embargo, la ingesta diaria de cromo en humanos se ha estimado en un intervalo de 0.03 a 0.1 mg/persona/día (Páez-Osuna, 2005b).

Dentro de los metales con relevancia toxicológica se encuentran: el mercurio, el plomo y el cromo. Estos pueden tener implicaciones en la fisiología de los organismos que se desarrollan en los sistemas acuáticos (Páez-Osuna, 2005b). Por ello, algunos programas de biomonitorio (como el que lleva a cabo la FDA registrando concentraciones de Hg en peces comerciales y mariscos desde 1990 hasta el 2010) sugieren la evaluación de las concentraciones de metales críticos en especies de peces de consumo humano. Estos organismos constituyen excelentes bioindicadores, ya que permiten inferir en la calidad del ambiente e identificar aquellas especies de consumo que representen un riesgo para la población humana.

Un bioindicador o indicador biológico es característico de un medio ambiente, cuantifica la magnitud del estrés, las características del hábitat y el grado de exposición al estresor o el grado de respuesta ecológica a la exposición (De la Lanza *et al.*, 2000). El uso de bioindicadores permite realizar una visión integral y retrospectiva de las cualidades del medio en el que se desarrollan los organismos acuáticos. Las características generales para la selección de los bioindicadores son las siguientes: su relevancia biológica, relevancia social, sensibilidad a estresores, y su amplitud de respuesta a estresores y sitios, entre otras (Farris & Van Hassel, 2007). Los organismos bioindicadores son sensibles a los cambios que se presenten en su medio y son capaces de ofrecer información sobre este, mismo que se relaciona y traduce directamente en su estructura o fisiología. Esta capacidad dependerá entonces de factores genéticos, de su propio desarrollo y de las condiciones ambientales donde habite (Capó-Martí, 2007).

Los peces son considerados como buenos indicadores de la calidad del medio, por lo que una gran diversidad y abundancia de peces en ríos, lagos y mares indican un ambiente sano para ellos y para las demás formas de vida (Helfman *et al.*, 1997). La especie *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) comúnmente conocida como Peto, juega un papel importante como depredador tope y su ausencia puede causar aumentos drásticos en las poblaciones presa, alterando de manera significativa el equilibrio de los ecosistemas marinos y costeros (Díaz & Aguilar, 2008). Además, los hábitos alimentarios, el rápido crecimiento y la alta exigencia metabólica para el estilo de vida pelágica de esta especie, puede dar lugar a la incorporación de altas concentraciones de metales en sus tejidos, incluyendo el músculo, lo cual constituye un riesgo para la salud humana (Kuklyte, 2012; Lacerda *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 1996). Se sabe que el consumo de peces marinos contaminados es la principal fuente conocida de exposición humana

para algunos metales como el mercurio, el plomo o el cromo (Fitzgerald & Clarkson, 1991).

El efecto tóxico de los metales en los organismos indicadores puede evaluarse a través de biomarcadores. Un biomarcador, se define como una respuesta biológica: bioquímica, fisiológica, morfológica o histopatológica que se asocia a la exposición de agentes xenobióticos y proporciona advertencias tempranas del daño provocado por los contaminantes (Huggett *et al.*, 1992; Martínez-Jerónimo, 1991). Los biomarcadores pueden clasificarse en diferentes categorías dependiendo del nivel de organización biológica: 1) enzimas de biotransformación (que participan en la detoxificación de xenobióticos y sus metabolitos); 2) productos de biotransformación, 3) aminoácidos y proteínas, 4) hematológicos, 5) inmunológicos, 6) reproductivos y endócrinos, 7) neuromusculares, 8) genotóxicos y 9) fisiológicos-morfológicos (Farris & Van Hassel, 2007).

Las respuestas fisiológicas y morfológicas pueden ser evaluadas a través de la histopatología, ya que esta permite detectar a nivel tisular, las respuestas tempranas generadas por el efecto de los contaminantes (Guzmán-García, 2007). La histopatología ha sido utilizada ampliamente en organismos acuáticos como los peces, para evaluar el efecto de los contaminantes por exposiciones ambientales (Bernet *et al.*, 1999). La histopatología se ha propuesto como biomarcador porque se encuentra en una posición intermedia con respecto a los niveles de organización biológica (entre el átomo y el organismo) y representa un método rápido para detectar efectos, especialmente crónicos, en varios tejidos y órganos, además se considera que los cambios histológicos aparecen como una respuesta a mediano plazo a estresores subletales (Adams *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1993). La relevancia de una lesión depende de su importancia patológica, es decir, cómo afecta a la función del órgano y la capacidad de los organismos como los peces para sobrevivir. Esto se toma en cuenta por un Factor de importancia o impacto (FI) asignado a cada alteración observada en la descripción histológica (Bernet *et al.*, 1999).

En un nivel más fino de organización biológica, también se ha propuesto la evaluación de biomarcadores proteínicos, enzimáticos, así como el examen de los tejidos y células mediante técnicas histoquímicas y citoquímicas, las cuales brindan información de la composición química celular, así como de los elementos estructurales y su localización. La demanda y gran popularidad por la identificación de sustancias específicas a través de métodos de inmunohistoquímicos ha abierto una nueva era para la histopatología y la histotecnología (AFIP, 1995). Asimismo, algunas proteínas que pueden evaluarse por medio de la inmunohistoquímica como las Hsp70 y las Metalotioneínas (MTs), se han utilizado para evaluar el estrés ambiental ya que se sobreexpresan en diferentes órganos ó tejidos como: branquias, gónadas, hígado y músculo, entre otros, como resultado de la exposición a estresores ambientales diversos (Clark *et al.*, 1997).

Las proteínas HSP se sobreexpresan cuando las células son sometidas a distintos estímulos como el estrés del *shock* calórico, radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, metales pesados, entre otros (Coronato *et al.*, 1999). Las HSP son un biomarcador de exposición de la contaminación ambiental en una gran variedad de biota, muestran el efecto de un contaminante que afecta a un organismo en un intervalo de tiempo, integran diversos aspectos de daño proteínico como el incremento de proteínas no plegadas junto con un aumento del desplegamiento y formación de agregados de proteínas, todo lo cual provoca una respuesta de la célula intervenida por una síntesis molecular de proteasas y chaperones moleculares, quienes intentarán reparar el daño proteico, por lo anteriormente expuesto, las Hsp agregan valor al biomonitoreo ambiental (Bierkens, 2000; Cruz-Rodríguez & Chu, 2002; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2000; Nollen & Morimoto, 2002; Radlowska & Pempkowiak, 2002).

Por su parte, las Metalotioneínas (MTs) son proteínas termoestables y solubles en agua, que carecen de aminoácidos aromáticos. Se caracterizan por presentar un bajo peso molecular (6-10 kD) y una secuencia de 61 o 62 aminoácidos, con una elevada proporción de cisteína, un aminoácido azufrado, que representa entre un 20 y 30% de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas) (Ureña-Robles, 2007). Aunque están presentes en un gran número de tejidos diferentes, se encuentran predominantemente en el hígado y riñón de vertebrados, y en la glándula digestiva e intestino de invertebrados (Roesijadi, 1992). La síntesis de MTs puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen metales, hormonas y toxinas (Klaassen *et al.*, 1999), siendo los metales los inductores más potentes, por lo que se considera a la MT como un buen biomarcador de exposición a metales (Roesijadi, 1992).

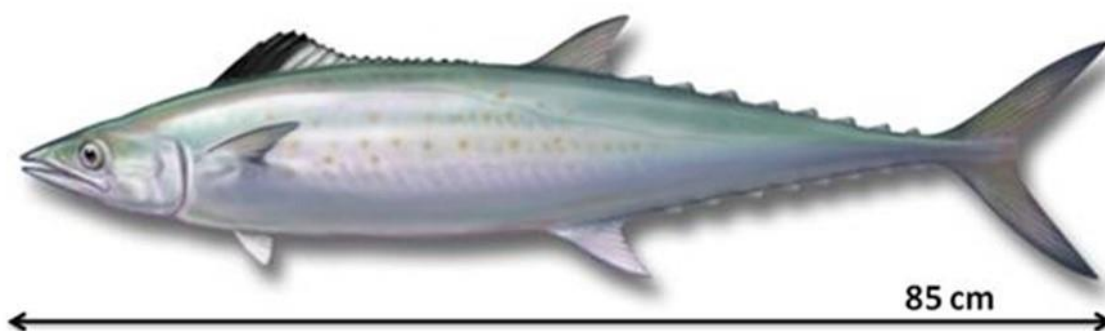
Los biomarcadores empleados en los estudios ecotoxicológicos se han evaluado en diferentes órganos o tejidos para conocer los efectos inducidos por los contaminantes. Uno de los órganos de mayor interés ha sido el hígado, ya que desde el punto de vista morfológico así como fisiológico, es un componente glandular del sistema digestivo encargado de varias funciones que incluyen: asimilación de nutrientes, producción de bilis, desintoxicación y mantenimiento de la homeostasis metabólica del cuerpo (procesamiento de carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas). También juega un papel importante en la síntesis de proteínas plasmáticas, como la albúmina y el fibrinógeno, y factores de complemento (Genten *et al.*, 2009; Di Giulio & Hinton, 2008). La estructura y función normal del hígado en los peces lo hacen un órgano destino para los contaminantes, por lo cual, estudios morfológicos, histológicos, inmunohistoquímicos y moleculares se han propuesto en este órgano para detectar alteraciones causadas por el efecto de los contaminantes (Di Giulio & Hinton, 2008).

Otro órgano de interés en los estudios ecotoxicológicos es el músculo de los peces. Se reconocen dos tipos de músculo: liso y estriado, dividiéndose este último en esquelético y cardíaco. El músculo estriado de tipo esquelético de los peces es el encargado de proveer el movimiento y forma la mayor parte comestible del

cuerpo (Takashima & Hibiya, 1995). En este tejido existen marcadores potencialmente inducibles de contaminación ambiental, que incluyen la alteración de la actividad locomotora, así como lesiones tisulares que se generan por la exposición a contaminantes del tipo de los pesticidas o metales (Koca *et al.*, 2005; Mughal *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). La acumulación de contaminantes en el músculo representa un riesgo para el propio organismo al afectar su actividad locomotora, y puede tener impacto en la salud humana por consumo al representar la parte comestible de los peces.

#### Características generales de *Scomberomorus cavalla*.

La especie *S. cavalla* ó Peto por su nombre común en México, pertenece a la Familia Scombridae, Orden Perciformes, Clase Actinopterygios. Es una especie marina y pelágica, que generalmente alcanza una profundidad de 5 a 15 metros. Se distribuye en el Atlántico en aguas tropicales y subtropicales. Se considera que alcanza la madurez en un intervalo de longitud de 45 a 114 cm. Su cuerpo es elongado y comprimido dorso-lateralmente (Figura 1). Es piscívoro, pero también se alimenta de algunos invertebrados como camarones y calamares. Es una especie longeva, ya que puede llegar a vivir más de diez años. Se considera una especie importante en la pesca recreativa, comercial y artesanal (Collette & Nauen, 1983).



**Figura 1. Representación esquemática de *Scomberomorus cavalla*, con cuerpo elongado y comprimido dorso-lateralmente.**

De acuerdo con el Anuario Estadístico de Pesca (2012), el peso total anual desembarcado de Peto en México fue aproximadamente de 3,884,530.56 Kg, siendo las zonas de captura aquéllos estados colindantes con el Golfo de México como: Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y Veracruz. En éste último estado, en el mes de abril de 2012, se observó un mayor peso desembarcado con 286, 785 Kg, mientras que el mes de octubre representó el más bajo con 64, 214 Kg (SAGARPA-CONAPESCA, 2012). Particularmente se tiene registrado que la captura de Sierra-Peto en el municipio de Tecolutla, corresponde a una captura anual de 3000 t, lo cual representa el 46% del total estatal (Quiroga *et al.*, 2002).

## Capítulo 1. Antecedentes

### Presencia de metales en peces

En últimos años se ha reportado la presencia de contaminantes como los metales pesados en tejidos de peces pelágicos mayores como el Peto distribuidos en el Golfo de México (Tabla 1).

Cai en el 2005, determinó niveles de mercurio en peces pelágicos mayores capturados en el noroeste del Golfo de México, encontrando que los depredadores tope pueden bioacumular altas concentraciones de mercurio. Una de las especies analizadas fue *Scomberomorus cavalla*, el cual presentó concentraciones de 0.96 mg/Kg peso húmedo. Además, en todas las especies analizadas en ese trabajo, se encontró una correlación positiva entre la longitud de los organismos y los niveles de mercurio. Dos años mas tarde, Adams y McMichael (2007) registraron concentraciones más elevadas, entre 0.94 mg/Kg y 1.51 mg/Kg de Hg total en el músculo de Peto colectado en el Océano Atlántico y Golfo de México, respectivamente. Kuklyte (2012) detectó una concentración de 1.04 mg/Kg de Hg en el músculo de Peto colectado en el Golfo de México. Los datos reportados indican que los organismos capturados en el Golfo de México superaron los valores de referencia para el consumo de carne de pescado establecidos por la Administración de Alimentos y Fármacos (*U.S. Food and Drug Administration; FDA*) y la Norma Oficial Mexicana NOM-SSA1-027 (NOM-SSA1-027-1993) que establecen 1.0 mg/kg de Hg total máximo, asimismo se rebasó el valor de referencia establecido en la Unión Europea que es de 0.5 mg/Kg (2007).

Existen estudios previos referentes a las concentraciones de Hg y de otros metales críticos en los tejidos de en *Scomberomorus cavalla*. Ploetz *et al.* (2007) midieron los niveles de Pb, Cu, Cd y Zn en hígado y músculo de *S. cavalla* colectado en Alabama, USA. Los resultados mostraron, para el caso del Pb, una concentración significativamente menor en el hígado (1 mg/Kg) que en las muestras de músculo (1.8 mg/Kg). En contraste, los niveles de Cu, Cd y Zn fueron mayores en el hígado que en el tejido muscular.

El Cr no ha sido reportado para esta especie, sin embargo, en otros depredadores tope y de importancia comercial como el tiburón, Mendoza-Díaz *et al.* (2013) reportaron una concentración de 0.70 mg/Kg en organismos capturados en la Laguna de Tamiahua, Veracruz. Los resultados no rebasaron los valores de referencia establecidos en la legislación internacional. Desafortunadamente, México no cuenta con los criterios para establecer los valores de referencia para Cr en tejidos de especies de consumo.

**Tabla 1. Concentración de Hg, Pb y Cr en especies marinas del Golfo de México comparado con los valores de referencia para consumo humano.**

Región	Metal	Órgano	Concentración (mg/Kg peso húmedo)	Referencia
Noroeste del Golfo de México	Hg	Músculo ( <i>S. cavalla</i> )	0.96	Cai, 2005
Oceáno Atlántico Golfo de Mexico (sur-este USA)	Hg	Músculo ( <i>S. cavalla</i> )	0.94 <b>1.51</b>	Adams y McMichael, 2007
Golfo de México (Venice, LA, Freeport, TX y Port Aransas, TX)	Hg	Músculo ( <i>S. cavalla</i> )	<b>1.04</b>	Kuklyte, 2012
<b>Valores de referencia para el consumo de carne de pescado</b>	Hg	Músculo	<b>0.5</b>	Unión Europea, 2007
			<b>1.0</b>	FDA, 2001; NOM-SSA1-027
Alabama, USA	Pb	Músculo Hígado ( <i>S. cavalla</i> )	<b>*1.82</b> <b>*1.0</b>	Ploetz <i>et al.</i> , 2007
<b>Valores de referencia para el consumo de carne de pescado</b>	Pb	Músculo	<b>0.2</b>	<i>Food and Agriculture Organization (FAO)</i>
			<b>0.3</b>	Unión Europea
			<b>1.0</b>	NOM-SSA1-027
Tamiahua, Veracruz	Cr	Hígado (tiburón)	<b>*0.70</b>	Mendoza <i>et al.</i> , 2013
<b>Valores de referencia para el consumo de carne de pescado</b>	Cr	Músculo	<b>1.0</b>	FAO; FDA

\* peso seco

Para evaluar los efectos tóxicos por la exposición a algunos metales en los organismos acuáticos, se han realizado estudios histopatológicos que permiten observar lesiones a nivel tisular. Se ha reportado que la exposición a niveles altos de mercurio, provoca alteraciones en los epitelios branquiales y dérmicos, reducción en la absorción de los aminoácidos y azúcares en el intestino, e inhibición de enzimas intestinales cuando son expuestos por medio de la dieta a una concentración de 10 mg/Kg durante 4 meses (Berntssen *et al.*, 2004). Por otro lado, los efectos crónicos y agudos del plomo en los peces, incluyen lesiones histopatológicas, deformidades, neurotoxicidad, anemia hemolítica e inhibición en la síntesis de hemoglobina, aún en concentraciones tan bajas del elemento en el agua como de 8 µg/L (Davies *et al.*, 1976). En el caso del Cr hexavalente se ha observado que en peces marinos provoca problemas respiratorios y decoloración en los tejidos (Páez-Osuna, 2005b).

Mohamed (2009) realizó un estudio en el Lago Qarun, el cual recibe grandes aportes de aguas domésticas de la provincia de Faiyoum, Egipto. Analizó las estructuras histológicas del músculo, hígado, branquia, riñones e intestino de la *Tilapia zillii* y de *Solea vulgaris*. Entre las respuestas reportó degeneración vacuolar en los hepatocitos, áreas focales de necrosis y fibrosis, agregaciones de células inflamatorias entre los hepatocitos, dilatación y congestión en los sinusoides sanguíneos y la formación de trombosis en las venas

centrales. Algunas lesiones histológicas observadas en el músculo incluían degeneración en fascículos musculares con áreas focales de necrosis, atrofia de los haces musculares y edema entre los haces musculares. Éstas lesiones histopatológicas observadas en hígado y músculo de las especies analizadas, fueron catalogadas como lesiones reversibles y progresivas, inducidas probablemente por la contaminación ambiental que existe en el lago.

Por otro lado, algunas pruebas de toxicidad como los bioensayos, también han sido ampliamente utilizadas para evaluar las respuestas biológicas en los organismos. De Oliveira *et al.* (2008) realizaron un bioensayo con machos adultos de pez cebra (*Danio rerio*) alimentados con metilmercurio con el fin de determinar la bioacumulación de este contaminante en el músculo y observar cambios ultraestructurales en el tejido muscular de los peces expuestos. Los principales cambios ultraestructurales que observaron fueron una disminución de la superficie inter-paquete, mitocondrias con formas variables, tamaños y desorganización de crestas, también una disminución del área superficial y superficies inter-paquetes. Con base en éstos resultados concluyeron que el metilmercurio afecta la estructura de las células fibrosas musculares de *D. rerio* después de la exposición trófica incluso a dosis bajas. La acumulación de metales pesados en tejidos grasos como el hígado, no solo provoca lesiones a nivel tisular, sino también cambios a nivel bioquímico, como la sobreexpresión de algunas proteínas como las Hsp70 y las Metalotioneínas (Eriksson, 2000).

Los metales presentan diferentes mecanismos de bioacumulación, dependiendo de su biodisponibilidad y órgano destino. Rajeshkumar *et al.* (2013) determinaron el factor de bioacumulación de Fe, Mn, Zn, Cu, Pb y Cd en branquia e hígado de *Chanos chanos* proveniente de la isla de Kaattuppalli, Chennai, India, así como la expresión de Hsp70 en los mismos órganos, concluyendo que el factor de bioacumulación en orden decreciente fue Fe>Zn> Cu>Pb>Cd y la inducción de Hsp70 en branquia e hígado de los peces fue mayor en los sitios más contaminados. Por otra parte, Alvarado *et al.* (2007) determinaron la inmunolocalización de MTs por la exposición a Cd en hígado, riñón, bazo, branquia y músculo de *Scophthalmus maximus* mediante microscopía electrónica. Observaron que la mayor expresión de MTs se presentó en el epitelio branquial; en hepatocitos y riñón la inmunodetección fue débil, mientras que en el bazo y músculo no hubo inmuno-reacción. Los estudios ultraestructurales con microscopio electrónico de transmisión, revelaron que las MTs inducidas por el Cd en el hígado de esta especie se localizaron en el citoplasma de los hepatocitos. Con estos resultados, los autores proponen que la cuantificación de la expresión específica de MTs puede ser utilizada en programas de biomonitoreo como un biomarcador de la exposición a Cd en ambientes acuáticos.

## **Justificación**

En México los estudios realizados en las comunidades ícticas en sitios degradados son pocos, y no se cuenta con un seguimiento en términos de espacio y tiempo de los cambios ambientales.

A pesar de que existen datos de la presencia de contaminantes en organismos de importancia comercial, pocos reportes incluyen la zona norte del estado de Veracruz, incluyendo Tecolutla, Ver. En este sitio no existe un registro ambiental a pesar de su importancia comercial, turística y ecológica.

Ante la carencia de programas de biomonitoreo en nuestro país, es pertinente utilizar herramientas que permitan evaluar el efecto del estrés ambiental sobre los organismos. El uso de técnicas analíticas para determinar la concentración de los contaminantes en los tejidos de los organismos, combinada con la aplicación de biomarcadores, ha sido ampliamente recomendada para la evaluación del impacto ambiental. Este tipo de estudios, también proporciona información que contribuye a prevenir el impacto en la salud humana por consumo, al representar los peces extraídos de este sitio, como una fuente de alimentación para el ser humano. En consecuencia este trabajo utilizó el Peto (*S. cavalla*) de la zona de Tecolutla, para determinar la concentración de metales críticos y evaluar su estado fisiológico mediante la aplicación de biomarcadores tisulares y proteínicos como una alternativa para la evaluación del estrés ambiental.



## **Capítulo 2. Pregunta de investigación e Hipótesis**

### **Pregunta de investigación**

¿La concentración de metales y la aplicación de biomarcadores permitirán determinar el estado de salud del pez Peto (*S. cavalla*) y la evaluación del estrés ambiental?

### **Hipótesis**

Si la especie *Scomberomorus cavalla* colectada en Tecolutla, Veracruz se está desarrollando en condiciones de estrés ambiental, los efectos se podrán valorar determinando la concentración de metales en sus tejidos y evaluando biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica.

## **Capítulo 3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

Determinar la concentración de Hg, Pb y Cr en los tejidos de *Scomberomorus cavalla* y evaluar su estado de salud mediante la aplicación de biomarcadores para establecer el efecto del estrés ambiental.

### **3.2. Objetivos particulares**

1. Caracterizar la especie en estudio desde el punto de vista taxonómico y morfométrico.
2. Emplear indicadores macroscópicos de salud como biomarcadores fisiológicos para conocer el índice de condición de *S. cavalla*.
3. Determinar la concentración de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo como un parámetro de referencia de las condiciones ambientales en las que se desarrollan los organismos.
4. Analizar la estructura tisular del hígado y músculo de *S. cavalla* para reconocer los cambios morfofisiológicos en los tejidos.
- 5.- Determinar mediante biomarcadores tisulares si existen alteraciones histopatológicas asociadas al Factor de impacto para conocer el estado fisiológico de los organismos.
6. Asociar los biomarcadores proteínas de estrés (Hsp70) y Metalotioneínas en hígado y músculo de *S. cavalla* al estrés ambiental.
7. Establecer un diagnóstico de salud de *S. cavalla* resumiendo las líneas de evidencia observadas con los biomarcadores utilizados.

## Área de estudio

El municipio de Tecolutla, Veracruz se localiza entre los paralelos  $20^{\circ} 15'$  y  $20^{\circ} 36'$  de latitud norte; los meridianos  $96^{\circ} 46'$  y  $97^{\circ} 13'$  de longitud oeste y a una altitud entre 0 y 300 m. Colinda al norte con los municipios de Gutiérrez Zamora, Papantla y el Golfo de México; al este con el Golfo de México y el municipio de Nautla; al sur con los municipios de Nautla, San Rafael, Martínez de la Torre y Papantla; al oeste con los municipios de Papantla y Gutiérrez Zamora (Figura 2). Ocupa el 0.74 % de la superficie del estado. Cuenta con 307 localidades y una población total de 24 258 habitantes. El tipo de clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (98 %) y cálido subhúmedo con lluvias en verano (2 %). Es un lugar donde una parte de la población se dedica a la agricultura, ganadería, al comercio y otro tanto a la pesca (INEGI, 2009). Entre las especies capturables en los esteros están el ostión, la jaiba, la acamaya, y el pez lagarto, entre otras. En lo que respecta a la pesca ribereña predominan el cangrejo azul, cangrejo cacerola, cangrejo ermitaño, entre otros, y en cuanto a la pesca marina se encuentran el sábalo, la jaiba de mar y el Peto (Castillo-Huertero, 2000). De acuerdo con los pescadores, la temporada de pesca deportiva del Peto en Tecolutla se realiza en el mes de junio. Tecolutla es una importante zona turística debido su cercanía con el Distrito Federal, sin embargo, es una región para la cual existen escasos estudios en cuanto a su riqueza faunística y calidad del sistema.

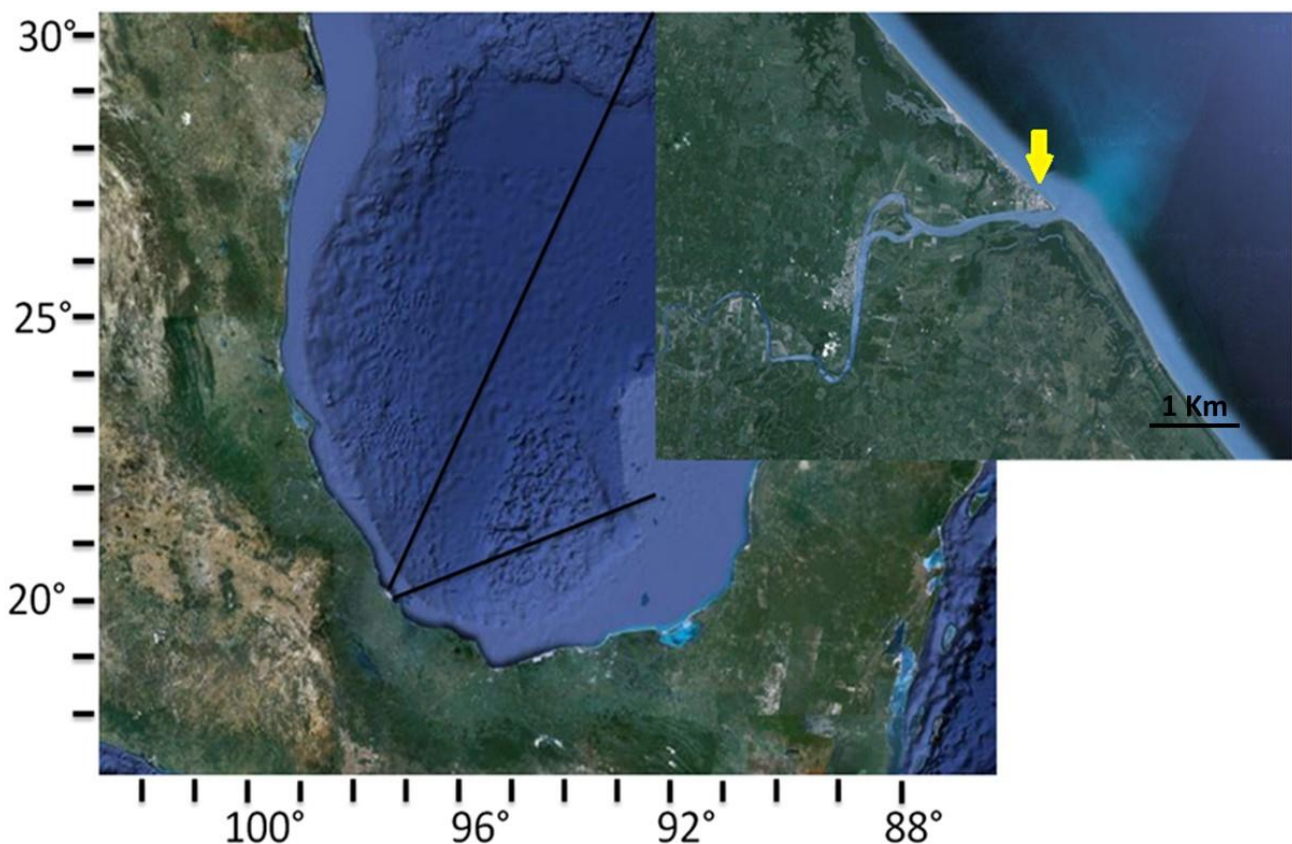


Figura 2. Área de estudio. Municipio de Tecolutla, Veracruz.

## Capítulo 4. Materiales y métodos

Colecta: Se obtuvieron 10 organismos (de extracción comercial) de la especie *Scomberomorus cavalla*, comúnmente conocido como Peto (en los meses de mayo y diciembre de 2013 y marzo de 2014).

En campo se registraron los parámetros morfométricos y biológicos y se realizó la disección para obtener las muestras de hígado y músculo del Peto; dichas actividades se describen con detalle más adelante.

### Determinación taxonómica de la especie

La determinación taxonómica de la especie se llevó a cabo con la Guía de Identificación de especies FAO en el Laboratorio de Peces de la UAM-I. Los organismos una vez disectados, se preservaron bajo congelación y se colocaron en hieleras para que fueran transportados hacia el laboratorio de la UAM-I.

### Parámetros morfométricos e índice de condición

A todos los organismos se les midieron la longitud total (cm) y la longitud patrón (cm) con un ictiómetro, y se obtuvo el peso total (g) mediante una balanza.

Para calcular el índice de condición (IC), se utilizó la relación entre el peso y longitud total, mediante la fórmula propuesta por Maddock y Burton (1999):

$$\text{IC} = \frac{(\text{Peso total})}{(\text{Longitud total}^3)} \times 100$$

Los valores referenciales para el IC se establecieron de acuerdo a los intervalos propuestos por Barnabé *et al.* (1996), considerados como: <1= peces delgados y alargados; >1= especímenes bien nutridos y 1.4= hembras preparadas para desovar.

### Parámetros biológicos

Los peces se evaluaron macroscópicamente a través de parámetros biológicos como: presencia de ecto y endoparásitos, presencia de lo que pudieran ser hongos o bacterias, deformidades en tejido blando, lesiones aparentes, así como malos olores. Cada parámetro se registró en un formato estandarizado del área de Histología del Laboratorio de Ecotoxicología denominado “Datos biológicos de la muestra” (Anexo 1).

Cada organismo se disectó para obtener el hígado y tejido muscular. El hígado fue extraído por completo, obteniendo el peso de cada uno con una balanza marca OHAUS® modelo CT6000-S, mientras que el tejido

muscular (aproximadamente 300 g) fue tomado del área dorsal de acuerdo a Adams y McMichael, (1999) y García-Hernández *et al.* (2007), ya que es la región usada para consumo humano. Una vez obtenidas las muestras de interés, se dividieron en dos secciones, una para la cuantificación de metales y la otra para la evaluación de biomarcadores tisular y proteínico (histopatología e inmunohistoquímica).

### **Cuantificación de Hg, Pb y Cr**

Las muestras de hígado y de músculo se colocaron en bolsas de plástico previamente etiquetadas y se colocaron congeladas en una hielera para su traslado hacia el laboratorio, posteriormente se preservaron a una temperatura de 3°C (Método 3052 EPA, 1996) hasta su procesamiento.

Para el análisis de metales se utilizaron 3 muestras de hígado y 3 de músculo de organismos diferentes, las cuales se colocaron en cajas de Petri para su secado en una estufa (marca BLUE M® modelo SW-11TA) a 60°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo, el tejido fue macerado y colocado nuevamente en bolsas de plástico para su resguardo. La cuantificación de Hg, Pb y Cr se realizó mediante la técnica de Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS, por su nombre en inglés *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), marca AGILENT® Serie 7500 del Laboratorio de Fisicoquímica Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Finalmente se realizó un análisis estadístico, mediante la prueba ANOVA de una vía y t-Student de dos muestras empleando el programa NCSS & PAS Trial 2001.

Para el análisis de metales se realizó un ajuste de las concentraciones registradas ya que estas fueron determinadas en peso seco, considerando que la humedad relativa en el pescado es de 65-70 % (Primo, 1997). Los valores se reportan en peso húmedo para realizar la comparación con las normas correspondientes.

## **Análisis Tisular**

Las muestras de hígado y músculo obtenidas de los 10 organismos, se colocaron en *cassettes* histológicos (en proporciones de 1 cm<sup>2</sup>) y fueron fijadas con formol amortiguado al 10 %. Transcurrido este tiempo, se deshidrataron e infiltraron en un procesador automático de tejidos (marca LEICA® modelo TP1020) (Anexo 2). Los tejidos se incluyeron en un medio de parafina marca PARAPLAST® de Leica Microsystems, mediante un centro de inclusión (marca LEICA® modelo EG1140H). Cada submuestra resultante se cortó por duplicado con ayuda del micrótopo (marca MICROM® modelo HM315) a un grosor de 5 µm. Los cortes histológicos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina por tiempos estandarizados (Anexo 3). Cada preparación histológica se observó al microscopio óptico (marca CARL ZEISS® Primo Star) y se tomaron fotomicrografías de la unidad morfofisiológica del hígado que incluye parénquima formado principalmente por hepatocitos y estroma hepático y del músculo que incluye las fibras musculares estriadas, así como sus núcleos localizados en la periferia de la fibra muscular a diferentes aumentos (10x y 40x) mediante una cámara (marca CANON® modelo Power Shot G10) acoplada al microscopio y a un ordenador (marca TOSHIBA® modelo Satellite) con el software CANON® Utilities Remote Capture DC versión 3.1.0.5 (2008). Cada fotomicrografía fue editada con el software CARL ZEISS® AxioVision versión 4.8 (2006-2008). Cabe señalar que los organismos 03 y 04 se emplearon para la estandarización de la técnica histológica, por lo cual no se pudieron considerar para el análisis histopatológico y proteínico.

## **Análisis Histopatológico**

El análisis histopatológico del hígado y músculo, se realizó mediante la construcción de una matriz de prevalencia de lesiones asociadas con disturbios circulatorios, cambios regresivos y progresivos en los órganos estudiados, contabilizando el número de lesiones presentes por cada organismo. Posteriormente se procedió a obtener el porcentaje de prevalencia de cada una en los tejidos analizados. Finalmente cada lesión tisular, se le asoció a un Factor de impacto propuesto por Bernet *et al.* (1999), quien señala que un valor “0” corresponde a la ausencia de lesiones tisulares, “1” a lesiones fácilmente reversibles (mínima importancia patológica), “2” lesiones reversibles (moderada importancia patológica) y “3” lesiones generalmente irreversibles (severa importancia patológica).

## **Análisis proteínico**

El análisis de biomarcadores proteínicos para valorar la presencia de Hsp70 se realizó en los organismos 01, 05 y 06, los cuales presentaron lesiones con factor de impacto 1, 2 y 3 en hígado; y en los organismos 05 y 06 para el análisis del músculo ya que presentaron lesiones con factor de impacto 0.

El análisis de Metalotioneínas se llevó a cabo en los organismos 02, 08 y 09 que presentaron lesiones con factor de impacto 1, 2 y 3 en hígado; y en los organismos 01 y 10 con factor de impacto 1 y 0 en el músculo.

Los muestras se procesaron de manera similar a la técnica histológica hasta el proceso de inclusión. Los bloques se cortaron a 5 micras y se colocaron en portaobjetos cargados electroestáticamente (SFH1103, BIOCARE MEDICAL®) para desparafinar e hidratar hasta agua destilada. A partir de este momento se realizó la recuperación de sitios antigénicos con solución DIVA (recuperador pH 6 DAKO®: K0679), con una olla de presión (BIOCARE MEDICAL®). Posteriormente se realizaron lavados con solución amortiguadora (TBS AUTOWASH BUFFER 40X TWB946L2J, BIOCARE MEDICAL®). Las muestras se colocaron en una cámara de incubación (HOT BAR HB259-BC, BIOCARE MEDICAL®) y se procedió a agregar el bloqueador enzimático (peroxidized-1-PX968G, BIOCARE MEDICAL®) por 5 minutos, se realizaron enjuagues con TBS. Pasado este tiempo, se les agregaron a las muestras los anticuerpos primarios Hsp70 (*Heat shock 70KDa Protein 1A*, Genetex) y MTs (*Mmp14a+b antibody*, Genetex). Se utilizaron testigos negativos a los cuales no se les colocó el anticuerpo primario. Se adicionaron 150 µl de los anticuerpos anti-Hsp70 en una dilución 1:100 y anti-metalotioneínas en una dilución 1:300, dejándolos en incubación por 30 minutos. Se enjuagó con buffer TBS nuevamente y se adicionaron 200 µl de anticuerpo secundario (Mach 4 universal AP-Probe, UP536L, BIOCARE MEDICAL®) por 30 minutos. Se realizaron lavados con TBS y se utilizaron 200 µl de reactivo de sistema de detección (MACH 4 MR AP-Polymer MRAP 536L, BIOCARE MEDICAL®) por 30 minutos. Se enjuagó con TBS y posteriormente se adicionó 1 ml de reactivo del sistema de revelado (Warp Red Chromogen, WR806CHC, BIOCARE MEDICAL®) durante 5 minutos, y se realizaron lavados con agua destilada. Se contrastó con hematoxilina regresiva de Tacha's (BIOCARE MEDICAL®). El montaje de los tejidos se hizo por medio de xilol-resina 50 %. Finalmente se realizó la observación de los tejidos al microscopio óptico (marca CARL ZEISS® Primo Star) para localizar la reacción antígeno-anticuerpo de Hsp70 y MTs en los compartimientos celulares del hígado y músculo del Peto. Se analizaron tres secciones del hígado y dos del músculo, analizando un total de 9 cortes para el hígado y 6 para el músculo.

### **Integración de resultados**

Los resultados obtenidos de la concentración de metales, los biomarcadores macroscópicos (IC y parámetros biológicos), tisulares (histopatología asociada a un Factor de impacto) y proteicos (Hsp70 y MTs) evaluados en el presente trabajo, se resumieron en una tabla de integración para realizar el diagnóstico de salud del Peto.

## Capítulo 5. Resultados

### Determinación taxonómica de la especie.

Los peces recolectados en Tecolutla, Veracruz presentaron los siguientes caracteres morfológicos distintivos: cuerpo elongado y comprimido dorso-lateralmente, con el hocico más pequeño que el resto de la cabeza, parte posterior del maxilar expuesto, llegando a una vertical desde el margen posterior del ojo; presenta dos aletas dorsales ligeramente separadas, la primera usualmente con 15 espinas, de 8 a 9 pínulas dorsales, la línea lateral se curva hacia abajo abruptamente debajo de la segunda aleta dorsal; Presentan un color negro iridiscente verde azulado con costados plateados (Figura 3). Estos caracteres indicaron que se trata de la especie *Scomberomorus cavalla* (Cuvier, 1829) de la Familia Scombridae.



Figura 3. Caracteres distintivos de la especie *Scomberomorus cavalla*.



### Parámetros morfométricos e índice de condición

Los peces *S. cavalla*, presentaron promedios de 82.6 cm de longitud y 3400 g de peso (Tabla 2). El resultado del índice de condición (IC) evidenció un promedio de 0.6, el cual corresponde a organismos “delgados y alargados” de acuerdo a los intervalos establecidos por Barnabé *et al.* (1996) como se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2. Parámetros morfométricos e índice de condición de los organismos colectados.**

Parámetro	Longitud total (cm)	Peso total (gr)	IC
Promedio	82.6	3400	0.6
Desviación estándar	5.57	492.18	0.06

Barnabé *et al.* (1996): <1= peces delgados y alargados; >1= especímenes bien nutridos y 1.4= hembras preparadas para desovar).

### Parámetros biológicos

El 90% de los organismos no mostró ninguna lesión aparente, hongos o bacterias, deformidades en tejido blando, malos olores o ectoparásitos, mientras que el 10 % registró la presencia de endoparásitos en hígado y gónada.

### Concentración de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo.

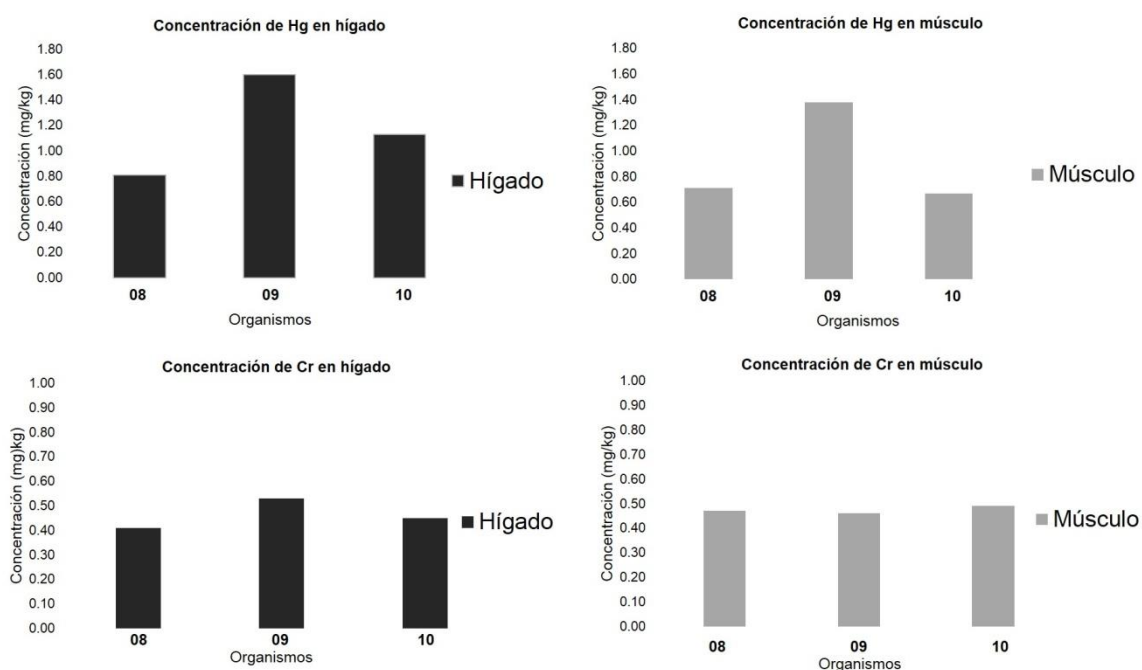
El análisis de metales en el hígado y músculo, indicó presencia de mercurio y cromo, el plomo no fue detectado en el análisis.

En el hígado de los 3 ejemplares analizados, se registraron concentraciones de Hg en cada uno de 0.81, 1.13 y 1.6 mg/Kg (peso húmedo) en los organismos denominados como 08, 10 y 09. En el músculo las concentraciones fueron de 0.67, 0.71 y 1.38 mg/Kg (peso húmedo) en los organismos 10, 08 y 09, respectivamente. El organismo 09 presentó mayor concentración de Hg tanto en el hígado como en el músculo (Figura 4), sin embargo no se observó diferencia significativa entre las concentraciones registradas de Hg en hígado y en músculo (P=0.37).

Las concentraciones de plomo se encontraron por debajo del nivel de detección del equipo (0.01 mg/Kg) para hígado y músculo; por lo cual, las concentraciones registradas en ambos tejidos se encontraron por debajo de los valores referenciales de Pb para el consumo de pescado de acuerdo con La FAO (*Food and*

*Agriculture Organization*) que establece 0.2 mg/Kg de peso húmedo, la UE (Unión Europea) 0.3 mg/Kg (peso húmedo) y 1.0 mg/Kg de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-SSA1-027 (NOM-SSA1-027-1993).

Los valores registrados de Cr en el hígado de los 3 ejemplares analizados fueron de 0.41, 0.45 y 0.53 mg/kg (peso húmedo) de los organismos 08, 10 y 09 respectivamente. En el músculo se registraron concentraciones de 0.46, 0.47 y 0.49 mg/Kg (peso húmedo) en los organismos 09, 08 y 10 respectivamente. La concentración más alta de Cr se registró en el hígado del organismo 09, como en el caso del Hg; sin embargo, la concentración más alta registrada en el músculo, correspondió al organismo 10 (Figura 4). No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones registradas de Cr en hígado y en músculo ( $P= 0.37$ ).



**Figura 4. Concentración de Hg y Cr en hígado y músculo por organismo.**

La concentración de los metales analizados (Hg, Pb y Cr) se muestra en la Tabla 3 donde también se aprecian los valores de referencia establecidos en la legislación nacional e internacional para consumo de peces. La concentración de Hg en tejido muscular rebasó los valores de referencia para el consumo de carne de pescado de acuerdo con la UE (Unión Europea) que establece como límite 0.5 mg/Kg de mercurio total, mientras que la FDA (*Food and Drug Administration*) y la Norma Oficial Mexicana NOM-SSA1-027 (NOM-SSA1-027-1993) establecen 1.0 mg/Kg. Los valores registrados en el músculo de *S. cavalla* se encontraron también arriba de estos límites. Con respecto al hígado no existen normas publicadas específicamente para este órgano, las concentraciones registradas (Tabla 3) para ambos tipos de tejido se encontraron dentro del mismo orden de magnitud (en el hígado 1.19 y en el músculo 0.92 mg/Kg de Hg de peso húmedo), sin diferencia significativa entre los contenidos de Hg ( $t= 0.8098$ ;  $P= 0.46$ ).

En el caso del Cr, la FAO (*Food and Agriculture Organization*) y la FDA establecen 1.0 mg/kg como el valor de referencia. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no se rebasaron los límites aceptables de Cr establecidos por la legislación mencionada. La concentraciones promedio registradas en el hígado fueron de 0.46 mg/Kg (peso húmedo) y en el músculo de 0.45 mg/Kg (peso húmedo), estas concentraciones tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos analizados ( $t = -0.2850$ ;  $P = 0.79$ ). La Tabla 3 y Figura 5 muestran el análisis comparativo de los metales analizados en hígado y músculo.

**Tabla 3. Concentración de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo de *S. cavalla*.**

Tejido	No. organismo	Concentración (mg/Kg peso húmedo)		
		Hg	Pb	Cr
<b>Hígado</b>	08	0.81	<0.003	0.41
	09	<b>1.6</b>	<0.003	0.53
	10	1.13	<0.003	0.45
Promedio		<b>1.19 ± 0.39</b>	NA	<b>0.46 ± 0.06</b>
<b>Músculo</b>	08	0.71	<0.003	0.47
	09	<b>1.38</b>	<0.003	0.46
	10	0.67	<0.003	0.49
Promedio		<b>0.92 ± 0.39</b>	NA	<b>0.45 ± 0.01</b>
FAO ( <i>Food and Agriculture Organization</i> )		NE	0.2	1.00
UE (Unión Europea)		0.5	0.3	NE
FDA ( <i>Food and Drug Administration</i> )		1.0	NE	1.00
NOM-SSA1-027 (Norma Oficial Mexicana)		1.0	1.0	NE
Estadística		$t = 0.8098$ $P = 0.46$		$t = -0.2850$ $P = 0.79$
Promedio ± D.E				
NA= NO APLICA				
NE= NO EXISTE				

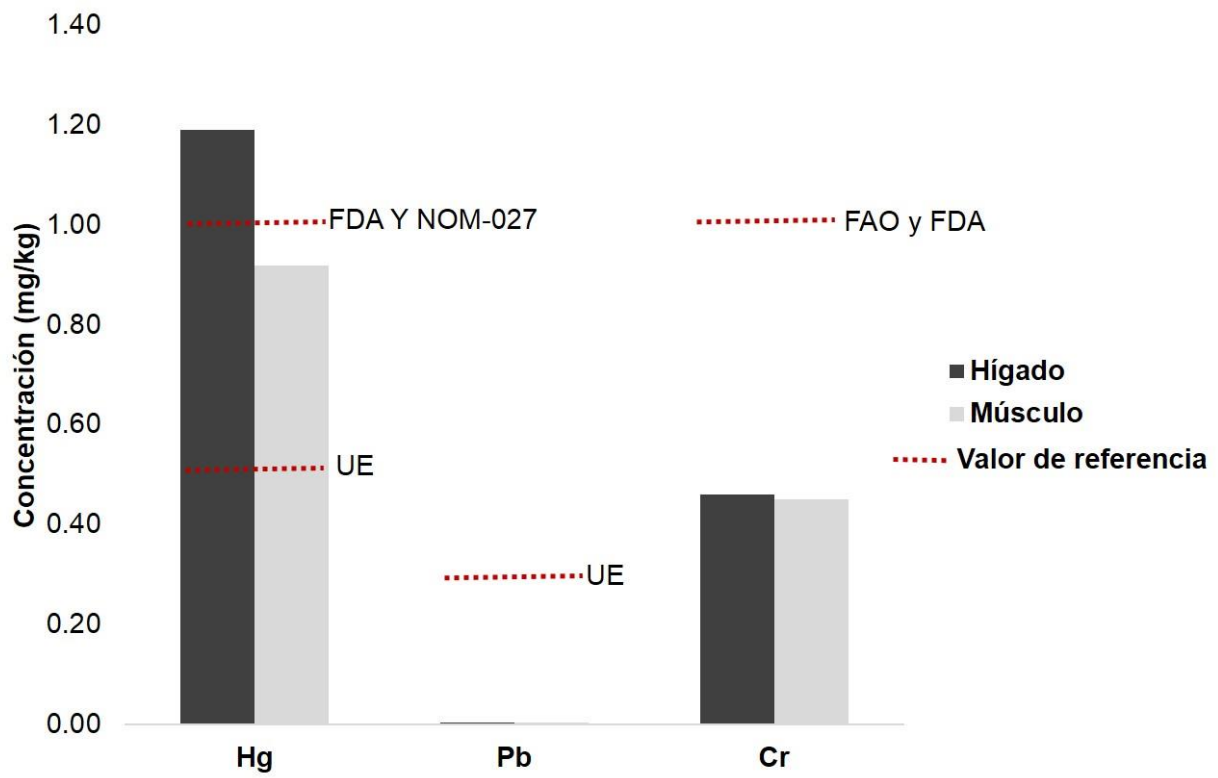


Figura 5. Concentraciones promedio de metales en hígado y músculo de *S. cavalla*.

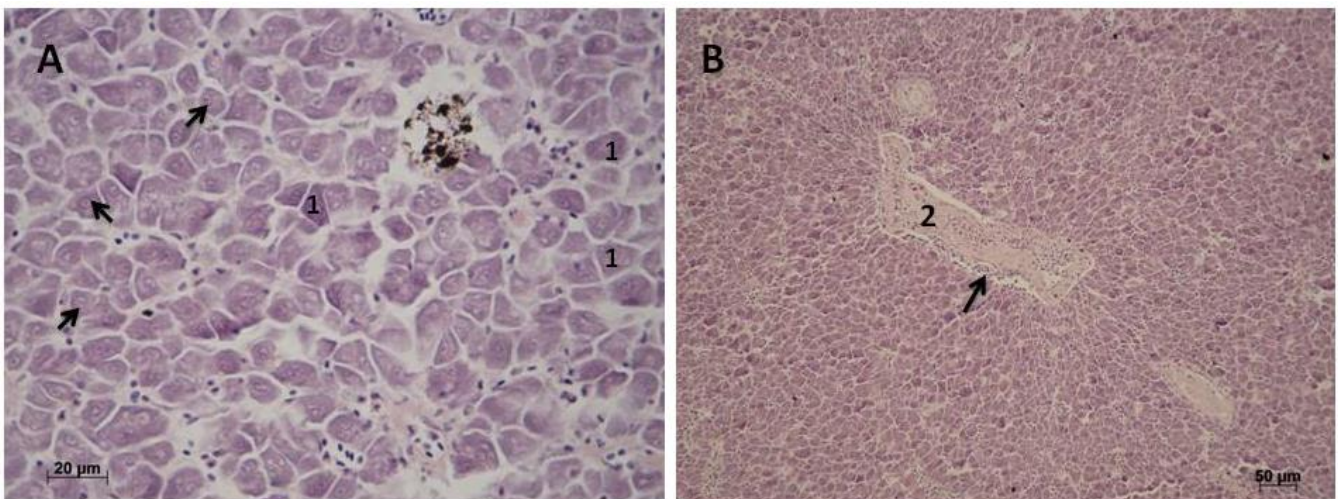
## Análisis tisular

Este análisis integró la observación de 75 cortes seriados de hígado y 129 de músculo teñidos con Hematoxilina-Eosina.

La descripción de los tejidos en condiciones normales se presenta a continuación.

Descripción tisular del hígado.

Histológicamente, en la unidad morfológica del hígado se observó parénquima hepático y estroma. El parénquima estuvo formado principalmente por hepatocitos de forma poliédrica con un núcleo redondo central y su nucléolo característico (Figura 6: A); mientras que el estroma presentó tejido conectivo laxo, el cual sostiene al parénquima; también se observaron vasos sanguíneos formados por una pared interna de células endoteliales con eritrocitos nucleados (Figura 6: B). Esta composición se asocia con la función de biotransformación, desintoxicación e irrigación sanguínea del órgano.

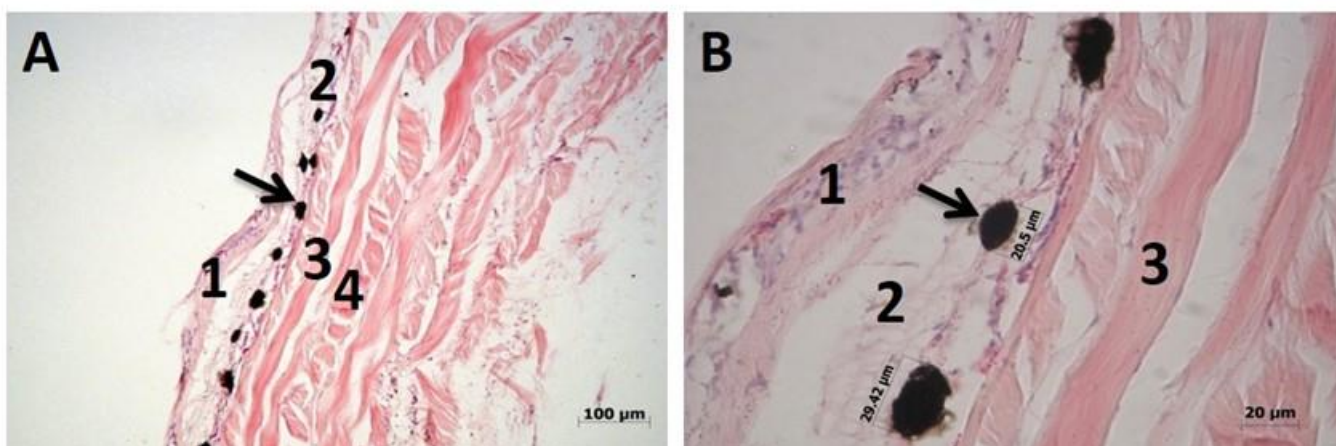


**Figura 6. Aspecto tisular del hígado. En A, se observan hepatocitos de forma poliédrica (1) con su núcleo central característico (flechas) y la disposición de los hepatocitos hacia la vena fue evidente; en B, un vaso sanguíneo en el centro (2) con eritrocitos en su interior (flecha). Tinción H-E.**

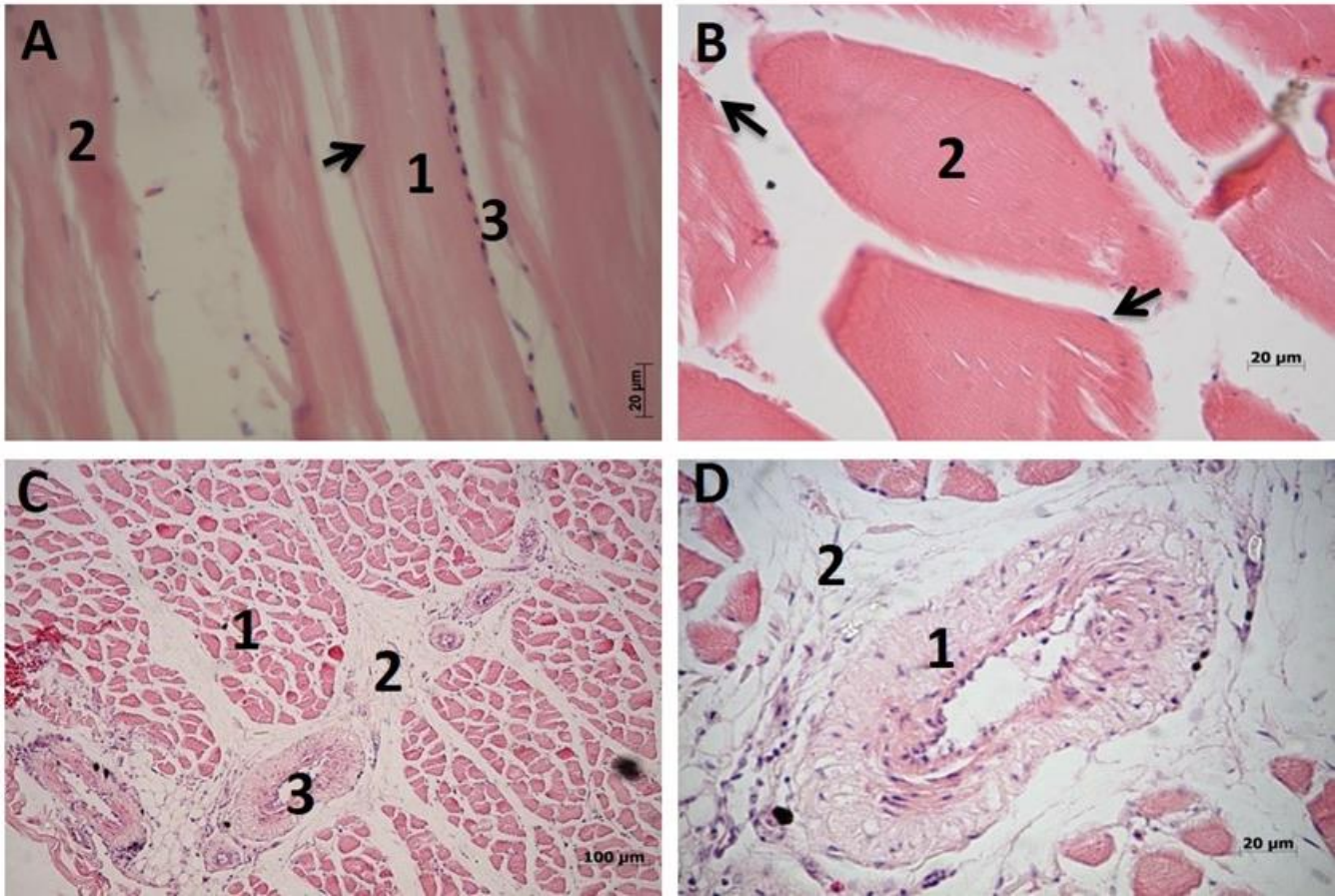
Descripción tisular del músculo.

La sección tisular de la línea lateral del músculo incluye la parte más expuesta, es decir la piel, la cual está compuesta por dos capas principales: epidermis y dermis. En los cortes histológicos con piel, fue posible diferenciar las capas que conforman la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 7: A y B). Dentro de la dermis se observaron células de pigmento de color oscuro alineadas uniformemente llamadas melanóforos (Figura 7: A y B). El diámetro de las células de pigmento varió entre 20.5 y 29.4 µm (Figura 7: B). En el músculo, es característica la presencia de fibras musculares con estriación cruzada y varios núcleos ovoides localizados en la periferia de la fibra muscular (Figura 8: A), mientras que en un corte

transversal se observaron paquetes musculares de forma triangular, hexagonal o como polígonos irregulares con sus núcleos ovoides periféricos y rodeados por tejido conectivo (Figura 8: B). Dentro del tejido conectivo se observó la presencia de vasos (Figura 8: C y D), los cuales permiten la irrigación sanguínea del órgano. También fue posible observar los espacios intercelulares del tejido conectivo (Figura 8: D). La estructura típica del músculo (fibras musculares estriadas) está relacionada con la actividad locomotora en los peces.



**Figura 7.** Composición tisular de la sección muscular del pez *S. cavalla*. En A, se distinguen la epidermis (1), la dermis (2) con células de pigmento (flecha), fibras y paquetes musculares en sección longitudinal y transversal respectivamente (3 y 4); en B, acercamiento de las capas de la piel, epidermis (1), dermis (2) con las células de pigmento (flecha) y fibras musculares longitudinales (3). Tinción: H-E.

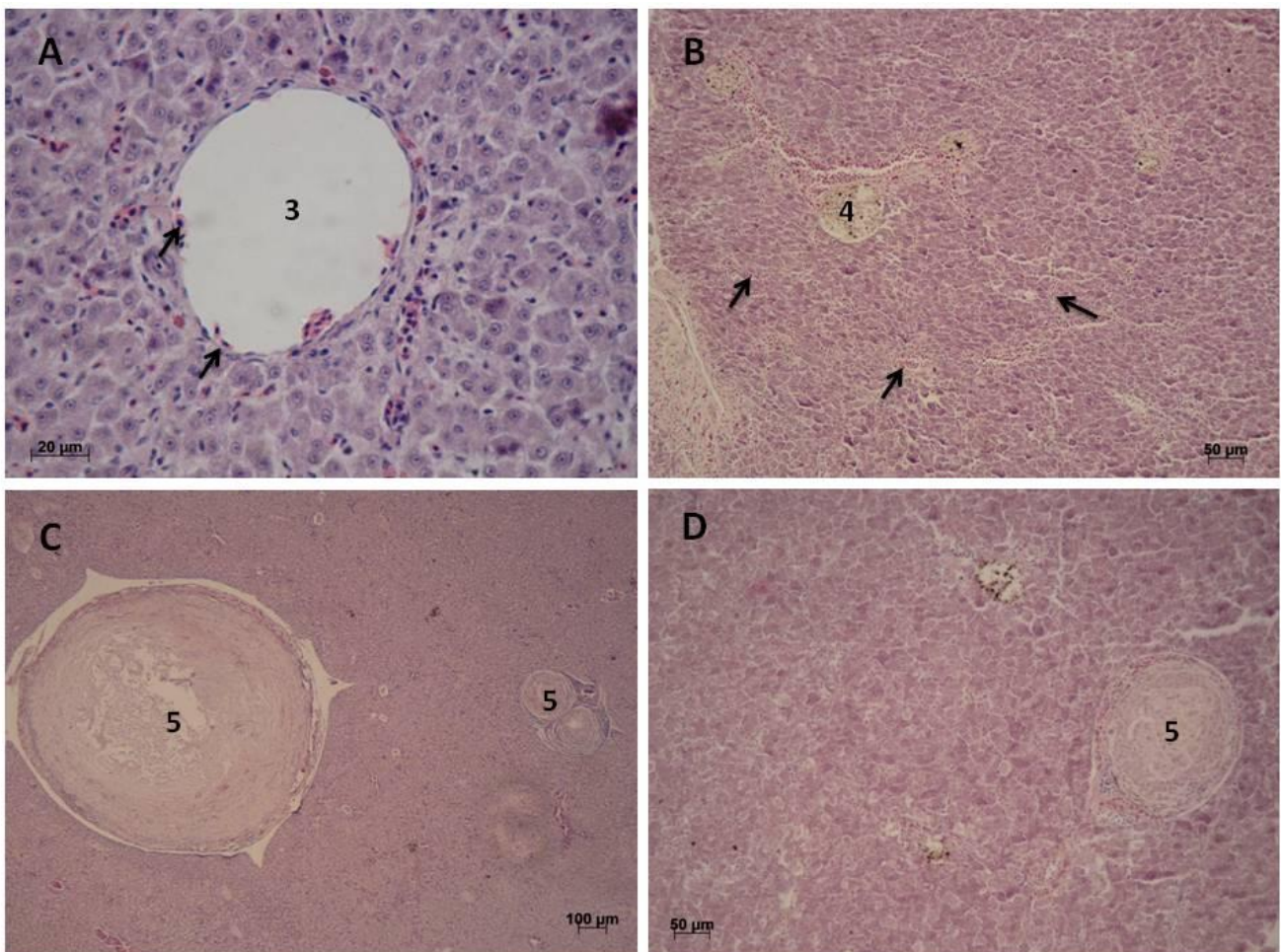


**Figura 8.** Disposición de las fibras y paquetes musculares en *S. cavalla*. En A, se observan fibras musculares (1) en sección longitudinal con núcleos ovoides periféricos (2) así como estriaciones características (flecha) y un conducto sanguíneo con eritrocitos nucleados (3); en B, en una sección transversal se observan paquetes musculares (2) con núcleos ovoides periféricos (flechas). Se observan en C, los paquetes musculares (1) y la presencia de vasos sanguíneos (3) inmersos en tejido conectivo (2); en D, acercamiento de un vaso sanguíneo (1) y tejido conectivo (2). Tinción H-E.

## Análisis histopatológico del hígado y músculo

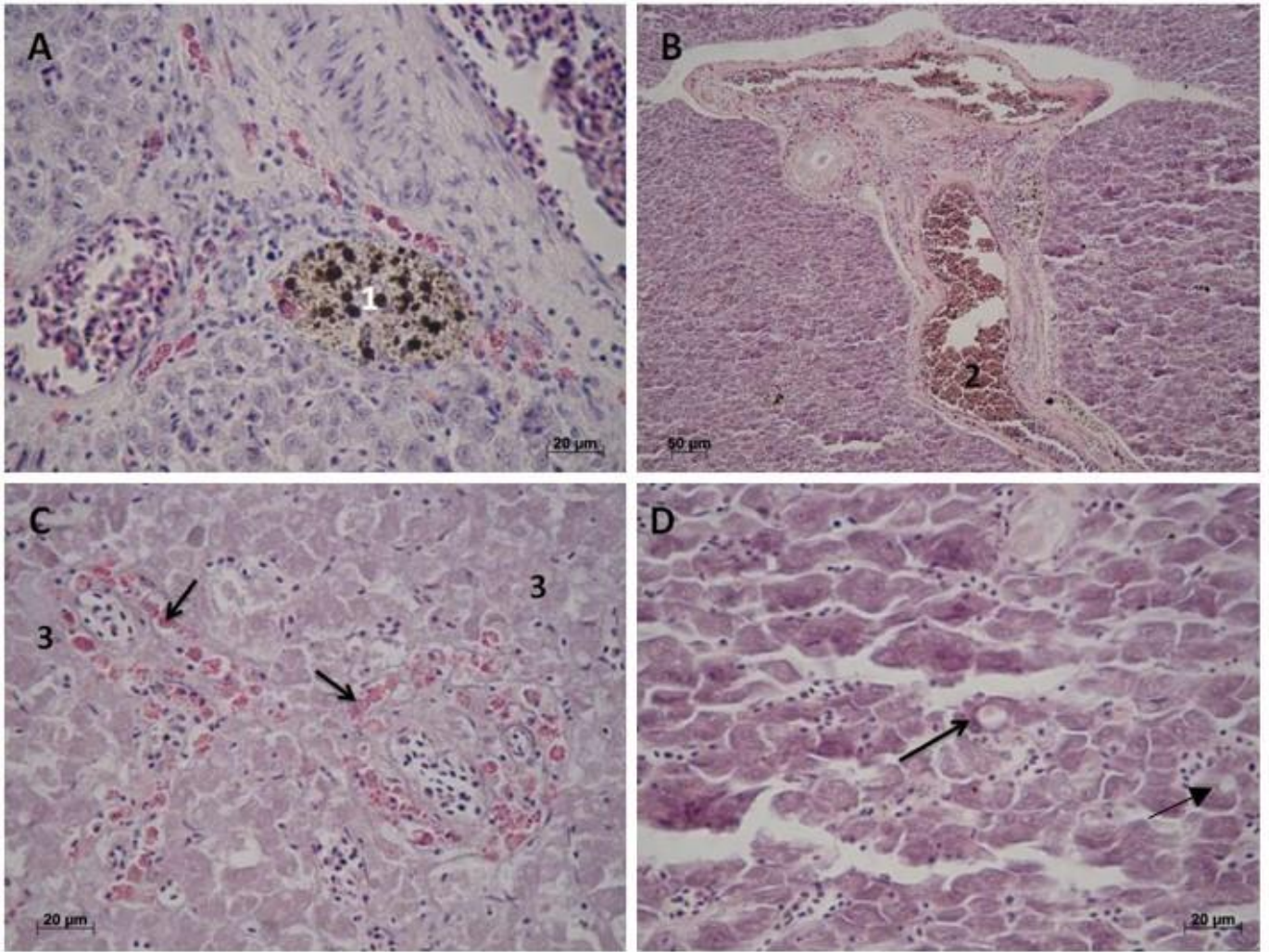
Un total de 8 ejemplares presentó lesiones, estos representan el 80% de los ejemplares analizados. Las lesiones se apreciaron en ambos tejidos.

Las lesiones observadas en el hígado fueron de diferente índole; el parénquima hepático mostró inflamaciones focales (Figura 9: A), infiltración de eritrocitos en el estroma hepático (Figura 9: B) y granulomas derivados de tejido conectivo (Figura 9: C y D). También se observaron centros melanomacrófagos de color pardo asociados a los conductos sanguíneos (Figura 10: A), vasos congestivos (Figura 10: B), secreciones eosinófilas (Figura 10: C) y hepatocitos vacuolados (Figura 10: D). Estas respuestas tisulares se asocian con mecanismos de protección (inflamación, secreciones eosinófilas), disturbios del sistema circulatorio (vasos congestivos e infiltraciones) y con mecanismos inmunológicos (granulomas y centros melanomacrófagos). De manera análoga, el análisis histopatológico del músculo, registró lesiones circulatorias como vasos sanguíneos congestivos, donde se observaron eritrocitos nucleados y ovalados (Figura 11: A y B).

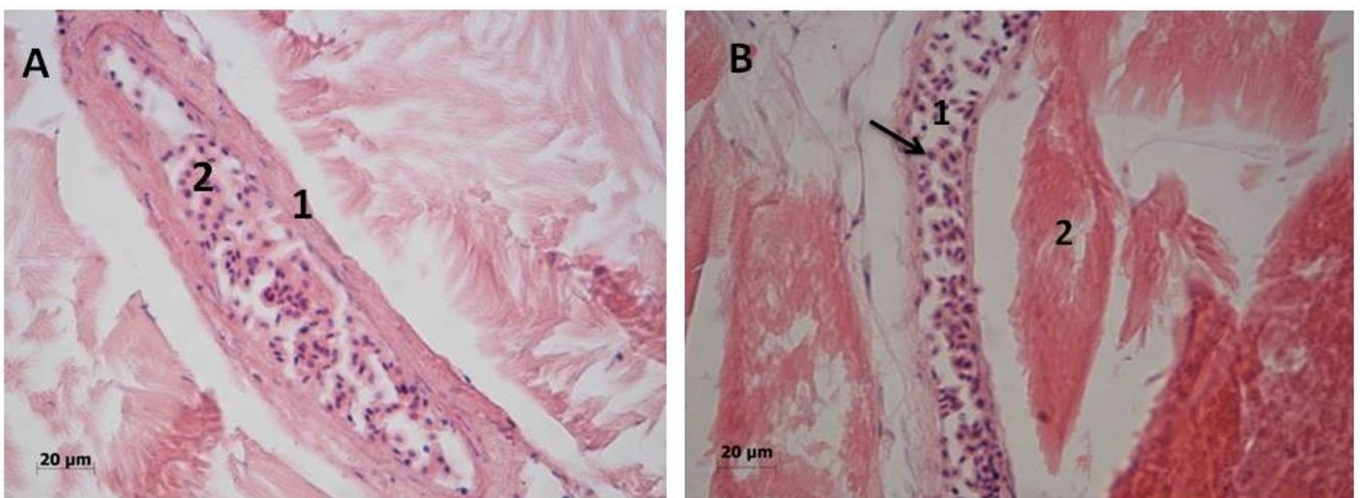


**Figura 9. Lesiones hepáticas relacionadas con el sistema circulatorio, inflamaciones, centros melanomacrófagos y granulomas. En A, se observa una inflamación focal (3) así como algunos eritrocitos nucleados (flechas); en B, es posible observar un centro melanomacrófago (4) e infiltración en el estroma (flechas); en C y D, se observan granulomas (5). Tinción H-E.**





**Figura 10. Lesiones histopatológicas en la unidad morfológica del hígado. En A, se aprecia un centro melanomacróforo en el estroma (1); en B, se observa una zona congestiva (2) considerable; en C, es posible observar secreciones eosinófilas (flechas) así como atrofia de algunos hepatocitos (3); en D, hepatocitos vacuolados (flecha). Tinción H-E.**

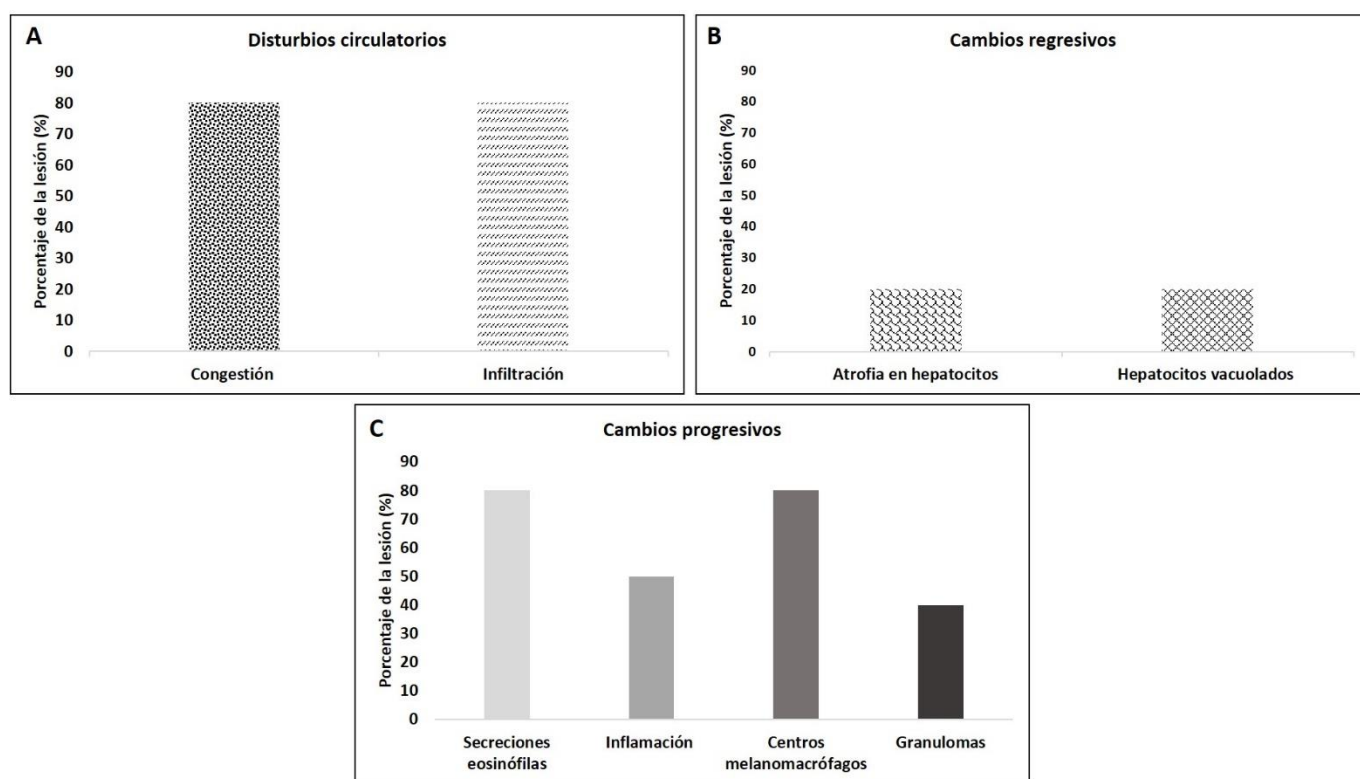


**Figura 11. Aspecto de áreas congestivas en el músculo de *S. cavalla*. En A y B, se observa la presencia de un vaso sanguíneo congestivo (1 y 2) con eritrocitos nucleados (flecha). Tinción: H-E.**

## Matriz de prevalencia o evidencias tisulares

El 80 % de los organismos analizados presentaron alteraciones circulatorias como áreas congestivas e infiltración de eritrocitos (Figura 12: A). Un porcentaje del 20 % presentó lesiones reversibles como hepatocitos vacuolados y atrofia (Figura 12: B). Lesiones de tipo progresivas fueron registradas en más del 40% de los organismos (secreciones eosinófilas, inflamaciones, centros melanomacrófagos y granulomas (Figura 12: C).

En el músculo, solo se observaron vasos congestivos con una prevalencia del 20 % en los organismos analizados y no se observaron lesiones de tipo reversibles o progresivas. Lo cual indica una mejor condición en este tejido.



**Figura 12. Porcentaje de organismos que presentan lesiones de tipo circulatorio, regresivo y progresivo en hígado.**

Las diferentes respuestas biológicas fueron asociadas con el Factor de impacto. El análisis de prevalencia de lesiones asociadas a disturbios circulatorios, cambios regresivos y progresivos en el hígado se resume en la Tabla 4, donde se muestra la matriz integrada con los ocho organismos analizados con el Factor de impacto correspondiente. En términos generales, se puede observar que los organismos presentaron lesiones tisulares cuyo Factor de impacto fluctuó entre 1 y 3 (mínima, moderada y severa importancia patológica respectivamente). De acuerdo con esta escala, el organismo que presentó mayor frecuencia de alteraciones tisulares fue el organismo número 2 con 7 lesiones (con Factor de impacto 1, 2 y 3), y los organismos que presentaron menor frecuencia de alteraciones fueron el 08 y 09 con 4 lesiones (con factor de impacto 1, 2 y 3), mismos que registraron concentraciones elevadas de Hg. El resto de los organismos presentó frecuencia de alteraciones similares (6 lesiones). El músculo presentó lesiones asociadas a disturbios circulatorios con un factor de impacto 1 (mínima importancia). Cabe resaltar que en todos los ejemplares analizados se presentó la congestión, la infiltración, las secreciones eosinófilas así como los centros melanomacrófagos.

**Tabla 4. Matriz de prevalencia de lesiones asociada al factor de impacto en el hígado de los organismos analizados.**

<b>Organismos analizados</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Disturbios circulatorios</b>								
1) Congestión	1	1	1	1	1	1	1	1
2) Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0
3) Infiltración	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Cambios regresivos</b>								
4) Atrofia de hepatocitos	0	2	2	0	0	0	0	0
5) Hepatocitos vacuolados	1	0	0	0	1	0	0	0
<b>Cambios progresivos</b>								
6) Secreciones eosinófilas	1	1	1	1	1	1	1	1
7) Inflamación	2	2	0	2	2	0	0	2
8) Esteatosis hepática	0	0	0	0	0	0	0	0
9) Autólisis	0	0	0	0	0	0	0	0
10) Centros melanomacrófagos	3	3	3	3	3	3	3	3
11) Granuloma	0	2	2	2	0	0	0	2
12) Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
13) Tumores	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Prevalencia de lesiones por organismo</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>6</b>

**Donde:**

**0 = se asoció a la ausencia de lesiones tisulares,**

**1 = lesiones fácilmente reversibles (mínima importancia patológica),**

**2 = lesiones reversibles (moderada importancia patológica),**

**3 = lesiones generalmente irreversibles (severa importancia patológica)**

**(Escala propuesta por Bernet *et al.*, 1999).**

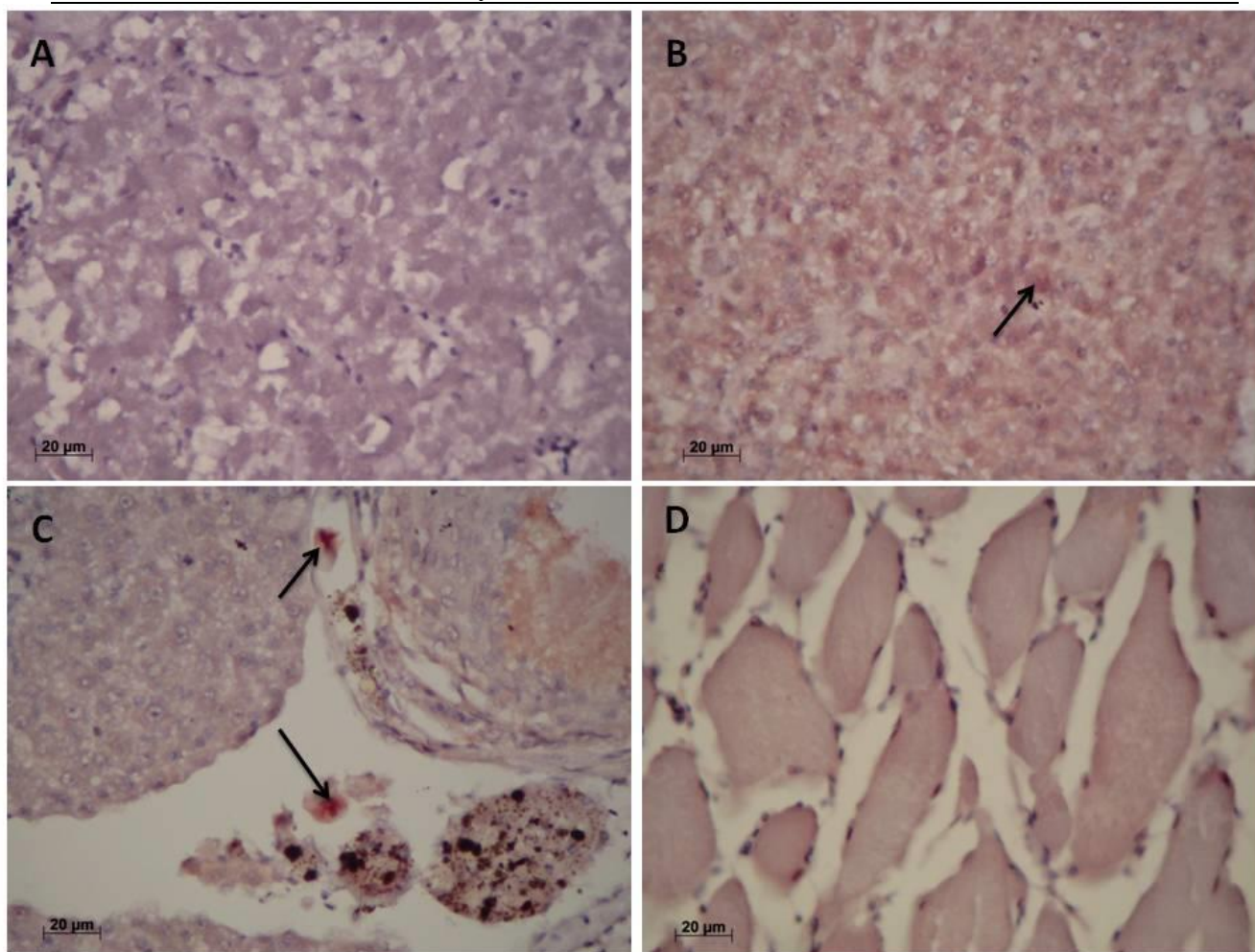
## Biomarcadores proteínicos mediante inmunohistoquímica

### Hsp70

Se observó la presencia de proteínas Hsp70 en el citoplasma de los hepatocitos de un ejemplar denominado 06, el cual mostró alteraciones reversibles y progresivas con un Factor de impacto entre 1 y 3; a pesar que los 3 organismos analizados presentaban prevalencia de lesiones similares en el hígado; En el músculo no se inmunodetectaron las proteínas Hsp70 en los dos organismos analizados (Tabla 5). En la Figura 13 se muestran los resultados inmunohistoquímicos con el anticuerpo Hsp70 para el hígado (B y C) y para el músculo (D).

**Tabla 5. Reacción de los anticuerpos Hsp70 y Metalotioneínas en diferentes organismos.**

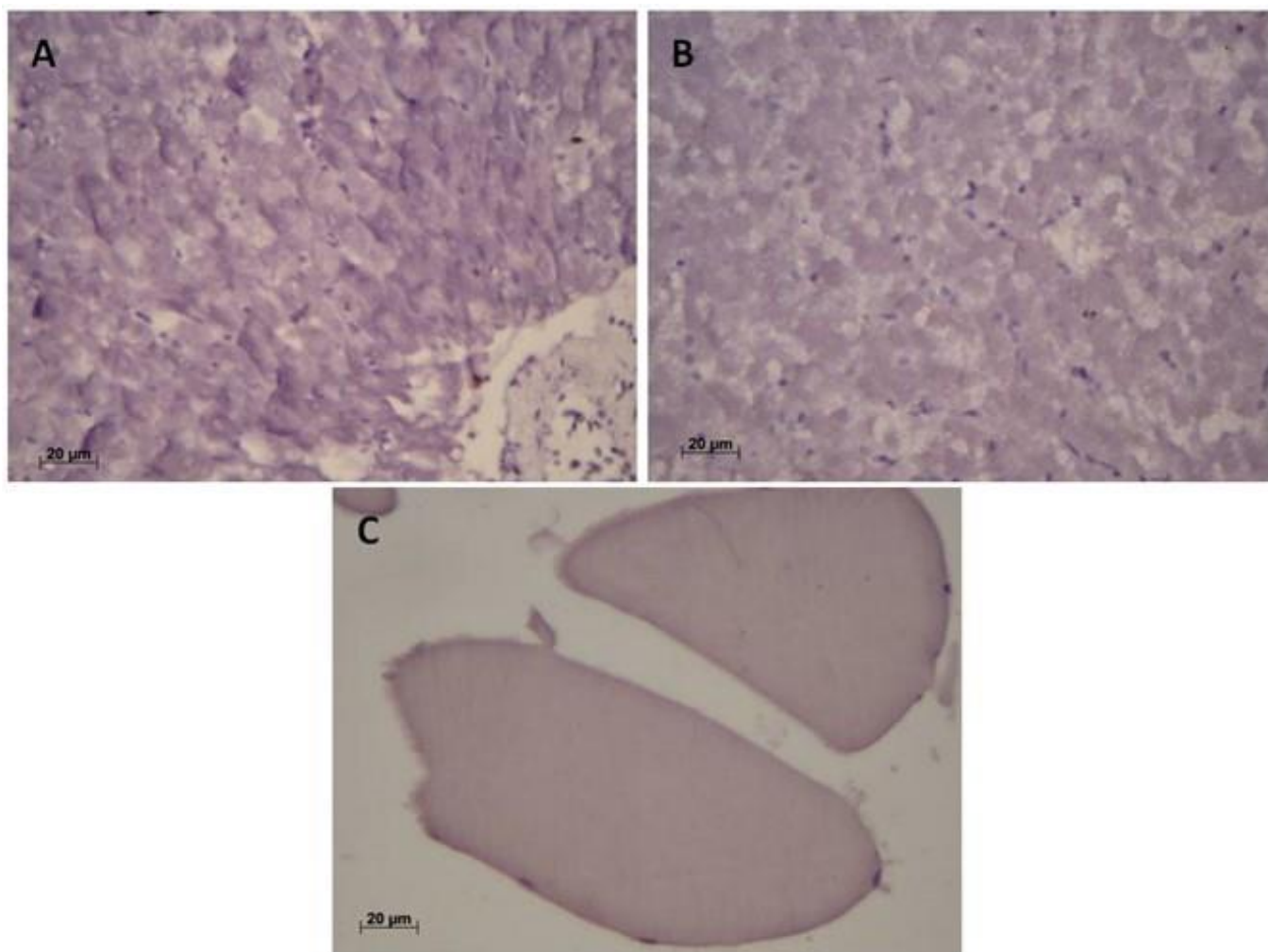
Tejido	No. de organismo analizado	Anticuerpo	Inmunodetección
Hígado	01, 05 y 06	Hsp70	POSITIVA
Músculo	05 y 06	Hsp70	NEGATIVA
Hígado	02, 08 y 09	MTs	NEGATIVA
Músculo	01 y 10	MTs	NEGATIVA



**Figura 13. Localización de proteínas Hsp70 en secciones del hígado (organismo 06) y músculo de *S. cavalla*. En A, se observa el testigo negativo; en B y C, la presencia de proteínas Hsp70 es evidente por la reacción que se visualiza en rojo en el citoplasma de los hepatocitos (flechas); en D, no se observó la reacción en el tejido muscular.**

## Metalotioneínas

La inmunodetección con el anticuerpo Metalotioneínas fue negativa en los 3 ejemplares analizados para hígado y en los 2 para músculo (Tabla 5), mismos que presentaron alteraciones con factor de impacto de 1 a 3, es decir, lesiones que eventualmente pueden progresar (Figura 14: B y C).



**Figura 14. Localización de Metalotioneínas en hígado y músculo de *S. cavalla*. En A, se observa el testigo negativo; en B y C, no se observó la presencia de proteínas MTs en hígado y músculo, respectivamente.**

## Integración de resultados

Las concentraciones de Hg y Cr, la prevalencia de lesiones tisulares asociadas con un factor de importancia 1, 2 y 3 y la presencia de proteínas Hsp70, sugieren que la salud de *S. cavalla* esta comprometida (Tabla 6). Con respecto a los tejidos estudiados, el hígado presentó más evidencias de alteraciones.

Las respuestas de los biomarcadores analizados, es decir el bajo índice de condición, la presencia de mercurio en los tejidos el cual rebasó los límites de referencia, la prevalencia de lesiones tisulares en el hígado tanto reversibles como progresivas y la presencia de proteínas de estrés (Hsp70) en el hígado, sugieren que los organismos se encuentran sujetos a estrés ambiental.

**Tabla 6. Integración de los biomarcadores para el diagnóstico de salud en *S. cavalla*.**

Biomarcadores	Organismo	
	Músculo	Hígado
Índice de condición	Bajo	
Hongos	Ausente	Ausente
Bacterias	Ausente	Ausente
Parásitos	Ausente	Presente
Pb	Por debajo de los valores de referencia	Por debajo de los valores de referencia
Cr	Por debajo de los valores de referencia	Por debajo de los valores de referencia
Hg	Rebasan los valores de referencia	Rebasan los valores de referencia
Histopatología (Factor de impacto)	1	1, 2 y 3
Hsp70	No inmunodetectadas	Inmunodetectadas
Metalotioneínas	No inmunodetectadas	No inmunodetectadas

Factor de impacto:

Bajo

Medio

Alto

## Discusión

Se colectaron 10 organismos en total, de acuerdo con la recomendación de Padrós (2005), quien indica que 5 especímenes de tallas entre 100-150 g son estadísticamente significativos en un análisis de salud.

Los caracteres morfológicos distintivos observados en *S. cavalla* tales como cuerpo elongado y comprimido dorso-lateralmente, hocico más pequeño que el resto de la cabeza con la parte posterior del maxilar expuesto, dos aletas dorsales, una línea lateral curvada abruptamente hacia abajo a partir de la segunda aleta dorsal y un color negro iridiscente verde azulado con costados plateados, han sido reportados como caracteres distintivos de esta especie (Collette & Nauen, 1983).

Las tallas y pesos promedio obtenidos (82.6 cm y 3400 g) se encuentran dentro del intervalo reportado para organismos adultos y de tallas comerciales de esta especie, con una longitud de 70 cm y un peso de 3300 g (Collette & Nauen, 1983). Las relaciones longitud-peso son utilizadas con frecuencia para modelar las tendencias de la biomasa basados en la talla y son ampliamente usadas en el manejo de poblaciones de importancia económica (Treer *et al.*, 2008; Agboola & Anetekhai, 2008).

El índice de condición (IC) es utilizado para comparar la condición o bienestar de un pez o población (Froese, 2006), ya que establece la relación entre el peso y la longitud. Los organismos analizados en este estudio presentaron un IC de 0.6, lo que representa una baja condición, a pesar de tener valores cercanos a los indicados para talla comercial. De acuerdo a lo propuesto por Barnabé *et al.* (1996), organismos con valores mayores a 1.2 corresponden a especímenes bien nutridos, e incluso valores de 1.4 se registran en hembras preparadas para desovar. Los valores obtenidos en el presente estudio indican que los organismos analizados no se encontraban en condiciones óptimas. Costopoulos & Fonds (1989), señalan que el IC, también constituye una medida de las reservas de energía relacionadas a condiciones ambientales, estados de madurez, alimentación o efectos parasitarios. Esto indicaría que los ejemplares podrían estar sometidos a una o más características mencionadas previamente.

Los parámetros biológicos tales como presencia de hongos, de deformidades o lesiones aparentes en el tejido blando, malos olores y parásitos no se observó en el 90% de los organismos procesados. Sin embargo, el 10 % presentó endoparásitos en el hígado a pesar que este ejemplar registró menor frecuencia de alteraciones. La presencia parásitos, hongos o bacterias son un indicador macroscópico que permite evaluar el estado de salud de los peces, ya que al estar presentes pueden desencadenar enfermedades que ocasionan lesiones reversibles, o incluso afectan funciones vitales que causan la muerte (Feist & Longshaw, 2008).

Las concentraciones de Hg, Pb y Cr en hígado y músculo registradas en este estudio, proveen información valiosa debido a que hasta el momento no existe ningún reporte sobre las concentraciones de los metales

antes mencionados para la especie *Scomberomorus cavalla* colectada en Tecolutla, Veracruz. De esta manera, el presente estudio tiene relevancia al dar a conocer que las concentraciones de metales registradas superan los valores aceptables para su consumo. Lo cual debe ser considerado respecto a las condiciones en las que se desarrollan estos organismos en Tecolutla, ya que puede afectar el bienestar de los mismos. Este reporte permitirá proporcionar elementos útiles para evitar riesgos a la salud de los consumidores.

Las concentraciones registradas de Hg en hígado y músculo en este estudio, rebasaron o estuvieron cercanos a los valores de referencia establecidos en la legislación ambiental para el consumo de carne de pescado. Cai (2005) y Adams & McMichael (2007) realizaron estudios sobre la concentración de Hg en el Peto (*S. cavalla*) en la zona noroeste del Golfo de México. Ellos encontraron concentraciones promedio de Hg en el músculo de 0.78 y 0.94 mg/Kg. Si bien estas concentraciones no rebasaron los límites, se encontraron cercanos a ellos como lo observado en el presente estudio. Por otro lado, se han determinado concentraciones mayores de este elemento en la misma especie en el sureste de Estados Unidos, donde Kuklyte (2012), registró una concentración promedio de 1.04 mg/Kg de Hg en músculo. Valor que rebasa el límite máximo permitido por la normatividad vigente en México. Esta concentración es similar a las registradas en el presente estudio.

En el mismo trabajo se encontró que la concentración de plomo en hígado y músculo de *S. cavalla* fue menor al límite de detección del aparato utilizado, lo que significa que no representa un riesgo para la salud humana, ya que las concentraciones se encontraron por debajo de los valores de referencia establecidos por la FAO de 0.20 mg Pb/Kg de peso húmedo en el músculo de pescado. Este resultado difiere de los que han obtenido algunos autores en especies marinas colectadas en el Norte del Golfo de México (Feldhausen & Johnson, 1983; Hanson, 1997; Vázquez *et al.*, 2001), quienes indican que los niveles de Pb en el músculo de peces estuvieron por debajo de 10 mg/kg. En contraste, Ploetz *et al.* (2007) reportaron niveles inferiores de Pb y otros metales en hígado y músculo de *Scomberomorus cavalla* colectados en Alabama, encontrando una concentración menor de Pb en hígado (1 mg/Kg) que en el músculo (1.8 mg/Kg).

La concentración promedio de Cr en el hígado y músculo del Peto (0.46 y 0.45 mg/Kg de peso húmedo respectivamente) estuvieron por debajo de lo que establece la FDA y la FAO (1 mg/kg). Aunque el Cr puede eliminarse en las heces y la orina, también puede llegar a bioacumularse y causar algunos daños en el ser humano tales como cuadros gastrointestinales agudos (Galvão & Corey, 1987), sin embargo los efectos agudos más importantes de la ingestión de dosis altas de Cr hexavalente son las lesiones renales, en glomérulos y túbulos (Moreno, 2003). La dosis mortal de Cr para el ser humano es de 6- 8g/Kg/d, sin embargo, en México no existe una norma que regule los niveles permisibles de este metal en la biota a pesar del daño que este puede generar, lo cual es preocupante por las concentraciones observadas en especies de



consumo como es el Peto.

Las concentraciones de Hg y Cr en hígado y músculo de *S. cavalla*, no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, las concentraciones de estos metales a menudo son más altas en el hígado que en el músculo (Canli *et al.*, 2001; Romeo *et al.*, 1999; Zauke *et al.*, 1999; Zhang & Schlenk 1995).

La descripción tisular del hígado mostró el parénquima hepático compuesto primordialmente por hepatocitos poligonales típicamente con un prominente núcleo esférico central, contenido dentro de una delgada cápsula de tejido fibroconectivo y vasos sanguíneos formados por células endoteliales, que forman el componente estructural del hígado, así como células endoteliales, células de almacenamiento de grasa, células mesoteliales (serosa) y fibroblastos, lo cual coincide con la descripción tisular característica reportada por otros autores (Genten *et al.*, 2009; Mumford *et al.*, 2007; Takashima & Hibiya, 1995). Esta estructura bajo condiciones normales permite llevar a cabo sus principales funciones tales como: la asimilación, el almacén y redistribución de nutrientes, la producción de bilis, el mantenimiento de la homeostasis metabólica del cuerpo y la desintoxicación (Genten *et al.*, 2009).

La organización tisular del músculo de los peces, está conformada por unidades largas llamadas fibras musculares (también llamadas miocitos) rodeadas por tejido conectivo y compuestas principalmente de sarcoplasma (ó citoplasma), miofibrillas, núcleo y sarcolema (ó membrana plasmática). En los cortes histológicos con piel fue posible diferenciar las dos capas principales que la conforman (epidermis y dermis), que son reportadas en la mayoría de peces teleóstos (Berraa & Humphrey 2002; Bonilla-Lizarazo *et al.*, 2008). En la dermis se observaron células de pigmento alineadas uniformemente como lo reportaron Bonilla-Lizarazo *et al.* (2008), las cuales proporcionan coloración y protección a los peces (Elliott, 2000; Le Guellec, 2004). Sin embargo, éstas células no habían sido reportadas en *S. cavalla* y no se descarta que puedan tener relación con el estrés ambiental debido a su función protectora. En sección longitudinal, se observaron fibras musculares con su característica estriación cruzada y núcleos ovoides localizados en la periferia de la fibra muscular, tal y como lo describen Genten *et al.* (2009) y Takashima & Hibiya (1995). Las fibras musculares de estriación cruzada corresponden a la estructura típica y sirven para proveer el movimiento en los peces (Genten *et al.*, 2009). En secciones transversales fue posible observar paquetes musculares de forma triangular, hexagonal o como polígonos irregulares con sus núcleos ovoides periféricos y rodeados por tejido conectivo con espacios intercelulares, lo cual indica presencia de células de los adipocitos que conforman el tejido conectivo (Genten *et al.*, 2009), además de contener entre los espacios de los miocitos individuales tejido conectivo, el cual contiene capilares.

Las principales alteraciones tisulares que se observaron en los órganos analizados fueron: infiltraciones, congestión en los conductos sanguíneos, inflamaciones focales en el parénquima hepático, centros

melanomacrófagos, granulomas, secreciones eosinófilas y en menor proporción, algunos hepatocitos vacuolados, así como atrofia focal de hepatocitos, las cuales han sido descritas por diversos autores como lesiones patológicas en los tejidos (Takashima & Hibiya, 1995; Mumford *et al.*, 2007). Algunas alteraciones histológicas observadas en el hígado, también han sido reportadas en especies de peces desarrolladas en medios impactados por aguas residuales. Entre las lesiones reportadas destacan la degeneración vacuolar en los hepatocitos, las áreas focales de necrosis y fibrosis, las agregaciones de células inflamatorias entre los hepatocitos, la dilatación y congestión en los sinusoides sanguíneos y la formación de trombosis en las venas centrales (Mohamed, 2009).

Las alteraciones relacionadas con el sistema circulatorio, como los vasos congestivos (80 %), se ha reportado que se deben a una reducción del flujo sanguíneo venoso de salida vascular debido a eventos no inflamatorios, tales como insuficiencia cardíaca, o constricción u obstrucción del flujo de salida vascular debido a torsiones de tejidos, tumores, u otros eventos de compresión como lo describen Mumford *et al.* (2007). En este trabajo no hubo evidencia de eventos no inflamatorios.

Otro proceso patológico de importancia en el hígado de los peces lo constituye la inflamación, la cual se observó en el 50 % de los organismos analizados. El propósito de la respuesta inflamatoria es diluir, aislar y destruir el agente perjudicial para facilitar la curación y la reparación (Mumford *et al.*, 2007). Algunos protozoos, metazoos, agentes bacterianos y micóticos han sido reportados como agentes responsables de procesos inflamatorios (Ferguson, 1989); sin embargo, para este estudio no se realizó el análisis correspondiente para la identificación de los agentes que provocan esta respuesta. Los centros melanomacrófagos (CMMs) observados en el hígado de los peces, tuvieron una incidencia del 80 %. Estos se han reportado principalmente en órganos como el bazo, riñón, hígado, gónadas, tiroides y aún en el timo (Ferguson, 2006). Los CMMs están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas; reciben ese nombre porque dentro de los macrófagos se producen y almacenan pigmentos como la lipofucina, melanina, la hemosiderina, entre otros (Dalmo *et al.*, 1997; Agius & Roberts, 2003; Ferguson, 2006). Los CMMs son producto de una respuesta inmunológica ante algún estresor ambiental como los metales pesados, o en respuesta a infecciones por bacterias intracelulares resistentes a la fagocitosis como *Streptococcus*, *Mycobacterias*, *Renibacterias* y *Myxobolus* sp., o por nodavirus, donde los CMMs aumentan en número y sus macrófagos atrapan grandes cantidades de antígeno o de bacterias completas y en su interior también aumenta la cantidad de pigmentos; sin embargo, la función de los CMMs en respuesta a la infección es todavía especulativo (Agius & Roberts, 2003; Ferguson, 2006; Hernández *et al.*, 2008). En este trabajo la alta prevalencia de CMMs se asoció con la presencia de Hg y Cr registrados en el hígado.

La respuesta inflamatoria esta asociada con los granulomas, los cuales están constituidos esencialmente por macrófagos y se caracterizan por formaciones nodulares circulares (acumulación focal de macrófagos) que se presentan cuando existen procesos inflamatorios crónicos (Klatt, 2006). Por lo tanto, la presencia de granulomas en el hígado de *S. cavalla* a pesar de tener una incidencia del 40 %, es una respuesta importante a considerar debido al efecto crónico que esta representa, porque implica indirectamente la respuesta de los organismos ante condiciones de estrés en el ambiente en que se desarrollan.

Paralelamente a los dos factores anteriores debe enfatizarse que las secreciones eosinófilas también se registraron en el 80 % de los organismos. Aunque no es clara su función, las secreciones eosinófilas se reportan como una segregación de productos químicos que tienen afinidad a la eosina; estas respuestas se han considerado como indicativas de que el organismo genera medidas de protección ante algún agente estresor (Sander, 1990), como es el caso de la exposición a pesticidas en machos juveniles de tilapia, donde observaron cambios vacuolares, inclusiones eosinófilas en el citoplasma de los hepatocitos, congestión sinusoidal e infiltración de células granulares eosinofílicas asociadas principalmente a grandes vasos portales y alteraciones nucleares (Chaparro *et al.*, 2013).

En las muestras de tejido muscular solo se observaron vasos congestivos. Sin embargo, se han reportado otras patologías en el tejido muscular de los peces tales como: necrosis, presencia de hemorragias y edemas, inflamación, granulomas en el tejido conectivo y muscular, mineralización, presencia de pigmentos, atrofia muscular y neoplasia, entre otras (Mumford *et al.*, 2007). De Oliveira *et al.* (2008) observaron cambios histopatológicos y ultraestructurales en el músculo de algunos peces por el efecto del metilmercurio, notando una disminución de la superficie inter-paquete, mitocondrias con formas y tamaños variables, y desorganización de crestas. Asimismo, Mohamed (2009), registró algunas alteraciones histológicas en el músculo de *Tilapia zillii* y *Solea vulgaris*, como la degeneración en fascículos musculares con áreas focales de necrosis, la atrofia de los haces musculares y edema entre los haces musculares por efecto de aguas residuales. La estructura morfo-fisiológica del músculo analizada en el presente trabajo indica que a pesar de las lesiones encontradas en hígado así como las concentraciones de metales registradas en ambos órganos, no se han registrado efectos sobresalientes en el tejido muscular, el cual forma la parte comestible de estos animales.

Las Hsp70 forman parte de una respuesta inmunológica que se dispara en presencia de factores de estrés tales como calor o sustancias químicas (Hoekstra *et al.*, 1998). La inmunolocalización de Hsp70 en el citoplasma de los hepatocitos, ha sido reportada por varios autores, ante la presencia de metales pesados (Rajeshkumar *et al.*, 2013; Liu, 2012), por lo cual, no se descarta la posibilidad de que éstas proteínas

pudieran asociarse a la presencia de Hg y Cr en el hígado del Peto.

Las MTs se unen a metales como Hg, Cu, Cd y Zn. Algunos autores indican que pueden representar cierta defensa en peces y otros vertebrados ante la presencia de metales no vinculados al metabolismo. Dado que en el hígado se transforman muchos tóxicos, es frecuente que en este órgano se acumulen niveles más altos de metales a diferencia de otros órganos (Atli & Canli 2003; De Smet *et al.*, 2001; Roesijadi, 1992). Los resultados obtenidos con el anticuerpo MTs, fueron negativos para hígado y músculo. Sin embargo, en otros trabajos se ha determinado la expresión de Metalotioneínas en el hígado de peces comerciales asociado a la presencia de metales como Cd, Pb, Hg, Cr, Fe, Cu y Zn (Amaral *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2008), de esta manera se ha considerado a las Metalotioneínas como un buen biomarcador de la exposición a metales. Los resultados negativos con el anticuerpo MTs en ambos tejidos, e incluso la ausencia de Hsp70 en el músculo, deberán investigarse más profundamente.

## Conclusiones

Los aspectos taxonómicos y morfométricos permitieron caracterizar a la especie *S. cavalla*.

El índice de condición reflejó valores bajos en los organismos colectados en Tecolutla, Veracruz, lo que sugiere un mal estado nutritivo.

Las concentraciones de Hg registradas en hígado y músculo de *S. cavalla* superaron los valores sugeridos para el consumo de carne de pescado, mientras que las concentraciones de Cr fueron inferiores a los valores de referencia. El Pb no fue detectado.

Las alteraciones tisulares no fueron observadas en el músculo, en tanto que en el hígado se observó vasos congestivos, infiltraciones, inflamaciones focales, secreciones eosinófilas, centros melanomacrófagos y granulomas, lo cual sugiere que el hígado presenta más alteraciones que el músculo.

La prevalencia de lesiones tisulares fue diferente en el hígado con respecto al músculo. El tejido muscular no está comprometido al conservar su integridad morfológica y fisiológica, en cambio la prevalencia de lesiones en el hígado indican que este órgano puede perder su integridad morfológica y fisiológica.

Las alteraciones observadas presentaron un factor de impacto entre 1 y 3 (mínima, moderada y severa importancia patológica) lo cual implica que si las condiciones de desarrollo no mejoran su salud puede seguir comprometida.

Las proteínas Hsp70 fueron detectadas en el citoplasma de los hepatocitos del hígado lo cual sugiere que los mecanismos bioquímicos están activos. En el músculo no se detectaron las Hsp70.

Las Metalotioneínas no fueron inmunodetectadas en hígado y músculo.

Los biomarcadores empleados en este trabajo, permitieron evaluar el estado de salud de *S. cavalla* desarrollada en Tecolutla, Veracruz, revelando comprometida su salud.

Las respuestas biológicas sugieren que los organismos están sujetos a estrés ambiental.

## **Recomendaciones**

Es fundamental continuar el monitoreo ambiental en la zona de Tecolutla, Ver. para garantizar la salud de los consumidores y tomar las medidas precautorias en el consumo de Peto debido a la presencia de mercurio registrada en sus tejidos.

Se recomienda el uso de biomarcadores tisulares y bioquímicos para las futuras evaluaciones ecotoxicológicas; así como el monitoreo de metales en organismos de importancia comercial que son depredadores tope.

## Referencias

- Adams, D.H. & R.H. McMichael. 1999. Mercury levels in four species of sharks from the Atlantic Coast of Florida. *Fishery Bulletin* 97(2): 372–379.
- Adams, D.H. & R.H. McMichael. 2007. Mercury in king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, and Spanish mackerel, *S. maculatus*, from waters of the south-eastern USA: regional and historical trends. *Marine and Freshwater Research* 58(2): 187-193.
- Adams, S.M., K.L. Shepard, M.S. Greeley, B.D. Jr. Jimenez, M.G. Ryon, I.R. Shugart & J.F. McCarthy. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28: 459-464.
- Agboola, J.I. & M.A. Anetekhai. 2008. Length-weight relationships of some fresh and brackish water fishes in Badagry Creek, Nigeria. *Journal of Application Ichthyology* 24: 623-625.
- Agius, C. & R. Roberts. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26: 499-509.
- Alvarado, N.E., I. Cancio, K. Hylland, I. Marigómez & M. Soto. 2007. Immunolocalization of metallothioneins in different tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd. *Histology and Histopathology* 22(7): 719-28.
- Amaral, A.F., N. Alvarado, I. Marigomez, R. Cunha, K. Hylland & M. Soto. 2002. Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment. *Biomarkers* 7(6): 491-500.
- Atli, G. & M. Canli. 2003. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70(3): 619-27.
- Barnabé, G., F. Baudin-Lauencin, C. Bellon-Humbert, P. Lubet, A. Van-Wormhoudt & M. Vigneulle. 1996. *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura*. Editorial ACRIBIA, S.A. España. 451 p.
- Bernet, D., H. Schimdt, W. Meier, P. Burkhaerd-Holm & T. Wahli. 1999. Histopathology in fishes: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases* 22: 25-26.
- Berntssen, M., K. Hylly, K. Julshamn, A. K. Lundebye & R. Waagbo. 2004. Maximum limits of organic mercury in fish feed. *Aquaculture Nutrition* 10: 83-97.
- Berraa, T.M. & J.D. Humphrey. 2002. Gross anatomy and histology of the hook and skin of forehead brooding male nurseryfish, *Kurtus gulliveri*, from northern Australia. *Environmental Biology of Fishes* 65: 263-270.
- Bierkens, J.G. 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153: 61-72.
- Bonilla-Lizarazo, R.J., M. Quintero-Virguez, E. Gómez-Ramírez, D. Rodríguez-Caicedo & H. Hurtado-Giraldo. 2008. Histología y morfometría de piel del pez *Eremophilus mutisii* (Trychomectericidae, Siluriformes). *Revista de Biología Tropical* 56(2): 885-893.
- Bruland, G.W. 1983. Trace elements in seawater. In: Riley, J.P. & R. Chester (Eds.). *Chemical Oceanography*. Academic Press. New York, pp. 159-221.

- Cai, Y. 2005. Bioaccumulation of mercury in pelagic fishes in NW Gulf of Mexico. Tesis de Doctorado, Texas A&M University, E. U. A. 64 p.
- Campos, H. 1987. Los metales pesados, su contaminación y sus efectos tóxicos. *Contaminación ambiental* 9(17): 63-70.
- Canli, M., M. Kalay & Ö. Ay. 2001. Metal (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Cr, Ni) concentrations in tissues of a fish *Sardina pilchardus* and a prawn *Peaenus japonicus* from three stations on the Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 75-82.
- Capó-Martí, M. 2007 *Principios de Ecotoxicología, Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente*. Editorial Tebar. Madrid, España. 320 p.
- Caso, M., I. Pisanty & E. Ezcurra (comps). 2004. *Diagnóstico ambiental del Golfo de México*. Vol. 1. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Instituto de Ecología A.C. Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies. México. 626 p.
- Castillo-Huerta, M. 2000. Análisis Geográfico del municipio de Tecolutla Veracruz, 1999. Tesis de Licenciatura en Geografía, Colegio de Geografía, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM, México. 119 p.
- Chaparro, G. J., T. D. A. Aranzazu, L. Urrea & B. de J. Rodríguez. 2013. Inmunolocalización hepática de CYP P450 en un experimento de toxicidad subaguda por Clorpirifos 0,0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia *Oreochromis spp*). *Ces Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8(2): 61-72.
- Clark, S. L., I. Werner, Kaufman & D.E. Hinton. 1997. Histopathology, metallothionein, stress and enzyme and immunohistochemistry as biomarker for cadmium exposure in Asia clam. *Potamocorbula amurensis*. SETAC. USA. PTPO 099.
- Collette, B.B. & C.E. Nauen. 1983. FAO Species Catalogue. Vol. 2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date. Rome: FAO. *FAO Fisheries Synopsis* 125(2): 137.
- Coronato, S., W. Di Girolamo, M. Salas, O. Spinelli & G. Laguens. 1999. Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina* 59: 477-486.
- Costopoulos, C.G. & M. Fonds. 1989. Proximate body composition and energy content of plaice (*Pleuronectes platessa*) in relation to the condition factor. *Journal of Sea Research* 24: 45-55.
- Cruz-Rodríguez, L.A, A.J. Baucum, P. Soudant, F-LE. Chu & R.C. Hale. 2000. Effects of PCBs sorbed to algal paste and sediments on the stress protein response (Hsp70 family) in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 50: 341-345.
- Cruz-Rodríguez, L.A. & F-LE. Chu. 2002. Heat-shock protein (Hsp70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 60: 157-168.
- Dalmo, R., K. Ingebrigtsen & J. Bogwald. 1997. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20: 241-273.



- Davies, P.H., J.P. Goettl, J. Sinley & N.F. Smith. 1976. Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout, *Salmo gairdneri* in hard and soft water. *Water Research* 10: 199-206.
- De la Lanza, E. G., P. S. Hernández & P. J. L. Carbajal. 2000. *Organismos Indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores)*. Ed. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México. 633 p.
- De Oliveira, Ribeiro C.A., M.D. Nathalie, P. González, D. Yannick, B. Jean-Paul, A. Boudou & J.C. Massabuau. 2008. Effects of dietary methylmercury on zebrafish skeletal muscle fibres. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25(3): 304-9.
- De Smet, H., B. De Wachter, R. Lobinski & R. Blust. 2001. Dynamics of (Cd, Zn) metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquatic Toxicology* 52(3-4): 269-81.
- Díaz, Sánchez A. & C. Aguilar. 2008. *III Simposium Nacional de Tiburones y Rayas*. SOMEPEC, UNAM, Alianza WWF-Telcel. México. 252 p.
- Di Giulio, R.T. & D.E. Hinton. 2008. *The Toxicology of fishes*. Ed. CRC Press. United States of America. 1071 p.
- Elliott, D.G. 2000. Integumentary System. p. 271-300. *In*: G. Ostrander. *The Laboratory Fish*. Academic, Washington, DC, USA.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1996. Method 3052, SW-846. EPA, U.S.A.
- Eriksson, B. K. 2000. Long-term changes in the macroalgal vegetation of the Swedish coast: An evaluation of eutrophication effects with special emphasis on increased organic sedimentation. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 746. Uppsala. 34 p.
- Espina, S. & C. Vanegas. 2005. Ecotoxicología y contaminación. p. 79-120. *In*: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-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.
- FAO/WHO. 2004. Report of the 36th session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Codex Alimentarius Commission. Thirty-sixth Session, Rotterdam, The Netherlands, 22–26 March 2004. 224 p. También disponible en la página web: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/008/j2262e.pdf>.
- Farris, J.L. & J.H. Van Hassel. 2007. *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. Editado por SETAC (society), pp. 270-281.
- Feist, S. W. & M. Longshaw. 2008. Histopathology of fish parasite infections— importance for populations. *Journal of Fish Biology* 73: 2143-2160.
- Feldhausen, P.H. & D. Johnson. 1983. Ordination of trace metals in *Syacium papillosum* (dusky flounder) from the eastern Gulf of Mexico. *Northeast Gulf Science* 6: 9-21.
- Ferguson, H.W. 1989. *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost*. Iowa state University Press. Ames. 5-103.

- Ferguson, H.W. 2006. *Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*. 2da ed. Scotian Press.
- Fernández, D., A. Sánchez-O, M.J. Bebianno & C. Porte. 2008. Assessment of pollution along the Northern Iberian shelf by the combined use of chemical and biochemical markers in two representative fish species. *Journal Environmental contamination* 155(2): 327-35.
- Fitzgerald, W.F. & T.W. Clarkson. 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environmental Health Perspectives* 96: 159-166.
- Fitzgerald, W. F., D. R. Engstrom, R. P. Mason & E. A. Nater. 1998. The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environmental Science and Technology* 32: 1-7.
- Food and Drug Administration (FDA). 2001. Consumer advisory – an important message for pregnant women and women of childbearing age who may become pregnant about the risks of mercury in fish. (También disponible en la página web: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/admehg.html>).
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22: 241-253.
- Galvão, L.A.C. & G.C. Corey. 1987. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. ¿
- García-Hernández J., L. Cadena-Cardenas, M. Bentancourt-Lozano, L.M. García-de-la Parra, L. García-Rico & F. Márquez-Farías. 2007. Total mercury content found in edible tissues of top predator fish from the Gulf of California, Mexico. *Toxicological and Environmental Chemistry* 89(3):507-522.
- Genten, F., E. Terwinghe & A. Danguy. 2009. *Atlas of fish histology*. Science Publishers. 215 p.
- Gray, J. 2002. Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin* 45: 46-52.
- Guzmán-García X. 2007. Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental. Tesis de Doctorado en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. 100 p.
- Hanson, P.J. 1997. Response of hepatic trace element concentrations in fish exposed to elemental and organic contaminants. *Estuaries* 20: 659-676.
- Helfman, G.S., B.B. Collette & D.E. Facey. 1997. *The diversity of fishes*. Blackwell Science, Malden, Massachusetts. 528 p.
- Hellawell, J.M. 1989. *Biological Indicators of Freshwater. Pollution and Environmental Management* Elsevier Applied Science. London. 546 p.
- Hernández, E., J. Figueroa, & C. Iregui. 2008. Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis* spp.) fish-farm: Case study. *Journal of Fish Diseases* 32: 247-252.
- Hoekstra, K.A., G.K. Iwama, C.R. Nichols, D.V. Godin & K.M. Cheng. 1998. Increased heat shock protein expression after stress in Japanese quail. *Estress* 4: 265-72.

- Huggett, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Jr. Mehrle & H.L. Bergman. 1992. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers. Boca Ratón, FL. 347 p.
- Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EEUU (AFIP). 1995. *Métodos Histotecnológicos*. Registro de Patología de los Estados Unidos de America (ARP). 280 p.
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tecolutla, Veracruz de Ignacio de la Llave. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Clave geoestadística 30158. 9 p.
- Johnson, L.L., C.M. Stehr, O.P. Olson, M.S. Myers, S.M. Pierce, C.A. Wigten, B.B. McCain & U. Varanasi. 1993. Chemical contaminants and hepatic lesions in winters flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environmental Science and Technology* 27: 2759-2771.
- Klaassen, C.D., J. Liu & S. Choudhuri. 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 267-94.
- Klatt, E.C. 2006. *Robbins and Cotran Atlas of Pathology*. Elsevier Health Sciences. 544 p.
- Koca, Y.B., S. Koca, S. Yildiz, B. Gurcu, E. Osanc, O. Tuncbas & G. Aksoy. 2005. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the cine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. *Environmental Toxicology* 20: 560-571.
- Kuklyte, L. 2012. Mercury Contamination in Pelagic Fishes of the Gulf of Mexico. Tesis de Maestria. Texas A&M University.
- Lacerda, L.D., H.H.M. Paraquetti, R.V. Marins, C.E. Rezende, I.R. Zalmon, M. Gomes & V. Faria. 2000. Mercury content in shark species from the southeastern Brazilian coast. *Revista Brasileira de Biología* 60(4): 571-576.
- Landis, W.G. & M.H. Yu. 1999. *Introduction to Environmental Toxicology*. Lewis Publishers. New York. 390 p.
- Le Guellec, D., G. Morvan-Dubois & J.Y. Sire. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *The International Journal of Developmental Biology* 48: 217-231.
- Liu, D., Z. Chen & X. Zhou. 2012. Detection of heat shock proteins 70 in the gill, liver, and cardiac muscle of *Carassius auratus* with confocal microscopy. *Microscopy Research and Technique* 75(4): 531-6.
- Maddock, D.M. & M.P.M. Burton. 1999. Gross and histological observations of ovarian development and related condition changes in American plaice. *Journal of Fish Biology* 53: 928-944.
- Mancera-Rodríguez, N.J. & R. Álvarez-León. 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 11(1): 3-23.

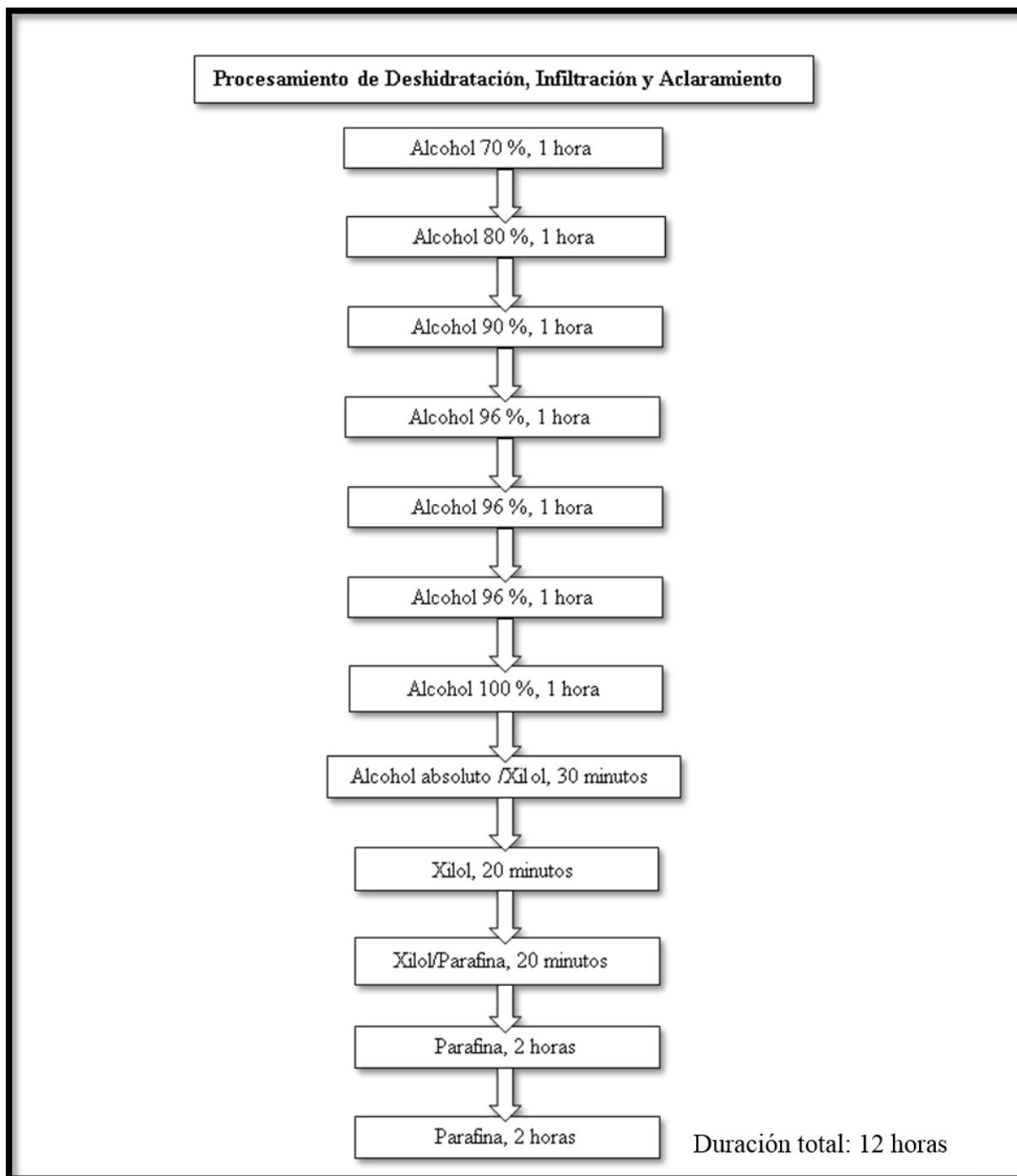
- Martínez-Jerónimo, F. 1991. El papel del bioensayo en la evaluación de la toxicidad acuática. In: Figueroa, M., C. Álvarez, A. Esquivel & M. Ponce (Eds.). *Fisicoquímica y Biología de las lagunas Costeras Mexicanas*. "Grandes temas de la Hidrobiología" UAM-I, pp. 57-65.
- Mendoza-Díaz, F., A. Serrano, L. Cuervo-López, A. López-Jiménez, J.A. Galindo & A. Basañez-Muñoz. 2013. Concentración de Hg, Pb, Cd, Cr y As en hígado de *Carcharhinus limbatus* (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) capturado en Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation)* 61(2): 821-828.
- Mohamed, Fatma A.S. 2009. Histopathological Studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1(1): 29-39.
- Monteiro, L.R., V. Costa, R.W. Furnes & R.S. Santos. 1996. Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments. *Marine Ecology Progress Series* 141: 21-25.
- Moreno, Grau. 2003. *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Capítulo 11. Metales. Editorial Mac Graw Hill. España. pp 199-235.
- Mughal, M.S., N. Malkani & N. Jehan. 2004. Histopathological changes in kidney and muscle of *Labeo rohita* due to cadmium intoxication. *Biologia* 50: 39-45.
- Mumford, S., J. Heidel, C. Smith, J. Morrison, B. MacConnell & V. Blazer. 2007. *Fish Histology and Histopathology*. 357 p.
- Nollen, E.A. & Morimoto, R.I. 2002. A heat shock response: cellular and molecular responses to stress, misfolded proteins, and diseases associated with protein aggregation. p. 1553-1556. In: *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, John Wiley and Sons, Inc. New York.
- NOM-027-SSA1-1993. Norma Oficial Mexicana 1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos-refrigerados y congelados.
- Núñez-Nogueira, G, J.B. Ordoñez & M.R. Rosiles. 1998. Concentración y distribución de mercurio en tejidos del cazón (*Rhizoprionodon terraenovae*) del Golfo de México. *Veterinaria México* 29: 15-20.
- Páez-Osuna, F. 2005a. Fuentes de metales en la zona costera marina. p. 329-342. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-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.
- Páez-Osuna, F. 2005b. Efectos de los metales. p. 343-360. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-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.
- Padrós, F. 2005. *Manual de técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces*.
- Ploetz, D.M., B.E. Fitts & T.M. Rice. 2007. Differential Accumulation of Heavy Metals in Muscle and Liver of a Marine Fish, (King Mackerel, *Scomberomorus cavalla* Cuvier) from the Northern Gulf of Mexico, USA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78: 134-137.

- Primo, E. 1997. Química de los alimentos. *In: I. Guerrero-Legarreta, M. R. Rosmini & R.E. Armenta (Eds.). Tecnología de productos de origen acuático, 1ra. Edición. Ed. Limusa S.A. de C.V., Grupo Noriega Editores, México, D.F. 531 p.*
- Quiroga, B.C., G.A. Valdéz, T.I. Hernández, G.M. García & A.P. Guzmán. 2002. Peces ribereños. *In: La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. Editora de Gobierno del Estado de Veracruz-Llave. Xalapa, Veracruz. SAGARPA, INP y Universidad Veracruzana.*
- Radlowska, M. & J. Pempkowiak. 2002. Stress-70 as indicator of heavy metals accumulation in blue mussel *Mytilus edulis*. *Environment International* 27(8): 605-608.
- Rajeshkumar, S., J. Mini & N. Munuswamy. 2013. Impact of metals on histopathology and expression of indifferent tissues of milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental* 98: 8-18.
- Ramírez-Romero, P. 2011. Informe Final: Selección y muestreo de peces de alto consumo humano en México con objeto de determinar el contenido de mercurio (Hg). Tercera etapa. UAM-INE. 96 p.
- Ramírez-Romero, P., M.D.C. Guzmán-Martínez, G. Barrera-Escorcía, & X. Guzmán-García. 2012. La Ecotoxicología, herramienta para la conservación y la óptima producción de organismos acuáticos. *In: I.D.L.A Barriga-Sosa, P. Ramírez-Romero y G. Barrera-Escorcía (Eds). Acuicultura en México: Impacto en Producción, Manejo y Conservación. Editorial Académica Española. 612 p.*
- Rand, G.M., P.G. Wella & L.S. McCarthy. 1995. Introduction to Aquatic Ecology. *In: Rand., G.M. (Eds.). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Taylor and Francis, London. pp. 3-53.*
- Regnell, O. & G. Ewald. 1997. Factors controlling temporal variation in methylmercury levels in sediment and water in a seasonally stratified lake. *Limnology and Oceanography* 42(8): 1784-1795.
- Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 22: 81-114.
- Romeo, M., Y. Siau, Z. Sidoumou & M. Gnassia-Barelli. 1999. Distribution of heavy metals in different species of fish in the Mauritania coast. *Science total Environmental* 232: 169-175.
- SAGARPA-CONAPESCA. 2012. Anuario Estadístico de Pesca 2012. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. También disponible en la página web: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2012\\_zip](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012_zip)
- Sander, B. 1990. Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. *In: McCarthy, J.F. & L.R. Shugart (Eds): Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL., pp. 165-192.*
- Stafford, C.P. & T.A. Haines. 1997. Mercury concentration in Maine sport fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 126: 144-152.
- Svobodová, Z., R. Lloyd, J. Máchová & B. Vykusová. 1993. *Water quality and fish health*. FAO, Roma. 67 p.
- Takashima, F. & T. Hibiya (Eds.). 1995. *An atlas of fish histology; normal and pathological features*. Ed. Kodansha Ltd. Segunda edición. Tokio, Japón. 195 p.

- Treer, T., N. Sprem, H. Torcu-Koc, Y. Sun, & M. Piria. 2008. Length-weight relationships of freshwater fishes of Croatia. *Journal of Application Ichthyology* 24: 626-628.
- Unión Europea (UE). 2007. Commission Regulation (EC) No1881/2007 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. También disponible en la página web: <http://ec.europa.eu>.
- United Nations Environment Programme (UNEP). 2013. Text of the Minamata Convention on Mercury for adoption by the Conference of Plenipotentiaries. United Nations Environment Programme. (DTIE)/Hg/CONF/3. También disponible en la página web: [http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/dipcon/CONF\\_3\\_Minamata%20Convention%20on%20Mercury\\_final%2026%2008\\_e.pdf](http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Mercury/Documents/dipcon/CONF_3_Minamata%20Convention%20on%20Mercury_final%2026%2008_e.pdf)
- Ureña-Robles, R. 2007. Metalotioneínas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia. 218 p.
- U.S. EPA. 1997. Report to congress: Mercury. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C.
- Vázquez, F.G., V.K. Sharma, Q.A. Mendoza & R. Hernández. 2001. Metals in fish and shrimp of the Campeche Sound, Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 756-762.
- Wang, D., J.P. Ueng & B.Q. Huang. 2004. Structural changes in the muscular tissue of thornfish (*Terapon jarbua*, Forsskal) under TBT (tributyltin) exposure. *Journal of the Fisheries Society Taiwán* 31: 225-234.
- Zauke, G.P., V. M. Savinov, J. Ritterhof & T. Savinova. 1999. Heavy metals in fish from the Barents Sea (summer 1994). *Science of the Total Environment* 227: 161-173.
- Zhang, Y.S. & D. Schlenk. 1995. Induction and characterization of hepatic metallothionein expression from cadmium-induced channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Environmental Toxicology and Chemical* 14: 1425-1431.

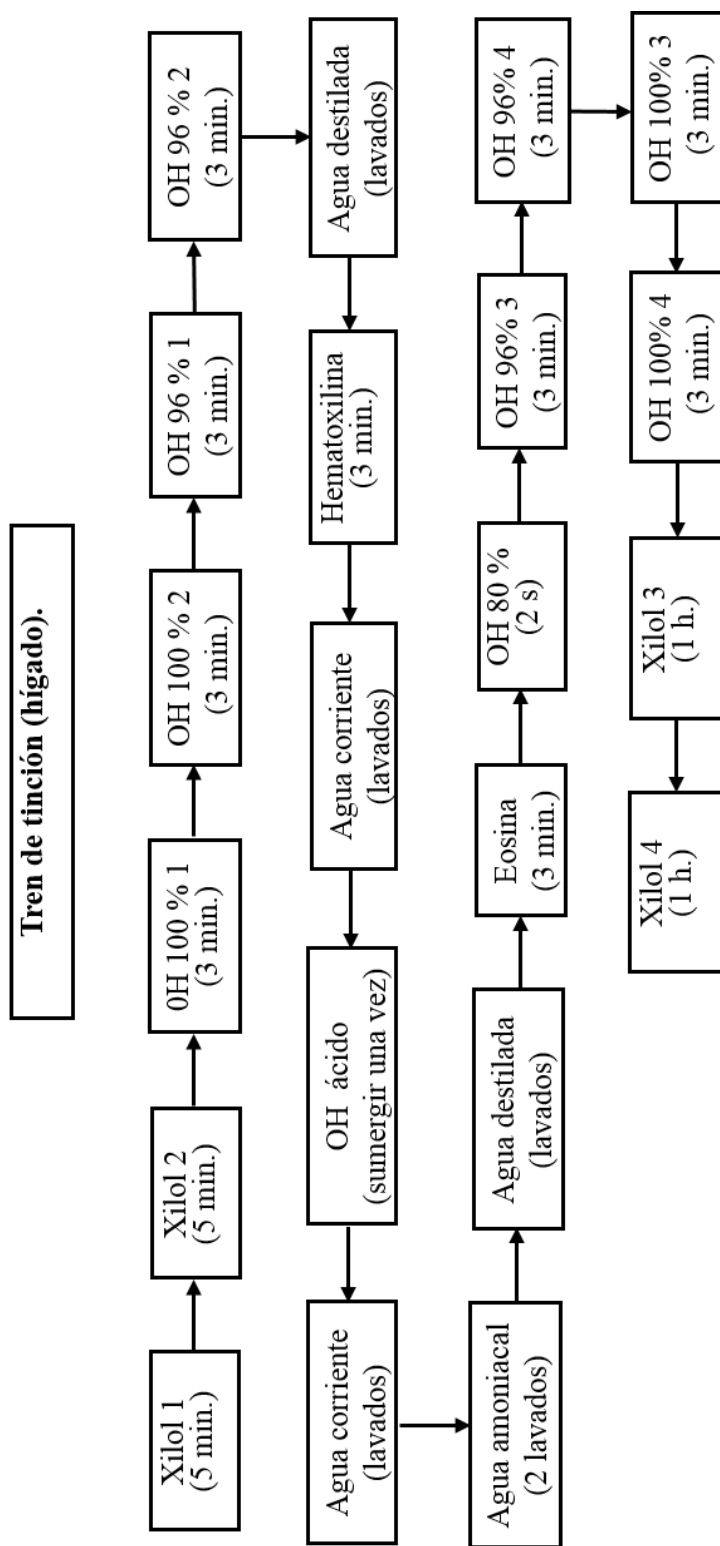


**Anexo 2. Secuencia de deshidratación, infiltración y aclaramiento para muestras de hígado y músculo.**





Anexo 3. Secuencia de tinción con H-E para el hígado.



Anexo 3. Secuencia de tinción con H-E para el músculo.

