

**Proteínas totales y factor de bioconcentración por exposición a metales en la *Gambusia punctata* (Poeciliidae)**

**Total proteins and bioconcentration factor by metal exposure in *Gambusia punctata* (Poeciliidae)**

**MsC. George Argota Pérez,<sup>1</sup> Dr. C. José Iannacone Oliver<sup>11</sup> y Dra. C. Gabriela Eguren Iriarte<sup>111</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecotoxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba.

<sup>11</sup> Laboratorio de Ecofisiología Animal. Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

<sup>111</sup> Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar niveles de proteínas totales y el factor de bioconcentración por exposición a metales en la *Gambusia punctata*. La especie fue muestreada en el ecosistema Filé y luego trasladada hacia condiciones de laboratorio, donde fueron diseñados 3 tratamientos a 2 réplicas con 25 ejemplares. Se determinó la concentración letal media (CL-50) como parámetro de toxicidad durante 48 horas de bioensayo. Los metales analizados fueron plomo y cadmio, cuantificados por espectroscopía de plasma inductivamente acoplados con vista axial. Transcurrido el experimento, la CL-50 correspondió a 0,1, ensayándose las concentraciones 0,06 y 5,78 mg/L, además del control negativo. Posteriormente se cuantificó el nivel de proteínas totales y los metales en agua, tejido y su relación mediante el factor de bioconcentración. El menor valor de proteínas fue ante la exposición al cadmio, con 43,9 % de inhibición ( $p < 0,05$ ) en comparación con el control; en el caso del plomo se determinó 2,5 % de estimulación. Las mayores concentraciones en agua y tejido correspondieron a este último, no así para el factor de bioconcentración. Se concluyó que los resultados mostraron sensibilidad en la respuesta del contenido de proteínas totales y alta capacidad bioacumulativa para ambos metales.

**Palabras clave:** proteína total, bioconcentración, plomo, cadmio, *Gambusia punctata*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate levels of total proteins and the bioconcentration factor by metal exposure in *Gambusia punctata*. The species was sampled in the ecosystem Filé and then transferred to the laboratory, where 3 treatments in 2 replications with 25 copies were designed. Mean lethal concentration (CL-50) was determined as a toxicity parameter for 48 hours of bioassay. The analyzed metals were lead and cadmium, quantified by plasma spectroscopy inductively coupled with axial view. After the experiment, the CL-50 corresponded to 0.1 and concentrations of 0.06 and 5.78 mg/L and the negative control were tested. Then the level of total proteins and metals in water, tissue and its relationship by means of the bioconcentration factor were quantified. The lower value of proteins was by exposure to cadmium with 43.9 % of inhibition ( $p < 0.05$ ) compared with the control; for lead 2.5 % of stimulation was determined. The highest concentrations in water and tissue corresponded to the latter, but not for the bioconcentration factor. It was concluded that the results showed sensitivity in the response of total protein content and a high bioaccumulative capacity for both metals.

**Key words:** total protein, bioconcentration, lead, cadmium, *Gambusia punctata*.

## INTRODUCCIÓN

La característica más importante de los peces para ser utilizados en los protocolos de evaluación toxicológicas y como especies centinelas, es que están en la cumbre de la cadena trófica y pueden afectar la salud humana, lo cual aumenta su importancia en los estudios ambientales.<sup>1</sup> El pez *Gambusia punctata* es una especie de la familia *Poeciliidae* que habita de forma natural en los ríos cubanos, donde además de su control biológico larval, ha indicado la exposición ambiental de elementos tóxicos como son los metales pesados en las aguas.<sup>2</sup> Los metales son elementos naturales que suelen encontrarse distribuidos en el ambiente a muy bajas concentraciones<sup>3</sup> y según sus formas física y química, pueden movilizarse o transportarse a través de las membranas biológicas hacia los tejidos.<sup>3</sup>

Las actividades humanas son las responsables de la liberación activa de estos agentes que pueden ser potencialmente tóxicos a los organismos acuáticos.<sup>4</sup> El plomo (Pb) y el cadmio (Cd), son 2 de los elementos con alto riesgo para el medio ambiente, ya que presentan gran estabilidad química ante los procesos de biodegradación, por lo que los seres vivos son incapaces de metabolizarlos, de modo que se genera una contaminación por bioacumulación y un efecto multiplicador en la concentración del contaminante en la cadena trófica. Alcanzan niveles altos de toxicidad y se absorben muy eficientemente a través de las membranas biológicas por su elevada afinidad química por el grupo sulfidrilo de las proteínas.<sup>5</sup>

El Pb es el metal tóxico más extendido y presente en casi todos los compartimentos ambientales. Por otra parte, bloquea la transmisión del impulso nervioso y la liberación de acetilcolina, posee, además, gran afinidad por las mitocondrias e inhibe la fosforilación oxidativa. Su exposición produce anemia como resultado de 2 efectos básicos relacionados con la disminución de la longevidad de los glóbulos rojos y la inhibición de enzimas que intervienen en la síntesis de hemoglobina.<sup>6</sup> El cadmio en los sistemas biológicos puede competir con el zinc (Zn), el cobre (Cu) y el calcio (Ca) por los sitios de unión de estos elementos en las macromoléculas. Su efecto a escala molecular está relacionado con la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, específicamente a nivel del complejo III en el sitio de unión de la semiubiquinona, la cual es conocida porque transfiere un electrón al oxígeno molecular para formar el anión superóxido, lo que explica el efecto oxidativo inducido por este metal en la células.<sup>5</sup>

El objetivo del presente artículo fue evaluar contenidos de proteínas totales y el factor de bioconcentración por exposición a metales pesados en alevines de la especie *Gambusia punctata*.

## MÉTODOS

Fueron muestreados alevines de la especie *Gambusia punctata* procedentes del río Filé de Santiago de Cuba, ya que este ecosistema ha sido considerado como referencia ambiental para estudios de ecotoxicología, debido a su baja exposición antropogénica a metales pesados.<sup>7</sup>

Una vez muestreados dichos alevines, se trasladaron al laboratorio donde permanecieron durante 7 días en condiciones controladas de temperatura (22,6°C), fotoperíodo de luz 18 horas y alimentación *ad libitum* con el artrópodo *Artemia salina sp.*

Se ensayó una prueba de toxicidad de tipo estático a corto plazo y se utilizó la propia agua natural del río (pH 7,8 y 5,1 mg/L de oxígeno disuelto). Se establecieron 2 réplicas con 25 ejemplares cada una y se determinó como parámetro de toxicidad la CL-50 (valor 0,1) obteniendo las concentraciones siguientes: Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y CdCl<sub>2</sub>: 0 (control negativo), 0,06 y 5,78, las cuales fueron ensayadas posteriormente.

La exposición fue de 48 horas y pasado este tiempo se cuantificaron los niveles de proteínas, metales en agua y tejido, así como su relación mediante el factor de condición biológico (FBC).

## 1. Determinación de proteínas

Después de las 48 horas de exposición se pesaron 0,5 g de tejido por cada réplica en forma de pool, luego se homogenizó con 1mL de solución de Tris buffer pH = 7 y se centrifugó a 5 600 rpm durante 30 minutos, a 5,5°C en una centrífuga refrigerada.

Posteriormente se descantó el sobrenadante y se tomaron alícuotas de 10 µl a las que se adicionaron 5 mL del reactivo de Bradford, después de agitar y reposar durante 5 minutos, se registró la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro Beckman.

## 2. Metales en agua y tejido

Para el análisis de los metales en el agua se siguió los procedimientos recomendados por la Norma ISO 11885: (1996). Calidad del agua. Estos fueron determinados vía ácida y cuantificados mediante espectroscopia por plasma inductivamente acoplado con vista axial (ICP-AES).<sup>2</sup>

## 3. Análisis estadístico

Los datos fueron tratados en el programa estadístico Statgraphis, versión 5.1, los cuales se analizaron por ANOVA seleccionando la prueba LSD de comparación múltiple de medias. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de p<0,05.

## 4. Bioética en la investigación

Una vez muestreados, los ejemplares fueron depositados cuidadosamente y reposados en recipientes de cristal con agua fresca natural y se procuró mantener la viabilidad de los individuos recolectados para su traslado al laboratorio.

## RESULTADOS

La tabla 1 muestra que el Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> produjo una estimulación de 2,54 % en los niveles de proteínas, mientras que para el CdCl<sub>2</sub> la respuesta fue de inhibición y muy significativa en relación con el control (43,96 %).

**Tabla 1.** Efecto tóxico del Pb y Cd sobre la concentración de proteínas totales

Determinación	Metales	Niveles de toxicidad	Media ± SD	% Estimulación	% Inhibición
Proteínas totales	Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	control	12,62 ± 3,02		
		5,7	12,4 ± 1,97	2,54	43,96
	CdCl <sub>2</sub>	control	12,58 ± 3,13		
		0,06	7,05 ± 2,68 *		

\* Diferencia significativa en relación con el control (p< 0,05)

La tabla 2 muestra los niveles de concentración de metales en agua, tejido de la especie y su relación mediante el FBC. Se determinó que los niveles de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> fueron más elevados en agua y tejido, pero el FBC fue menor, de manera que al compararse los valores de metales en ambas matrices se encontró diferencias significativas.

**Tabla 2.** Niveles de metales

Metales	Concentración en agua (mg/L)	Concentración en tejido (µg/g)	Factor de bioconcentración
Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,78	2513 ± 1236	434,76
CdCl <sub>2</sub>	0,06	69 ± 22,31	1150

## DISCUSIÓN

Las excesivas concentraciones de metales pesados en agua afectan a los organismos acuáticos de diferentes maneras, desde la disminución de su metabolismo y crecimiento, hasta la muerte, ya que las elevadas concentraciones pueden causar la asfixia debido a la coagulación de las mucosidades sobre las branquias.<sup>8</sup>

Aunque no se observó muerte en el período de ensayo, en otros organismos estudiados en condiciones experimentales, como los camarones, se ha observado que el Pb y Cd han provocado daños en el sistema nervioso central, donde los organismos antes de morir perdieron el equilibrio y nadaban mostrando oscilaciones circulares. Asimismo, el Pb provocó disminución de los hemocitos, mientras que el Cd ocasionó cambios drásticos en el sistema de locomoción. Es importante señalar que las concentraciones de metales pesados en especies de peces se cuantifican por la tendencia que estos presentan para acumular contaminantes,<sup>9</sup> por lo cual en este estudio fueron consideradas las determinaciones como biomarcadores de exposición para los metales en el organismo y de efecto para las proteínas totales.<sup>10</sup>

Como se observó en la tabla 1, ambos metales provocaron modificaciones en el nivel de proteínas totales, aunque de modo diferente, pues se ha mencionado que la forma de afección depende del tipo de tóxico, del tiempo de exposición y de la concentración a la que se exponga el organismo.<sup>11</sup>

En el caso del Cd, el porcentaje de inhibición fue muy significativo aunque se ha señalado que también puede producir efectos en la supresión de la inmunidad, así como la síntesis de ácidos nucleicos.<sup>12</sup> En las células, este metal se une a la metalotioneína, proteína que contiene 26 grupos sulfidrilos libres por molécula, debido a la gran proporción de residuos de cisteína.

Las metalotioninas son las proteínas de baja masa molecular, ricas en cisteína y responsables del transporte de metales, ya sean esenciales o no. Un aumento en la concentración de estas se debe a un incremento en los niveles de contaminantes, como se ha demostrado en ambientes naturales.<sup>13,14</sup> De la misma manera, es importante mencionar que el Pb se distribuye de acuerdo a un modelo toxicocinético de 3 compartimentos. La sangre y los tejidos suaves representan los compartimentos activos, mientras que los huesos representan el compartimiento de almacenamiento. La vida media biológica de dicho metal es muy difícil de estimar, pero se ha observado que en eritrocitos es de 35 días; en tejidos suaves, tales como: riñones, hígado y tejido nervioso, de 40 días y en los huesos de 20 a 30 años.<sup>12</sup>

La tabla 2 indicó que cuando los metales están disueltos en el agua, así como en forma biodisponible, muestran con claridad los efectos de bioacumulación y bioconcentración.<sup>15</sup> Estos resultados pudieran explicar las concentraciones elevadas de ambos elementos determinados en el tejido branquial de esta especie, pero que habita en condiciones naturales de contaminación del río San Juan.<sup>2</sup>

Finalmente, los resultados obtenidos mostraron sensibilidad en la respuesta del contenido de proteínas totales, así como alta capacidad bioacumulativa para ambos metales estudiados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta*. 2008; 606(2):135-50.
2. Argota PG, González PY, Argota CH, Fimia DR, Iannaccone OJ (2012 a). Desarrollo y bioacumulación de metales pesados en *Gambusia punctata* (*Poeciliidae*) ante los efectos de la contaminación acuática. *REDVET*. 2012 [citado 24 Jul 2012]; 13 (05B). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050512B/011ATM07.pdf>

3. Metales pesados [citado 24 Jul 2012]. Disponible en: <http://www.lenntech.es/metales-pesados.htm>
4. Boada M, Moreno A, Gil H, Marcano J, Maza J (2007). Metales pesados ( $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) en músculo ycefalotórax de camarones silvestres *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. notialis* y *F. brasiliensis* de la región oriental de Venezuela. Rev Cient (Maracaibo). 2007 [citado 24 Jul 2012]; 17(2). Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rc/v17n2/art13.pdf>
5. Mancera RNJ, Álvarez LR. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. Acta Biológica Colombiana. 2006; 11 (1): 3-23.
6. Norberg GF. Historical perspective on cadmium toxicology. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 238(3):192-200.
7. Argota PG, Argota CH, Larramendi GD, Mora TY, Fimia DR, Iannaccone OJ. Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (*Poeciliidae*) del río Filé de Santiago de Cuba. REDVET. 2012 [citado 24 Jul 2012]; 13 (05B). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050512B/011ATM08.pdf>
8. Robles CA, Pérez R, Vázquez ML, Sánchez JG, Aguirre G. Variabilidad espacio-temporal de metales pesados en camarones, agua y sedimentos de la laguna Madre, Tamaulipas. Rev Digital Universitaria. 2012 [citado 24 Jul 2012]; 6(23). Disponible en: <http://www.turevista.uat.edu.mx/ANO%206%20NUMERO%2023/laguna-res.htm>
9. Márquez A, Señor W, Fermín I, Martínez G, Castañeda J, González A. Cuantificación de las concentraciones de metales pesados en tejidos de peces y crustáceos de la laguna de Unare, estado Anzoátegui, Venezuela. Rev Cient (Maracaibo). 2008 [citado 24 Jul 2012]; 18(1). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592008000100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-22592008000100012&script=sci_arttext)
10. Ramírez A. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. An Fac Med Lima. 2006; 67(1):49-58:1025–5583.
11. Camacho SMI. Bioconcentración y toxicidad de metales en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Rev Toxicol. 2007; 24:14-7.
12. Lozano G, Carmen R, Gutiérrez A, Machín R, Hardisson A. El cadmio como contaminante alimentario. Alimentaria. 2004; 350: 41-6.
13. Hernández AJ, Garbisu C, Becerril JM, Barrutia O, García PJI, Zhao FJ, McGrath SP. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ. 2006; 29(7):1422-9.
14. Álvarez LT, Mendoza CD, Moreno SR, Gold BG. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. Aquat Toxicol. 2008; 86(1):12-9.
15. Nordberg M, Templeton DM, Andersen O, Duffus JH. Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recomendations). Pure Appl Chem. 2009; 81(5): 829-970.

Recibido: 30 de julio de 2012.

Aprobado: 18 de agosto de 2012.