



# Evaluación de biomarcadores de toxicidad inducida por níquel en peces (*Carassius auratus*, L.)

Fátima Rodríguez Estévez

Trabajo entregado para la obtención del grado de Máster en  
“Tecnología Ambiental”

Modalidad: “Investigación”

Septiembre / 2022

Directores:

Rafael Torronteras Santiago

Antonio Luis Canalejo Raya



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos tutores, el Profesor Rafael Torronteras y el Profesor Antonio L. Canalejo, su compromiso y dedicación a este trabajo. La comprensión y empatía que me han mostrado en todo momento, y la confianza y tiempo que han dedicado para que haya sido posible su elaboración. Además de la paciencia y enseñanzas aportadas por ambos, y todo el apoyo durante el tiempo que ha durado esta experiencia centrada en la investigación.

Em segundo lugar, le doy las gracias a mi familia por su cariño e incondicional apoyo, además de sufrir conmigo y aguantar todas las preocupaciones y dificultades surgidas en el transcurso de esta etapa.

## RESUMEN

El níquel es un metal traza ubicuo que ha ganado una atención considerable como un potente contaminante del medio acuático. Dada la creciente demanda mundial de este metal y el correspondiente potencial de mayores aportes antropogénicos en este medio, es importante la biomonitorización de la contaminación por níquel y desarrollar una comprensión más profunda de su efecto en los peces.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar los efectos tóxicos tempranos que produce la presencia de níquel en el medio acuático en ejemplares adultos de la especie *Carassius auratus* (L.). Para ello, se realizaron bioensayos de exposición al níquel durante 96 horas a diferentes concentraciones: Ni 0.1 mg/L, Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L, en el laboratorio y se evaluaron biomarcadores de daño genotóxico y de estrés oxidativo. El efecto genotóxico se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos (MN) en eritrocitos de sangre periférica. Se utilizó la peroxidación lipídica (niveles de hidroperóxidos) para evaluar el daño oxidativo, y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) para el estudio de la respuesta antioxidante.

Los resultados muestran un incremento de los niveles de hidroperóxidos en todos los tejidos evaluados, evidenciando una situación de estrés oxidativo. El hígado resultó ser el órgano que mostró niveles más altos de estimulación de la peroxidación lipídica. Sin embargo, el músculo resultó el más sensible, pues el incremento tuvo lugar desde la concentración de níquel más baja evaluada (Ni 0.1 mg/L). Así mismo, se observó un aumento de la actividad superóxido dismutasa en todos los órganos de los peces expuestos a las concentraciones más elevadas, destacando la mayor sensibilidad del músculo, en el que la concentración de Ni 0.1 mg/L fue suficiente para inducir un aumento. La actividad CAT también se estimuló en todas las dosis experimentales, y en todos los órganos estudiados. La mayor estimulación se observó en las branquias, pero el músculo y el cerebro aparecen como los órganos más sensibles, al encontrarse un aumento en los animales expuestos a la menor concentración de Ni. En todo caso, los resultados indican que, a pesar de producirse este aumento en la respuesta antioxidante, ésta no fue suficiente para prevenir el daño oxidativo en las membranas celulares (peroxidación lipídica) de ningún órgano; así como a nivel sanguíneo, donde se detectó un efecto genotóxico (incremento de los MN).

En conclusión, los resultados de este estudio indican que la exposición de los peces a concentraciones de níquel relevantes desde el punto de vista ambiental induce daño genotóxico y estrés oxidativo de forma temprana y generalizada en todos los órganos evaluados. Además, los cambios detectados en los diferentes órganos demuestran la eficacia del uso de estos parámetros como marcadores tempranos de estrés oxidativo y genotoxicidad en peces y, por tanto, su utilidad para la monitorización ambiental de la contaminación por níquel en el medio acuático.

*Palabras Clave:* biomarcadores, *Carassius auratus*, (L.), estrés oxidativo, daño genotóxico, níquel.

## ABSTRACT

Ni is a ubiquitous trace metal that has gained considerable attention as a pollutant of the aquatic environment. Given the increasing global demand for this metal and the subsequent potential for increased anthropogenic inputs into the environment, biomonitoring of Ni contamination and developing a deeper understanding of its effect on fish is warranted.

This research work aims to evaluate the early toxic effects produced by the presence of nickel in the aquatic environment in adult specimens of the species *Carassius auratus* (L.). To this end, Ni exposure bioassays were carried out for 96 hours at different concentrations: 0.1 mg/L, Ni 1 mg/L and Ni 10 mg/L, in the laboratory and biomarkers of genotoxic damage and oxidative stress were evaluated. The genotoxic effect was evaluated by the micronucleus (MN) assay in peripheral blood erythrocytes. Lipid peroxidation (hydroperoxide levels (ROOH)) was used to evaluate oxidative damage, and the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) to study the antioxidant response.

The results show an increase in ROOH levels in all the tissues evaluated, evidencing a situation of oxidative stress. The liver turned out to be the organ that showed the highest levels of stimulation of lipid peroxidation. However, the muscle was the most sensitive since this increase took place from the lowest Ni concentration (0.1 mg/L). Similarly, an increase in SOD activity was demonstrated in all the organs of the fish exposed to the highest Ni concentrations, highlighting the greater sensitivity of the muscle, in which the Ni concentration of 0.1 mg/L was sufficient to induce an increase. CAT activity was also stimulated by all experimental doses, and in all the studied organs. The greatest increase was observed in the gills, but the muscle and the brain appeared to be the most sensitive organs, as the increase was found in the animals exposed to the lowest concentration of Ni. In any case, the results indicate that, despite this increase in the antioxidant response, it was not sufficient to prevent oxidative damage to cell membranes (lipid peroxidation) of any organ; as well as at the blood level, where a genotoxic effect (increase in MN) was detected.

In conclusion, the results of this study indicate that exposure of fish to environmentally relevant Ni concentrations induces early and widespread genotoxic damage and oxidative stress (in all organs tested). In addition, the changes detected in the different organs show the convenience of the use of these parameters as early markers of oxidative stress and genotoxicity in fish and, therefore, their usefulness for environmental monitoring of Ni contamination in the aquatic environment.

Keywords: Biomarkers, *Carassius auratus*, oxidative stress, genotoxic damage, nickel.

# ÍNDICE

Resumen .....	4
Abstract .....	5
Capítulo 1. Introducción .....	10
1.1. Contaminación por metales en el medio acuático .....	10
1.2. El Níquel (Ni) .....	11
1.2.1. El níquel en el medio ambiente .....	11
1.2.2. Efectos tóxicos del níquel .....	12
1.2.3. Efectos tóxicos del níquel en peces .....	12
1.3. Ensayo de micronúcleos .....	13
1.4. Estrés oxidativo .....	14
1.4.1. Las EROs .....	14
1.4.1.1. Radical Anión Superóxido ( $O_2^-$ ) .....	15
1.4.1.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) .....	15
1.4.1.3. Radical hidroxilo ( $HO^-$ ) .....	15
1.4.2. El daño oxidativo .....	16
1.4.3. El sistema antioxidante de defensa .....	17
1.5. Biomonitorización ambiental .....	17
1.6. Especie modelo: <i>Carassius auratus</i> (L) .....	18
1.7. Objetivos .....	19
Capítulo 2. Materiales y Métodos .....	20
2.1. Ensayos de toxicidad con níquel (Ni) en el laboratorio .....	20
2.2. Extracción y preparación de las muestras biológicas .....	20
2.3. Daño genotóxico: ensayo de micronúcleos .....	21
2.4. Metodología empleada para los parámetros bioquímicos .....	22
2.4.1. Homogenización y extracción de la fracción subcelular de los órganos .....	22
2.4.2. Medidas de parámetros bioquímicos .....	22
2.4.2.1. Evaluación de los niveles de hidroperóxidos .....	22
2.4.2.2. Evaluación de la actividad catalasa (CAT: EC 1.11.16) .....	23
2.4.2.3. Evaluación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD: EC 1.15.11) .....	23
2.4.2.4. Medida de la cantidad de proteína .....	24
2.5. Análisis estadístico .....	24

Capítulo 3. Resultados y Discusión .....	25
3.1. Resultados .....	25
3.1.1. características morfológicas de los ejemplares <i>Carassius auratus</i> (L) .....	25
3.1.2. Ensayo de micronúcleos (MN) .....	25
3.1.3. Biomarcadores de estrés oxidativo: evaluación bioquímica .....	26
3.1.3.1. Efecto del níquel sobre los niveles de hidroperóxidos (ROOH) .....	26
3.1.3.2. Efecto del níquel sobre la actividad catalasa (CAT) .....	28
3.1.3.3. Efecto del níquel sobre la actividad superóxido dismutasa (SOD) .....	30
3.2. Discusión .....	31
 Capítulo 4. Conclusión .....	 39
 Capítulo 5. Referencias bibliográficas .....	 40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema sobre formación de micronúcleos en la división celular (tomado de Zalacaín <i>et al.</i> , 2005) .....	13
<b>Figura 2.</b> Ejemplares de <i>Carassius auratus</i> (L), conocidos como pez dorado .....	19
<b>Figura 3.</b> Tanques y ejemplares de <i>Carassius auratus</i> (L) utilizados en los bioensayos .....	20
<b>Figura 4.</b> En ambas imágenes se observan eritrocitos de sangre periférica en <i>Carassius auratus</i> (L.) (flecha negra). Eritrocitos con micronúcleos (flecha roja). Aumento: 100x. Tinción: GIEMSA 5% .....	26
<b>Figura 5.</b> Frecuencia de micronúcleos (MN) inducidos por níquel en peces <i>Carassius auratus</i> (L.), tras 96 horas de exposición. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar .....	26

<b>Figura 6.</b> Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Branquias de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1 .....	27
<b>Figura 7.</b> Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Hígados de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1 .....	27
<b>Figura 8.</b> Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Músculo de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1. (\$) : p<0.05 vs. Ni 1 .....	28
<b>Figura 9.</b> Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Cerebros de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1 .....	28
<b>Figura 10.</b> Actividad Catalasa (CAT) en Hígados de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1 .....	29
<b>Figura 11.</b> Actividad Catalasa (CAT) en Branquias de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1. (\$) : p<0.05 vs. Ni 1 .....	29
<b>Figura 12.</b> Actividad Catalasa (CAT) en Cerebros de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1. (\$) : p<0.05 vs. Ni 1 .....	30
<b>Figura 13.</b> Actividad Catalasa (CAT) en Músculo de <i>Carassius auratus</i> (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): p<0.05 vs. Control. (#): p<0.05 vs. Ni 0.1 .....	30

<b>Figura 14.</b> Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en los Hígados de <i>Carassius auratus</i> (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): $p<0.05$ vs. Control. (#): $p<0.05$ vs. Ni 0.1 .....	31
<b>Figura 15.</b> Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en las Branquias de <i>Carassius auratus</i> (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): $p<0.05$ vs. Control. (#): $p<0.05$ vs. Ni 0.1 .....	31
<b>Figura 16.</b> Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en los Cerebros de <i>Carassius auratus</i> (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): $p<0.05$ vs. Control. (#): $p<0.05$ vs. Ni 0.1 .....	32
<b>Figura 17.</b> Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en los Músculos de <i>Carassius auratus</i> (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media $\pm$ error estándar (n=6 para cada órgano). (*): $p<0.05$ vs. Control. (#): $p<0.05$ vs. Ni 0.1 .....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos de tallas y pesos de los ejemplares de <i>Carassius auratus</i> (L.) para los distintos grupos experimentales para la toxicidad del Ni. Los datos se presentan como las medias $\pm$ desviación estándar .....	25
--	----

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Contaminación por metales en el medio acuático

La contaminación es un problema cada vez más recurrente en la actualidad. Son innumerables los hábitats y especies que lo sufren, especialmente el medio acuático, vulnerable por su gran complejidad.

Una de las principales causas de esta contaminación es la acumulación de xenobióticos, como los metales pesados. Son absorbidos por los organismos acuáticos a través de la cadena trófica por consecuencia, directa o indirecta, de la contaminación de las aguas (Ameur *et al.*, 2015). Esto provoca daños a nivel fisiológico e histológico en los organismos como los peces, pudiendo, incluso, desencadenar su muerte.

Los metales pesados se definen como todo metal de la tabla periódica cuyo peso atómico es mayor que el del hierro (Fe: 55.85 g/mol). Estos se suelen encontrar en la naturaleza a bajas concentraciones. Sin embargo, en grandes cantidades llegan a ser tóxicos para el medio y sus organismos. La toxicidad es la capacidad que posee un elemento o compuesto para dañar o alterar perjudicialmente alguna función biológica. Entre los metales con mayor toxicidad se recogen el Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Ti, y Zn (Galán y Romero, 2008).

La contaminación de los medios acuáticos y terrestres se produce por la degradación que genera la presencia de elementos químicos en altas concentraciones, aunque el origen del contaminante puede ser geogénico o antropogénico (Galán y Romero, 2008). La contaminación por metales pesados, de origen antropogénico, es un gran problema para el medio ambiente, especialmente el medio acuático, ya que son la principal causa de toxicidad de las masas de agua, debido a su biodisponibilidad y elevada toxicidad, y constituyen un amplio grupo de contaminantes acuáticos (Velma y Tchounwou, 2010). Así mismo, esta contaminación se ve favorecida por la emisión de residuos domésticos o la aplicación de fertilizantes y pesticidas (Sanchez *et al.*, 2005) proveniente de sus principales fuentes: los efluentes mineros e industriales, la eliminación de aguas residuales, la lixiviación de los suelos y la lluvia (Arellano *et al.*, 1999).

Cabe destacar que las principales dianas celulares de los metales son las proteínas, las membranas celulares, orgánulos y el ADN. Los efectos tóxicos de los metales pueden producirse por la interacción directa entre el ion metálico libre y su diana (Ferrer, 2003). Por otro lado, los metales pueden participar de forma directa o indirecta en la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), llevando a las células al estado de estrés oxidativo, lo cual se asocia con efectos tóxicos a diferentes niveles (Van der Oost *et al.*, 2003). Además, los metales pueden intercalarse o formar uniones covalentes con el ADN y terminar generando mutaciones si estas alteraciones no son reparadas antes de la replicación (Javed *et al.*, 2017).

Por todo lo expuesto anteriormente, la evaluación y conocimiento de los efectos tóxicos que producen estos metales pesados en el medio acuático es de

especial relevancia ambiental. De ahí, el interés de centrar nuestro estudio, a través de este trabajo, en los posibles efectos tóxicos del níquel sobre organismos acuáticos.

## **1.2. El Níquel (Ni)**

El níquel es un elemento químico cuyo número atómico es 28, y su masa atómica 58.7 g/mol. Se trata de un metal pesado de apariencia metálica con un color blanco – plateado. Es buen conductor de calor y electricidad y presenta una elevada maleabilidad y ductilidad. El estado de oxidación más común es +2, aunque puede encontrarse en complejos como 0, +1 y +3. Es un elemento traza y se encuentra en bajas concentraciones en los organismos sin ser tóxico ni perjudicial, aunque a nivel biológico, su estado de oxidación puede cambiar. Presenta características similares al hierro (Fe).

### **1.2.1. El níquel en el medio ambiente**

El níquel (Ni) se encuentra distribuido en el medio ambiente, por medio de fuentes naturales o antropogénicas. Esto favorece su absorción por los organismos, principalmente en el medio acuático donde se puede encontrar en forma de sales solubles (Rahimikia, 2017). Las concentraciones de este metal pueden llegar hasta los 2500 µg/L en masas de agua dulce contaminadas, siendo de 0.1 y 10 µg/L en aguas dulces no contaminadas. Esta contaminación se ve favorecida por ser un xenobiótico orgánico no biodegradable. En consecuencia, tras incorporarse al ecosistema se ve retenido en él, sufriendo cambios solo a nivel de localización y valencia (Kubrak *et al.*, 2012a; Kubrak *et al.*, 2012b).

Desde hace décadas, las actividades humanas, en aumento, están aportando y contribuyendo a la contaminación del medio por níquel, a través de la minería y la industria. La incineración de desechos, la quema de combustibles fósiles, y los procesos de fundición y refinado de compuestos son algunas de estas actividades, si bien los procesos por los que este elemento entra en los sistemas acuáticos, y por consiguiente en los peces, suelen ser la lluvia radiactiva de partículas, la escorrentía superficial y los efluentes industriales directos (Kubrak *et al.*, 2012a).

La distribución y contaminación de este metal en Huelva se ha visto favorecida, principalmente, por el drenaje ácido de minas (DMA) en la región. Estas han originado grandes descargas de lixiviados ácidos y con altas concentraciones de metales tóxicos, entre los que se encuentra el níquel, al estuario en el que confluyen el Río Tinto y el Río Odiel (Olías *et al.*, 2020; Montes *et al.*, 2003). En este estuario la concentración de este metal se ve incrementada, no sólo en el agua sino también en los sedimentos, por la precipitación causada debido a la mezcla del agua marina (alcalina) y del agua ácida procedente del DMA, afectando a los propios peces y otros organismos. Los niveles de níquel encontrados en el sedimento mostraron concentraciones de 4.2 mg/kg, aunque las concentraciones para otros metales, como en el caso del hierro y el manganeso, han sido superiores, observándose valores del 3.08% y 1291 mg/kg respectivamente (Torre *et al.*, 2019).

### **1.2.2. Efectos tóxicos del níquel**

El níquel tiene una función esencial en la acción o formación de guanosin-3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), un agente de señalización que regula varios procesos fisiológicos. Está presente en el ARN y está unido a varias sustancias biológicas como proteínas (queratina, insulina), aminoácidos, albúminas séricas y enzimas como la arginasa, tripsina, acetil coenzima A, carboxilasa y sintetasa (Poonkothai y Vijayavathi, 2012). Sin embargo, los estudios previos, principalmente en mamíferos, han descrito que la contaminación por níquel puede producir genotoxicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad, alteraciones histopatológicas, teratogenicidad y cancerogenicidad (Eisler, 1998; Denkhau y Salnikow, 2002; Kasprzak *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2005).

A nivel celular la unión intracelular de níquel a proteínas, el ARN y el ADN pueden causar alteraciones de la homeostasis de los metales, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, la rotura de las cadenas de ADN, inducir aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas, la disminución de la síntesis de ARN, la actividad mitótica y la expresión génica, entre otros daños (Kubrak *et al.*, 2017).

### **1.2.3. Efectos tóxicos del níquel en peces**

El níquel es un contaminante de gran toxicidad para los organismos, provocando genotoxicidad o inmunotoxicidad, entre otros efectos, aunque aún se desconocen en gran medida los problemas que causan en los peces, objetos de este estudio (Gui-Hong *et al.*, 2014). Estos efectos se producen por su capacidad bioacumulable debido a que, al ser absorbido del medio por los peces, se acumula en sus organismos y tejidos, originando un gran problema ecológico.

Algunas consecuencias de este metal es la alteración del metabolismo del animal, su contenido metálico en los tejidos, o la peroxidación lipídica, debido a que una vez es absorbido por la sangre, es transportado a todos los órganos y tejidos, especialmente al hígado y branquias, los órganos diana principales (Kubrak *et al.*, 2012b)

En peces, se ha descrito que el níquel puede causar daños morfológicos en las branquias, hígado, cerebro y riñón, cambios en los transportadores iónicos, y bioacumulación de metales en varios tejidos, inducción de metalotioneínas, efectos genotóxicos y neurotóxicos, así como cambios en el metabolismo energético (Pyle y Couture, 2011; Brix *et al.*, 2017) y en los parámetros hematológicos (Pane *et al.*, 2003; Bjerregaard *et al.*, 2015, Brix *et al.*, 2017, Topal *et al.*, 2017; Palermo *et al.*, 2015)

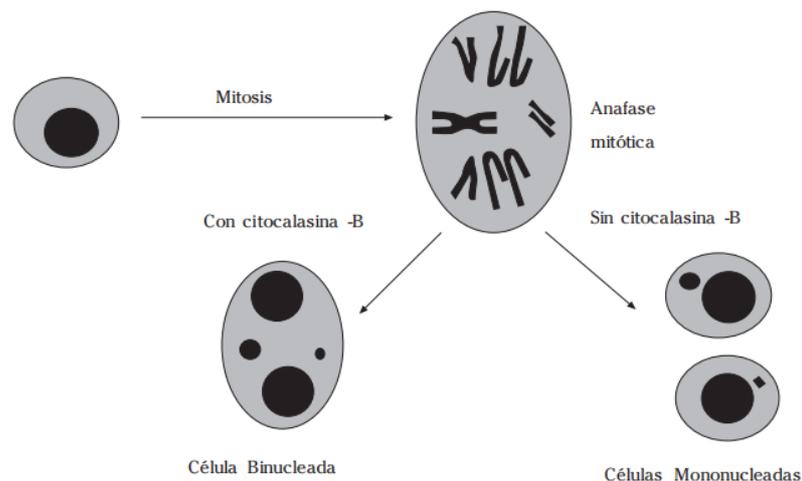
Uno de los problemas más conocidos es la inducción de estrés oxidativo, causando un desequilibrio entre la producción de EROs (especies reactivas de oxígeno) y las defensas antioxidantes, como por ejemplo la inhibición de la actividad de la enzima catalasa, lo que termina deteriorando los componentes celulares (Rahimikia, 2017; Zhaohui Sun *et al.*, 2020).

La toxicidad del níquel, su relación con el estrés oxidativo y el daño en el ADN está mayormente estudiada en mamíferos (Kubrak *et al.*, 2012b), por ello es de vital importancia su estudio en peces. Se debe tener en cuenta que estos animales son muy susceptibles a la contaminación acuática por metales, y a cualquier alteración o desequilibrio que se pueda producir en su hábitat. Por este motivo, se debe seguir estudiando su toxicidad en pos de la supervivencia y conservación de las especies que habitan el medio acuático.

### 1.3. Ensayo de micronúcleos

El test de micronúcleos se utiliza para detectar el daño genotóxico que se produce en los cromosomas debido a diversas sustancias o agentes químicos (Martínez *et al.*, 2012). Este ensayo fue desarrollado en 1975 por W. Schmind, quien inicialmente lo usó en ratones. Sin embargo, en 1976 fue utilizado por Countryman y Heddle en linfocitos humanos, siendo mejorada por Fenech y Morley en 1985. Aunque, hasta 1999, no fue validado y considerado como un biomarcador de fiable uso generalizado (Zalacain *et al.*, 2005).

El objetivo de este test es identificar los fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante el proceso de división celular por los agentes mutagénicos (Martínez *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2005). De esta forma, los micronúcleos pueden formarse por dos mecanismos, una pérdida mitótica de fragmentos acéntricos o por una pérdida mitótica de cromosomas completos. En el primer caso se produce un micronúcleo como tal, de forma redondeada y de menor tamaño, entre 1/3 y 1/6 respecto al núcleo principal, el cual queda incluido en el citoplasma (célula micronucleada). Así mismo, aunque en el segundo caso se forman un par de micronúcleos, se considera una célula binucleada ya que ambos núcleos son similares en tinción y morfología al núcleo principal inicial (figura 1) (Torres y Ramos, 2013, Zalacain *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Esquema sobre formación de micronúcleos en la división celular (tomado de Zalacain *et al.*, 2005).

En la actualidad, los ensayos de micronúcleos son los más utilizados en las diversas especies de peces debido a su probada idoneidad en estos. Esto se debe a que se produce un gran aumento en la presencia de micronúcleos en los eritrocitos

tras ser expuestos a sustancias genotóxicas, tanto en condiciones de campo, como en condiciones de laboratorio. Debido al fácil acceso y uso, este ensayo se realiza utilizando la sangre periférica en los ejemplares (Cavas *et al.*, 2005).

## 1.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio creado entre la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la capacidad de las células para eliminarlas, resultando en daños en la estructura y fisiología celular (Carocci *et al.*, 2015). El daño que se produce es tóxico y peligroso para los seres vivos, llegando a implicar principalmente la peroxidación lipídica, la desnaturalización y oxidación de las proteínas, y daños mutagénicos a nivel de ADN (Gaetea *et al.*, 2017).

### 1.4.1. Las EROs

En el metabolismo de los organismos aerobios se producen las especies reactivas del oxígeno (EROs), altamente tóxicas que en una situación normal del organismo serían eliminadas. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo se quedan presentes y generan su desequilibrio. Estos compuestos presentan uno o varios electrones desapareados en su molécula, lo cual les otorga una gran reactividad (Gaetea *et al.*, 2017).

A nivel mitocondrial, las alteraciones dadas en la reducción tetravalente del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) a agua (H<sub>2</sub>O) generan los radicales libres y especies no radicales que constituyen a las EROs. La reacción generada se produce en cuatro etapas, formando distintos radicales de oxígeno muy inestables y parcialmente reducidos, siendo estos el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (HO<sup>·</sup>) (Kelly *et al.*, 1998). Dichas etapas son la siguientes:

Reducción univalente:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$  (radical superóxido)

Reducción bivalente:  $O_2^{\cdot-} + e^- + 2 H^+ + H_2O \rightarrow H_2O_2$  (peróxido de H)

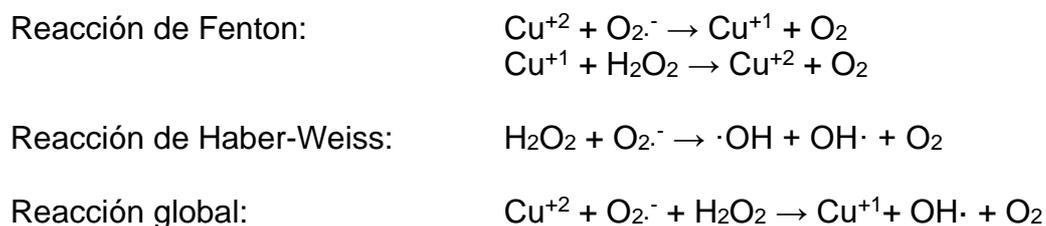
Reducción trivalente:  $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow OH^{\cdot}$  (radical hidroxilo)

Reducción tetravalente:  $OH^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$

Cabe destacar que entre el 1 y el 5% de oxígeno que no se reduce totalmente en la cadena de transporte de electrones y puede generar daños a nivel celular. Además, otra fuente endógena de producción de EROs son algunas enzimas oxidantes presentes en el propio organismo (Kelly *et al.*, 1998).

No obstante, la producción de EROs se puede inducir de forma exógena por la exposición del organismo a xenobióticos ambientales de muy diversa naturaleza, tanto orgánicos como inorgánicos. Entre estos últimos destacan los metales, cuyo efecto tóxico se explica, al menos en parte, por su capacidad de inducir estrés oxidativo de forma generalizada.

Los metales de transición con capacidad oxidorreductora como el  $\text{Fe}^{+2}$  o el  $\text{Cu}^+$ , pueden acelerar la generación de EROs al actuar como catalizadores de la reacción de Fenton que a su vez está integrada en el ciclo de Haber-Weiss (Halliwell, 2006)



#### **1.4.1.1. Radical Anión Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )**

El radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) es un radical libre producido de forma natural durante el proceso de respiración aeróbica que realizan las mitocondrias; así como en presencia de algunos xenobióticos ambientales como los metales. Se considera el radical propulsor del resto de las EROs debido a que es el primero en formarse a partir del  $\text{O}_2$  (Kelly *et al.*, 1998).

Puede generar daños importantes en el sistema biológico como la destrucción de centros metabólicos de proteínas, la oxidación de cadenas laterales de lípidos y aminoácidos, y la formación de otras especies reactivas, que se origina cuando el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  interacciona con la enzima del superóxido dismutasa (Alzate *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2005).

#### **1.4.1.2. Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se forma por la reducción o dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . No se considera un radical libre como tal al no poseer electrones desapareados en su capa de valencia. Sin embargo, se considera EROs porque reúne diversas capacidades relevantes que generan daños a nivel celular, en presencia de bajas concentraciones (Phaniendra *et al.*, 2015).

Cabe destacar la característica liposoluble que posee ya que le proporciona capacidad para atravesar las membranas biológicas, uno de sus principales peligros. Además de ser el promotor del radical hidroxilo al producirse las reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Ochoa y González, 2008), por la presencia de metales de transición como el hierro u otros radicales libres.

#### **1.4.1.3. Radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ )**

El radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) es una de las EROs más peligrosas y dañinas para los organismos. Su gran peligrosidad y toxicidad radica en que no presenta especificidad alguna en la oxidación, por ello, es capaz de interactuar con casi cualquier molécula, ADN, proteínas o lípidos, próximas a él. A esto se le suma la falta de mecanismos enzimáticos celulares que puedan eliminarlo, y su capacidad para atravesar membranas biológicas y generar reacciones en cadena. La elevada

reactividad que presenta, así como la inexistencia de mecanismos enzimáticos celulares que la eliminen, hacen que evitar su formación sea una estrategia muy importante (Vranová *et al.*, 2002).

### **1.4.2. El daño oxidativo**

Como se ha mencionado en puntos anteriores, el estrés oxidativo y por consiguiente, el daño que le produce a las células es generado por las EROs, quienes causan las principales lesiones a nivel celular (Ochoa y González, 2008): la peroxidación lipídica y la oxidación de las membranas celulares, la oxidación y carbonilación de las proteínas, la oxidación de ácidos nucleicos, y la alteración del estado redox en las células.

La peroxidación lipídica (LPO), o lipoperoxidación, es considerado una de las lesiones más importantes debido a que la degradación oxidativa de los lípidos altera la estabilidad de la membrana celular, abundante en ácidos grasos y, por ende, a las funciones biológicas. La lipoperoxidación se produce en tres fases:

- Fase I (Iniciación). Esta fase se produce cuando las EROs extraen los átomos de hidrógeno que se encuentran en las cadenas alifáticas de los ácidos grasos. Principalmente actúa el radical  $\text{OH}^\cdot$ , y origina un radical lipídico inestable ( $\text{R}^\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).
- Fase II (Propagación). Cuando el oxígeno molecular y el radical lipídico reaccionan, se produce la fase de propagación, en la cual se generan radicales peróxidos y peróxidos cíclicos, radicales alcoxílicos lipofílicos, y radicales hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ),
- Fase III (Terminación). En esta última fase, los radicales originados en la fase de propagación reaccionan con nuevos ácidos grasos, creando nuevos radicales lipídicos e hidroperóxidos, pudiéndose descomponer estos últimos en varias especies reactivas, mayormente tóxicas y mutagénicas.

En el caso de las proteínas, el daño oxidativo producido principalmente sobre los aminoácidos, producen el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas, la fragmentación de la proteína, y la formación de los grupos carbonilos, impidiendo el funcionamiento normal (Rodríguez *et al.*, 2001), lo que se traduce en alteraciones estructurales y funcionales en las células, órganos y tejidos.

En el ADN, las EROs inducen modificaciones químicas de las bases, así como roturas de las hebras. Principalmente es atacado por el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), quien produce la hidroxilación, la apertura del anillo y la fragmentación del propio ADN, y consecuentemente, altera la expresión genética, genera mutaciones y produce carcinogénesis (Kelly *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2001).

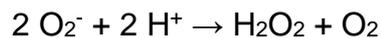
### **1.4.3. El sistema antioxidante de defensa**

Los organismos aeróbicos han desarrollado diversos mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo producido por las EROs, para eliminarlas o transformarlas en moléculas estables, o poder prevenir sus daños. Estos mecanismos de defensas se califican como antioxidantes, y se diferencian en dos categorías: de tipo enzimático y no enzimático.

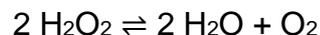
#### **➤ Antioxidantes de tipo enzimático**

El sistema antioxidante enzimático es el más efectivo frente a los radicales libres debido a que su actividad enzimática desactiva específicamente a los EROs. Está compuesto por una gran variedad de actividades enzimáticas capaces de desactivar selectivamente diferentes tipos de EROs, entre las que destacan el superóxido dismutasa, (SOD) y la catalasa (CAT).

- Superóxido dismutasa (SOD): se trata de una familia de metaloenzimas con una gran eficacia catalítica en eliminar el Radical Anión Superóxido ( $O_2^-$ ). Catalizan una reacción de dismutación, la cual produce oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.



- Catalasa (CAT): constituye una hemoproteína, y se llega a encontrar en casi todos los órganos. Su función es catalizar la reacción del peróxido de hidrógeno a agua.



#### **➤ Antioxidantes de tipo no enzimático**

Este sistema se compone por moléculas como la vitamina E, la vitamina C (ácido ascórbico), el glutatión (GSH), y los carotenoides, pero no serán objeto de estudio en este trabajo.

## **1.5. Biomonitorización ambiental**

La Biomonitorización, también conocida como monitorización biológica, consiste en utilizar de forma regular o sistemática a organismos vivos para evaluar los cambios que se produzcan en el medio ambiente (De Zwart, 1995). Para realizar una monitorización efectiva se requieren una representatividad de la población general, una continuidad en el tiempo, y el uso de protocolos y procedimientos analíticos, además de un biomarcador efectivo (Ibarluzea *et al.*, 2016).

Un biomarcador es un factor cuantificable que se monitoriza para conocer las alteraciones que se producen en la respuesta biológica, a la exposición de contaminantes ambientales (Van der Oost *et al.*, 2003). Los biomarcadores bioquímicos y citológicos determinan las alteraciones celulares, ya sean a nivel de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos; así como a nivel estructural. En el presente trabajo se pretende evaluar el daño genotóxico mediante el ensayo de

micronúcleos, así como el daño oxidativo y la respuesta antioxidante inducidos por la exposición de peces al níquel en el agua.

Los peces son excelentes bioindicadores debido a sus capacidades de biomagnificación y bioacumulación de los xenobióticos ambientales, y el lugar que ocupan en la cadena trófica. Por ello, se han usado durante décadas para la biovaloración de la magnitud de los contaminantes ambientales en el medio acuático, el cual recibe una gran cantidad de metales pesados que se bioacumulan en sus órganos y tejidos (Powers, 1989; Van der Oost *et al.*, 2003). Para conocer el daño celular que se produce por estos metales, se realizan estudios de biomarcadores como la catalasa (CAT), el superóxido dismutasa (SOD) o los hidroperóxidos (ROOH) (Ochoa y González, 2008). Los ensayos ecotoxicológicos que abordan la evaluación de las respuestas biológicas y bioquímicas generadas por los organismos frente a los contaminantes ambientales, utilizan peces puesto que son bioindicadores excelentes del medio acuático (Powers, 1989).

Los peces son organismos modelos para la monitorización al encontrarse propagados por el medio acuático, y en gran parte de todos los ambientes, incluyendo zonas contaminadas. Las respuestas biológicas que generan frente a la contaminación se asemejan a las respuestas de los mamíferos. Se debe destacar que, al incluir diferentes niveles tróficos, pueden portar energía entre ellos, jugando un papel fundamental en la cadena trófica acuática (Beyer, 1996). Por otra parte, se destaca la capacidad de recuperación que presentan los peces frente a la desaparición de las perturbaciones, lo cual se adecua a la sensibilidad ante pequeños cambios ambientales (Bhattacharya *et al.*, 2007).

Los estudios de toxicidad en peces, a nivel económico y biológico reducen costes al usar peces de acuario, ya que son pequeños y ofrecen patrones de acumulación dependientes del metal al que son expuestos, de la concentración de este, y del tiempo de exposición (Domitrovic, 1997; Eisler *et al.*, 1972). Por esta razón, los estudios, tanto de campo como de laboratorio, realizados con diferentes especies de peces y para distintos tipos de marcadores enzimáticos y genéticos, han demostrado que los peces son biomarcadores veraces para la biomonitorización de los contaminantes acuáticos.

## **1.6. Especie modelo: *Carassius auratus* (L.)**

Para monitorizar el medio acuático y cómo afecta el níquel, objeto de estudio, a este, se ha utilizado como biomarcador la especie *Carassius auratus* (L.). Estos peces pertenecen al género *Carassius* (Cypriniformes) y son formas avanzadas de teleósteos, conocidos comúnmente como pez dorado (figura 2). Presentan una función molecular muy característica, la contractilidad miocárdica, la cual les permite permanecer activos en invierno, aunque la masa de agua esté cubierta por hielo, y tolerar condiciones hipóxicas severas. Además de otras características, como su abundancia, su fácil adquisición y distribución, y su elevada resistencia al estrés, entre otras (Garofalo *et al.*, 2012; Kubrak *et al.*, 2012a).



**Figura 2.** Ejemplares de *Carassius auratus* (L), conocidos como pez dorado.

Así mismo, cabe destacar la escasez de estudios relacionados con la evaluación de la toxicidad del níquel en peces en contraste con otros metales más estudiados. Por lo tanto, se requieren estudios más detallados sobre este metal para ayudar al desarrollo de procedimientos de monitorización ambiental en los ecosistemas acuáticos.

## 1.7. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar los efectos tóxicos tempranos que produce la presencia de níquel en el medio acuático en ejemplares adultos de la especie *Carassius auratus* (L.). Para ello, se realizaron bioensayos de exposición a Ni a diferentes concentraciones en el laboratorio y se evaluaron biomarcadores de daño genotóxico y de estrés oxidativo.

Para ello, los objetivos específicos establecidos en referencia a los biomarcadores son:

1. Evaluación de la inducción de daño genotóxico mediante ensayo de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.
2. Evaluación del estrés oxidativo en hígado, branquias, cerebro y músculo.
  - a) Evaluación de los mecanismos de respuesta antioxidante inducida por el níquel: análisis de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en los diferentes tejidos.
  - b) Evaluación de posibles daños celulares a través de la medición de la peroxidación lipídica (medida de hidroperóxidos orgánicos) en los tejidos de estudio.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ensayos de toxicidad con níquel (Ni) en el laboratorio

Este estudio se ha llevado a cabo con peces de la especie *Carassius auratus* (L.) en estadio adulto (figura 3). Los ejemplares fueron acomodados en tanques de vidrios con una capacidad de 15 litros cada uno.

En el inicio del tratamiento, los ejemplares se aclimataron en los tanques sin ser alimentados. Tras lo cual se iniciaron los bioensayos correspondientes. Las condiciones utilizadas para el ensayo fueron las siguientes: los tanques se llenaron con agua dulce a temperatura ambiente (25°C aproximadamente), con pH entre 7 y 8, y oxigenación constante. Durante el ensayo (96 horas) se tuvieron bajo control las variables luz/oscuridad con un fotoperiodo de 12 horas, y no se realizó ningún cambio de agua durante todo el transcurso del bioensayo.

Las concentraciones netas de Ni, en orden creciente, fueron las siguientes:

- a. Tratamiento 0 (Control, T<sub>C</sub>): con una concentración de Ni 0 mg/L.
- b. Tratamiento 1 (T<sub>0</sub>): ejemplares expuestos a una concentración de Ni 0.1 mg/L.
- c. Tratamiento 2 (T<sub>1</sub>): ejemplares expuestos a una concentración de Ni 1 mg/L.
- d. Tratamiento 3 (T<sub>10</sub>): ejemplares expuestos a una concentración de Ni 10 mg/L.



**Figura 3.** Tanques y ejemplares de *Carassius auratus* (L) utilizados en los bioensayos.

### 2.2. Extracción y preparación de las muestras biológicas

Tras acabar el periodo experimental, se realizó la extracción y procesamiento de las muestras, que posteriormente se utilizaron en los análisis bioquímico y micronúcleos (efecto genotóxico). Se seleccionaron los ejemplares al azar del tanque de control y de los tanques con las diferentes concentraciones. Concluido el periodo de exposición, se anestesiaron los ejemplares mediante una dosis de 0,1%

de 2-phenoxyethanol. Seguidamente, se pesaron y midieron, para conocer las características morfológicas que presentaban los peces utilizados en el experimento de toxicidad de níquel, y finalmente se sacrificaron para extraerles sangre del pedúnculo caudal, y los diferentes órganos de estudio.

Las muestras para el efecto genotóxico fueron obtenidas en el mismo momento, realizando el correspondiente frotis sanguíneo. Para el estudio de los biomarcadores de estrés oxidativo las muestras de tejidos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

Todo los procedimientos experimentales y el mantenimiento de los ejemplares se realizaron teniendo en cuenta la Directiva CEE 86/609 sobre Guía de uso y cuidado de animales de laboratorio.

### **2.3. Daño genotóxico: ensayo de micronúcleos**

Para estudiar el efecto genotóxico se determinó la frecuencia de micronúcleos (MN) en los eritrocitos en sangre, obteniéndose de la aleta caudal de cada ejemplar. Para ello, se utilizó el método descrito en Cavas et al. (2005), tanto para la preparación de los portaobjetos como para la evaluación e identificación de micronúcleos.

Una vez anestesiados y sacrificados los peces, se extrajo instantáneamente las muestras de sangre periférica de la aleta caudal, las cuales se extendieron sobre un portaobjeto y se fijaron con etanol puro durante unos 20 minutos hasta secarse. Tras esto se tiñeron con una solución de Giemsa al 5%, introduciéndolo, en primer lugar, en eosina (color rojo para teñir el núcleo) durante 5 minutos, con un minuto de descanso por cada minuto contado y, en segundo lugar, en azul de metileno (azul para teñir el citoplasma) durante el mismo tiempo. Transcurrido esto, se introdujo en alcohol al 50% durante 5 minutos seguidos. Se dejó secar y se añadió alcohol al 70%, se secó durante 5 min, se añadió alcohol al 90%, se dejó secar otros 5 min, y se añadió alcohol puro. Finalmente, tras secar el alcohol, se añadió xilol y se procedió al montaje de los portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá.

Se evaluó solo los eritrocitos (células) aislados de otros contiguos, y se identificó los micronúcleos. Los criterios para identificarlos fueron:

- Los MN deben ser más pequeños que  $1/3$  del tamaño de los núcleos principales.
- Los MN deben estar claramente separados de los núcleos principales.
- Los MN deben encontrarse en el mismo plano de enfoque y tener el mismo color que los núcleos.

Para la observación y evaluación de los portaobjetos se utilizó el objetivo de  $\times 100$  empleando el microscopio óptico Leica DM 2500, y expresando la frecuencia de micronúcleos como el número de MN/1000 células para un número aproximado entre 500 y 800 células por portaobjeto de muestra. Se eliminó el error de sesgo en la evaluación de MN al codificar las muestras una persona distinta a la que realizó el conteo.

## **2.4. Metodología empleada para los parámetros bioquímicos**

### **2.4.1. Homogenización y extracción de la Fracción Subcelular de los Órganos**

Para llevar a cabo los análisis bioquímicos se utilizó una fracción subcelular correspondiente a cada órgano, obtenida por un proceso de troceado y homogenización de la misma, utilizando el T10 Basic ULTRATURRAX®. Durante todo el proceso se mantuvo en contacto con hielo, para no perder temperatura, y en presencia de un tampón homogeneizador, concretamente el tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 KCl 1.2%.

Tras obtener el homogeneizado de los órganos, se inició la fase de centrifugación, a 10000g durante 30 minutos a 4°C, resultando un sobrenadante que se alícuota, conservándolo de nuevo a -80°C para su posterior utilización en los ensayos bioquímicos.

### **2.4.2. Medidas de parámetros bioquímicos.**

Los parámetros bioquímicos se evaluaron mediante los niveles de peroxidación lipídica (LPO) y mediante distintas actividades enzimáticas medidas por espectrofotometría. Para realizar el proceso se utilizó un espectrofotómetro DU® 800 de Beckman Coulter, un termo para mantener unos 30°C, y realizando las medidas por duplicado.

#### **2.4.2.1. Evaluación de los Niveles de Hidroperóxidos**

El proceso para evaluar los niveles de hidroperóxidos se realizó siguiendo el método descrito por Gay y Gebicki (2000), utilizándose para ello 50 µL de muestra (sobrenadante resultante del centrífugo) mezclado con 100 µL de reactivo Ferric – Xilenol Orange (FOX). El reactivo se compuso por:

- Ácido sulfúrico 25 mM
- Xylenol – Orange (XO) 100 µL en 300 mL de disolución
- Sorbitol 100 mM
- Sulfato Amónico de Fe (II) 250 µM

La mezcla obtenida se agitó y se incubó durante unos 45 minutos, y dejándola reposar en oscuridad. Seguidamente, se midió en el espectrofotómetro DU® 800 de Beckman Coulter, con una absorbancia de 560 nm utilizando cubetas de plástico. Las muestras se encontraron en dilución de 1/20, con un coeficiente de extinción de  $2.67 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.4.2.2. Evaluación de la Actividad Catalasa (CAT: EC 1.11.16)**

La actividad catalasa se midió siguiendo el método descrito en Aebi (1983). La mezcla utilizada para la reacción se compuso por:

- Tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7): 2867.5  $\mu\text{L}$  para hígados, 2485  $\mu\text{L}$  para branquias, 2450  $\mu\text{L}$  para cerebros, 2460  $\mu\text{L}$  para músculos.
- Agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): 125  $\mu\text{L}$  (hígados), 500  $\mu\text{L}$  (branquias, cerebros y músculos).
- Muestra del órgano correspondiente: 2.5  $\mu\text{L}$  (hígados), 15  $\mu\text{L}$  (Branquias), 50  $\mu\text{L}$  (cerebros), 40  $\mu\text{L}$  (músculos).

Todo ello constituye un volumen final de 3 mL. Las medidas se tomaron en el espectrómetro DU® 800 Beckman Coulter, con una longitud de onda de 240 nm, y una duración de 30 segundos para hígados, 60 segundos para branquias, y 120 segundos para cerebros y músculos. El coeficiente de extinción usado fue de  $43.5 \text{ Mn}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , además la actividad catalasa se calculó en términos de nanomoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por minuto y mg de proteínas ( $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}$ ).

#### **2.4.2.3. Evaluación de la Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD: EC 1.15.11)**

Para medir la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) se siguió una metodología modificada del método expuesto por McCord y Fridovich (1969). La mezcla utilizada para esta reacción contenía:

- Tampón fosfato potásico 50 mM
- EDTA 5 mM a pH 7.14
- Xantina 50mM
- NBT 1 mM
- Xantina Oxidasa 5.4 U/mL 60  $\mu\text{L}$
- Muestra homogeneizada 5  $\mu\text{L}$

Este método se fundamenta en la capacidad del SOD para inhibir la reducción del NBT (color amarillo) medida por el radical superóxido  $\text{O}_2^-$  que se genera por el sistema de la xantina oxidasa. Una vez reducido el NBT por la presencia del radical, se produce un compuesto de color azul, conocido como azul de formazán. Mediante la adición de la xantina oxidasa se inicia la reacción. Para alcanzar la máxima velocidad se realizó una incubación de 1 minuto, tras la que se toma la medida a 560 nm, durante 1 minuto sin muestra, y a continuación se vuelve a tomar con muestra para cuantificar el grado de inhibición. Como referencia de control se recoge una medida de la reducción del NBT en ausencia de muestra.

Para la obtener las medidas se usó el espectrofotómetro DU® 800 Beckman Coulter, y se tuvo en cuenta que una unidad de actividad SOD constituye la cantidad de enzima que produce un 50% de inhibición del control, donde el tampón sustituye a la muestra. La actividad SOD se expresó en U/mg proteína.

#### **2.4.2.4. Medida de la Cantidad de Proteína**

El método de Bradford et al. (1976) describe el procedimiento que se utilizó para determinar la cantidad de proteína. Este procedimiento colorimétrico se realizó con el espectrofotómetro DU® 800 Beckman Coulter, utilizando una mezcla conformada por:

- Muestra 20  $\mu\text{L}$
- Hidróxido de sodio (NaOH) 50  $\mu\text{L}$
- Reactivo Bradford 1000  $\mu\text{L}$

La mezcla resultante se agitó y se dejó reposar aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, se midió en el espectrómetro a las longitudes de onda de 590 nm y 450 nm, y construyendo con los datos obtenidos una recta de calibrado con BSA (Albumina de suero Bovino) 1 mg·ml<sup>-1</sup>.

### **2.5. Análisis estadístico**

En el estudio se analizaron 6 muestras por cada órgano y cada medida de actividad fue repetida por triplicado. Los datos son expresados como media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el programa estadístico SPSS22. La normalidad se comprobó mediante el Test Kolmorov – Smirnov. En los casos donde los grupos de estudio no cumplían las condiciones de normalidad, se usaron tests no paramétricos. Para la comparación de medias entre los grupos experimentales, se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal – Wallis, seguido del Test Man – Whitney como *post hoc*. Las diferencias significativas fueron consideradas a  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Resultados

#### 3.1.1. Características morfológicas de los ejemplares *Carassius auratus* (L.)

En la siguiente tabla (tabla 1) se recogen los valores medios de las tallas totales, las tallas estándar y los pesos de dichos ejemplares. En total, los peces del experimento presentaron unas tallas totales medias de  $12.9 \pm 0.3$  cm, una talla estándar media de  $10.0 \pm 0.3$  cm y un peso medio de  $27.2 \pm 2.3$  g.

**Tabla 1.** Datos de tallas y pesos de los ejemplares de *Carassius auratus* (L.) para los distintos grupos experimentales para la toxicidad del Ni. Los datos se presentan como las medias  $\pm$  desviación estándar.

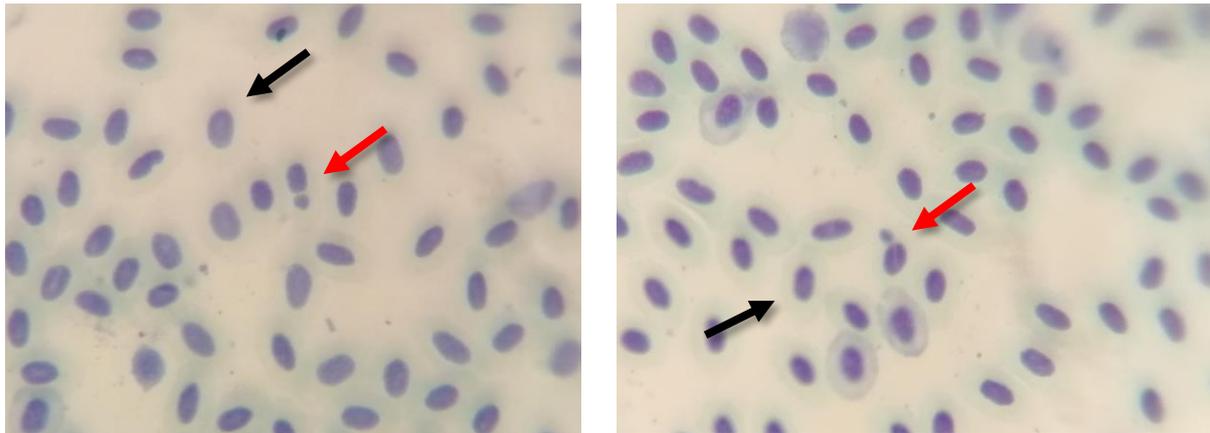
Tratamiento	mg/L de Ni	Nº de peces	Peso (g)	Talla Std (cm)	Talla total (cm)
Control	0	5	$31,7 \pm 0,9$	$10,4 \pm 0,2$	$13,4 \pm 0,2$
T0,1	0,1	5	$32,3 \pm 5,4$	$10,5 \pm 0,8$	$13,2 \pm 0,4$
T1	1	7	$21,1 \pm 0,7$	$9,3 \pm 0,1$	$12,3 \pm 0,1$
T10	10	7	$23,6 \pm 1,9$	$10,0 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,2$
Total	-	24	$27,2 \pm 2,3$	$10,0 \pm 0,3$	$12,9 \pm 0,3$

#### 3.1.2. Ensayo de micronúcleos (MN)

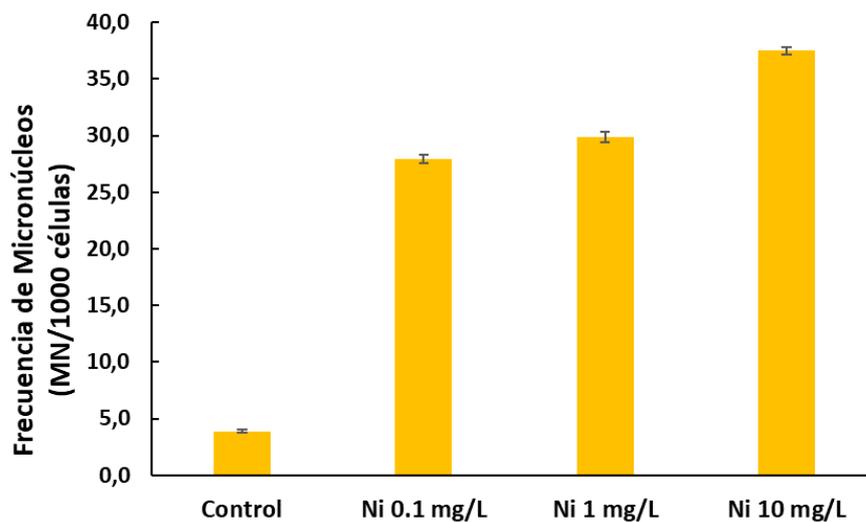
Para analizar los micronúcleos que se pudieran encontrar en la sangre periférica obtenida de la aleta caudal de *Carassius auratus* (L.), se utilizó microscopía óptica. En dicho análisis se pudieron observar eritrocitos normales cuyo núcleo central tenía un contorno definido. No obstante, en menor medida, se observaron eritrocitos anómalos, los cuales presentaban alteraciones, sólo considerando éstas cuando se trataba de micronúcleos bien definidos (figura 4), como se describe en los parámetros expuestos en el apartado “2.3. Efecto genotóxico: ensayo de micronúcleos” de la presente memoria.

Como se aprecia en la figura 5, tras la exposición de los ejemplares a las diversas concentraciones de níquel, se observa una tendencia creciente hacia el incremento del número de micronúcleos, asociado al aumento de la concentración de níquel en el agua. Los niveles de micronúcleos contados para las tres dosis de exposición, 0.1 mg/L, 1 mg/L y 10 mg/L, mostraron un incremento significativo frente al control.

Los datos representados expresados como el número de MN/1000 células, para las dosis 0.1 y 1 mg/L presentan una similitud en los datos obtenidos tras la cuantificación de los micronúcleos, siendo el promedio  $27.94 \pm 0.37$  y  $29.84 \pm 0.46$  respectivamente. En la dosis de Ni 10 mg/L se obtuvo un  $37.50 \pm 0.35$ , mientras que para el control se cuantificó un  $3.91 \pm 0.13$  por mil células.



**Figura 4.** En ambas imágenes se observan eritrocitos de sangre periférica en *Carassius auratus* (L.) (flecha negra). Eritrocitos con micronúcleos (flecha roja). Aumento: 100x. Tinción: Gimsa 5%.



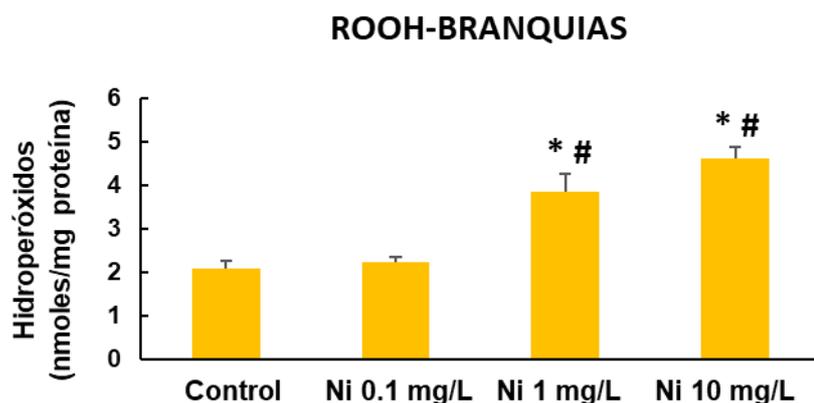
**Figura 5.** Frecuencia de micronúcleos (MN) inducidos por níquel en peces *Carassius auratus* (L.), tras 96 horas de exposición. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar, n=7. (\*):  $p < 0,05$  vs Control, T1, T2 y T3.

### 3.1.3. Biomarcadores de Estrés oxidativo: evaluación bioquímica

#### 3.1.3.1. Efecto del níquel sobre los Niveles de Hidroperóxidos (ROOH)

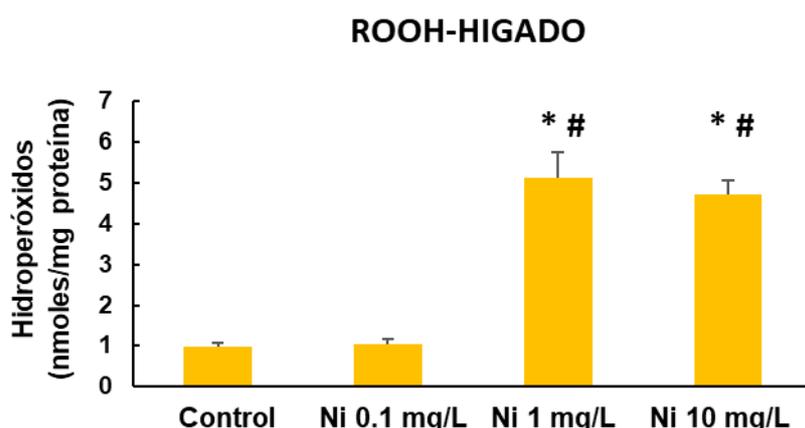
Un indicativo clave para conocer el daño oxidativo que se puede producir en un tejido, es el proceso de peroxidación lipídica. Durante el ataque oxidativo a los lípidos, se producen los hidroperóxidos (ROOH), generados en la reacción en cadena inducida por las EROs que se produce en las membranas en el transcurso de esta peroxidación. En este trabajo para la evaluación y cuantificación de los niveles de hidroperóxidos, se utilizó el método FOX (Fe – Orange xilenol) descrito por Gay y Gebicki (2000).

En la figura 6 se representan los niveles de hidroperóxidos medidos en las branquias de los peces tratados con níquel transcurridas las 96 horas. Como se observa, hay un aumento significativo de los niveles de hidroperóxidos de los ejemplares tratados con Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L respecto al control.



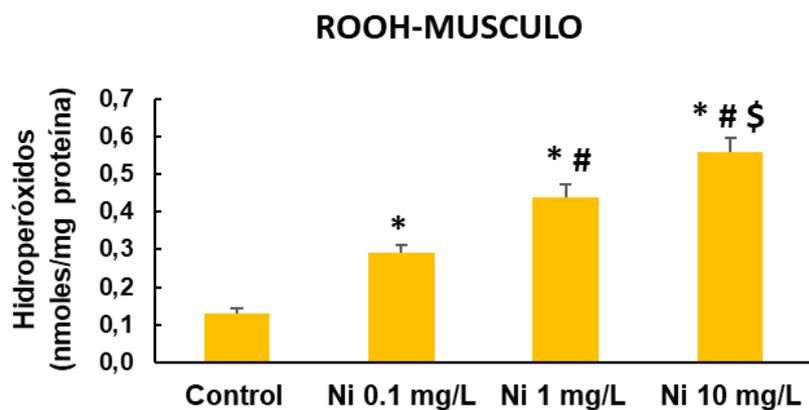
**Figura 6.** Niveles de hidroperóxidos (ROOH) en Branquias de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

Como se aprecia en la figura 7, correspondiente al hígado los ejemplares tratados con una concentración de Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L se observó un gran aumento de los niveles de hidroperóxidos frente al control, aunque en la concentración más baja (Ni 0.1 mg/L) no se observó ninguna alteración.



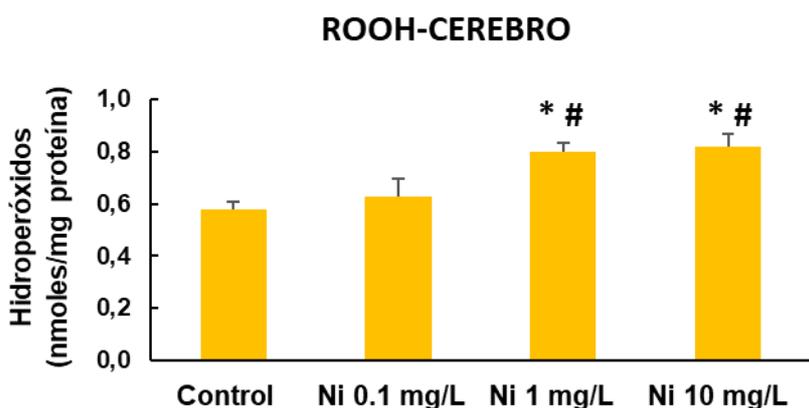
**Figura 7.** Niveles de hidroperóxidos (ROOH) en Hígados de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

En la figura 8 se representan los datos de las concentraciones de hidroperóxidos referidas al músculo. Se aprecia un efecto dosis – dependiente, con un aumento significativo en relación al control desde la dosis más baja hasta la dosis más alta a la que fueron expuestos los ejemplares.



**Figura 8.** Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Músculo de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1. (\$):  $p < 0.05$  vs. Ni 1.

Como se observa en la figura 9, para los resultados referidos a cerebro, se percibe un leve aumento, no significativo para la dosis Ni 0,1 mg/L. No obstante, para las dosis más altas de níquel, 1 mg/L y 10 mg/L sí se produce un aumento significativo frente al control.

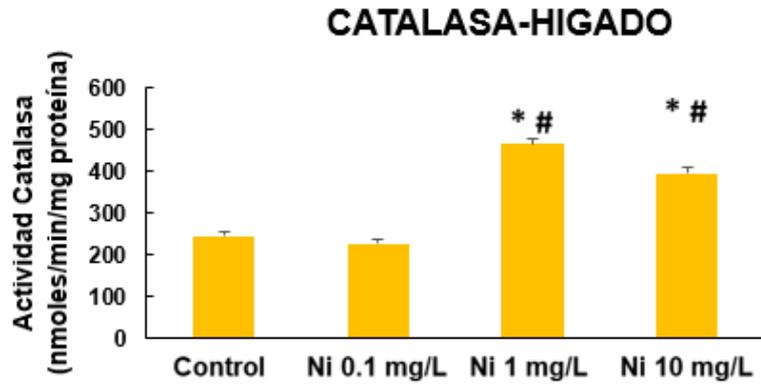


**Figura 9.** Niveles de hidropéroxidos (ROOH) en Cerebros de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

### 3.1.3.2. Efecto del níquel sobre la Actividad Catalasa (CAT)

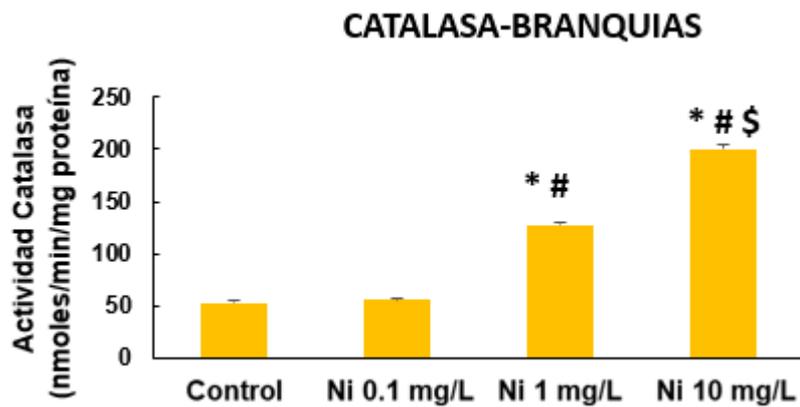
La actividad catalasa reside en una familia de isoenzimas especializadas en la eliminación del  $H_2O_2$ , sin necesidad de disponer de un sustrato reducido. En este estudio se ha evaluado mediante el método de Aebi (1983).

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad Catalasa (CAT) en el hígado de los ejemplares estudiados. Como puede observarse, hay un aumento significativo en las concentraciones Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L en relación al control, no observándose efecto alguno en los peces expuestos a Ni 0.1 mg/L.



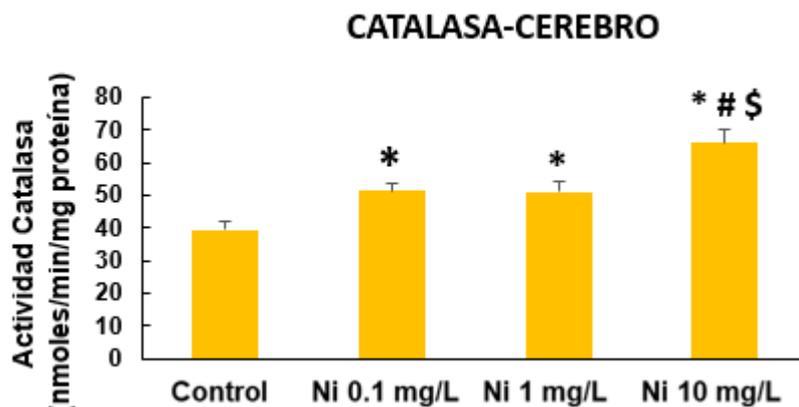
**Figura 10.** Actividad Catalasa (CAT) en Hígados de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

Respecto a las branquias, en la figura 11 no se observa ninguna diferencia significativa entre la concentración Ni 0.1 mg/L y el grupo control, sin embargo, para las concentraciones Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L se produce un aumento de la actividad catalasa.



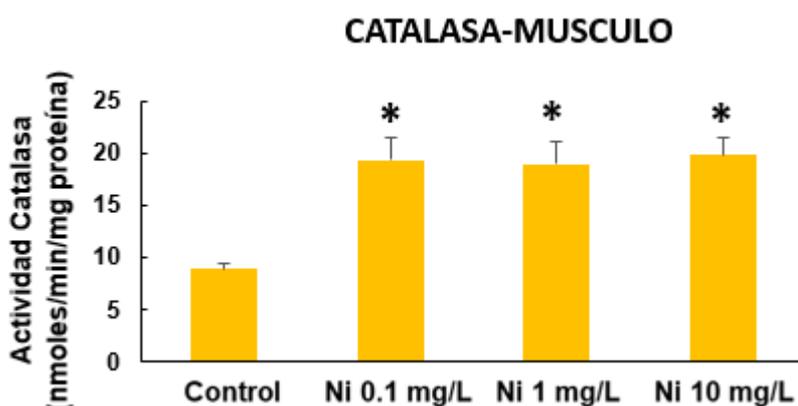
**Figura 11.** Actividad Catalasa (CAT) en Branquias de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1. (\$) :  $p < 0.05$  vs. Ni 1.

Como se aprecia en la figura 12, en el caso del cerebro, se producen un aumento en los tres tratamientos frente al control. Tanto para la concentración Ni 0.1 mg/L como para la concentración Ni 1 mg/L, el aumento es semejante y más elevado para Ni 10 mg/L.



**Figura 12.** Actividad Catalasa (CAT) en Cerebros de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1. (\$):  $p < 0.05$  vs. Ni 1.

En la figura 13 se exponen los datos referidos al músculo, y como puede apreciarse, la actividad CAT aumentó en los peces expuestos a las tres concentraciones creciente de níquel.

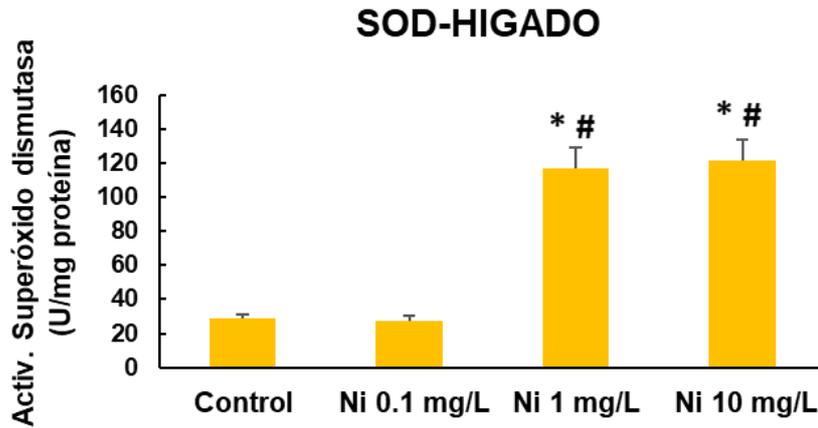


**Figura 13.** Actividad Catalasa (CAT) en Músculo de *Carassius auratus* (L.), expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control.

### 3.1.3.3. Efecto del níquel sobre la Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

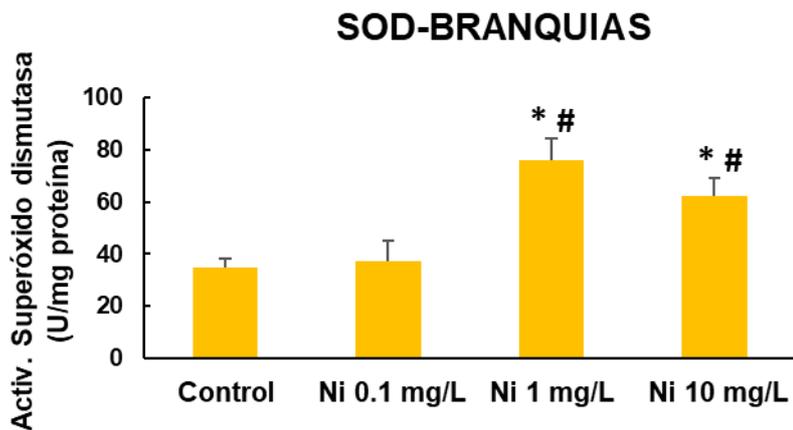
La actividad superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa frente al radical superóxido, que es transformado en agua oxigenada (reacción de dismutación). En las células eucarióticas existen dos tipos, CuZn-SOD y Mn-SOD, siendo ésta última de localización mitocondrial. En este trabajo se ha evaluado la actividad SOD total.

En la figura 14, se muestran los niveles de la actividad enzimática antioxidante SOD para los hígados estudiados de los ejemplares *Carassius auratus* (L.). Se puede observar tanto en la concentración Ni 1 mg/L, como en la concentración Ni 10 mg/L, un aumento significativo no sólo frente al control sino también frente a la dosis más baja (0.1 mg/L) de níquel.



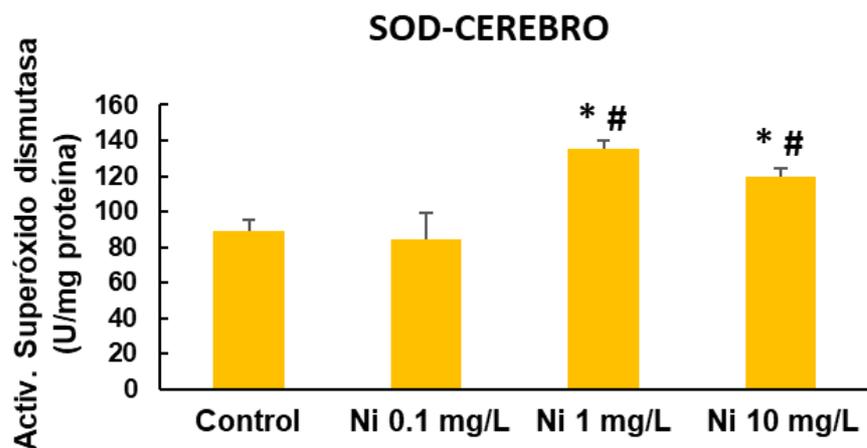
**Figura 14.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en los Hígados de *Carassius auratus* (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

Como se aprecia en la figura 15, para el caso de las branquias, la concentración Ni 0.1 mg/L no muestra un aumento significativo respecto al control. Sin embargo, las concentraciones Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L sí presentan un aumento significativo frente al control.



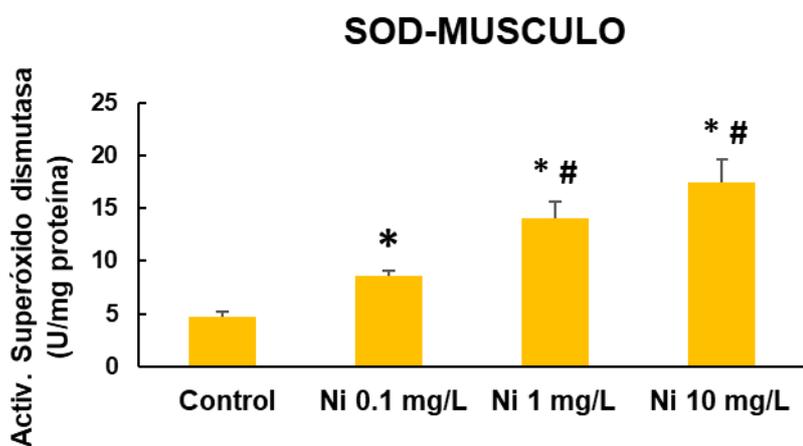
**Figura 15.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en las Branquias de *Carassius auratus* (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

En la figura 16 se observa que en el cerebro se produce un aumento de la actividad SOD en los peces expuestos a Ni 0.1 mg/L y 1 mg/L. En cambio, para Ni 0.1 mg/L no se aprecian cambios.



**Figura 16.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en los Cerebros de *Carassius auratus* (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

Como se observa en la figura 17, en el músculo hay un aumento significativo de la actividad SOD en los peces expuestos a Ni desde el tratamiento con menor concentración (0.1 mg/L) hasta el tratamiento con mayor concentración (10 mg/L).



**Figura 17.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en los Músculos de *Carassius auratus* (L.) expuestos a tratamientos con diferentes concentraciones de níquel (mg/L). Se representa la media  $\pm$  error estándar (n=6 para cada órgano). (\*):  $p < 0.05$  vs. Control. (#):  $p < 0.05$  vs. Ni 0.1.

### 3.2. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio es la evaluación del efecto tóxico del níquel en el medio acuático. Por ello, ejemplares de la especie *Carassius auratus* (L.), fueron expuestos a diferentes concentraciones de níquel en el agua (0.1, 1 y 10 mg/L) tomando muestras de sangre para la evaluación del daño genotóxico, y muestras de diferentes órganos (hígado, branquias, músculo y cerebro) para estudiar el daño oxidativo por medio de la peroxidación lipídica, y la respuesta antioxidante mediante las actividades de la enzima catalasa y superóxido dismutasa.

Los ecosistemas acuáticos son medios muy castigados por la contaminación, especialmente por los metales pesados. Las actividades antropogénicas relacionadas con la agricultura y la industria, y en general, el aumento de su demanda mundial en las últimas décadas ha producido una extensa contaminación del medio ambiente, y especialmente de estos ecosistemas. Si bien los metales se pueden encontrar en bajas concentraciones en el agua y sus organismos, ya que son necesarios para el correcto desarrollo del ecosistema, el problema contaminante se origina cuando surgen concentraciones elevadas, producidas y favorecidas por la gran capacidad de movilización, absorción y la bioacumulación de estos en los tejidos animales, dotando así a los metales pesados de una alta toxicidad. A nivel biológico, estas sustancias se unen al ADN o a macromoléculas, pudiendo fomentar la inducción del estrés oxidativo (Gaetea *et al.*, 2017). Así mismo, la toxicidad que poseen dependerá de varios factores como la ruta que emprendan, el lugar del organismo en la cadena alimenticia, el tipo de metal pesado al que se exponga, la edad de los organismos, el género y/o la genética (Luczynska *et al.*, 2018). Por ello, es necesario evaluar los riesgos potenciales de los metales pesados para los organismos acuáticos, especialmente los peces (Kubrak *et al.*, 2012, Topal *et al.*, 2017).

El níquel es un metal traza ubicuo y natural (0.0086 % de la corteza terrestre), que ha ganado una atención considerable como un potente contaminante debido a la creciente presión antropogénica sobre el ambiente (Topal *et al.*, 2017). A pesar de ser un metal esencial para microorganismos, plantas y animales (hay pruebas que sugieren que lo sea en particular para los peces) (Pyle y Couture, 2012), a concentraciones elevadas es potencialmente peligroso debido a su genotoxicidad, inmunotoxicidad, mutagenicidad y cancerogenicidad (Kubrak *et al.*, 2013; Poonkothai y Vijayavathi, 2012; Kubrak *et al.*, 2013). El agua generalmente contiene níquel en concentraciones < 10 µg/L; sin embargo, en ambientes de agua dulce contaminados puede alcanzar hasta 2.5 mg/L (Eisler, 1998). En algunos ríos se han demostrado concentraciones desde 0.001 a 0.01 mg Ni/L hasta 0.5 y 2 mg Ni/L (Chau y Kulikovsky-Cordeiro, 1995).

En el medio acuático, el Ni se encuentra como ion libre o formando complejos con sustancias orgánicas, como el carbono, o inorgánicas, como el hierro. Los compuestos de níquel suelen poseer una alta solubilidad en agua, lo cual favorece su movilidad. Aun así, hay compuestos no solubles que, tras formarse, se depositan en los sedimentos. Las altas concentraciones de níquel que se encuentran en el medio son originadas principalmente por la minería y la industria química, además de los vertidos y lixiviados ácidos que estas puedan producir (ATSDR, 2005). El drenaje ácido de minas (DMA) aporta elevadas concentraciones al agua, incrementada en los sedimentos cuando se suman el DMA y el agua marina, como

en el caso de Huelva, donde confluyen el Río Tinto con el Río Odiel (Torre *et al.*, 2019). En las zonas más cercanas a estas industrias, las concentraciones de níquel pueden ser de hasta 9 mg/L (ATSDR, 2005). Es importante indicar que el valor máximo autorizado por la Directiva 98/83/EC sobre la calidad del agua destinada a consumo humano es de 0.02 mg/L; siendo estos los mismos niveles de NCA-MA (normas de calidad ambiental-media anual máxima) para el níquel y sus compuestos en aguas superficiales continentales y otras aguas continentales (DIRECTIVA 2008/105/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas).

Los efectos tóxicos de este metal se han investigado en muchos organismos, principalmente en mamíferos; sin embargo, se ha prestado menos atención a los peces, que en los ecosistemas contaminados pueden acumular el níquel del agua, de materiales en suspensión y de los alimentos (Kubrak *et al.*, 2013). Aunque el mecanismo preciso de toxicidad causado por el níquel no está claro, existe evidencia de que puede causar estrés oxidativo y genotoxicidad (Kubrak *et al.*, 2012b; Palermo *et al.*, 2015). En vista de la creciente demanda mundial de níquel y el correspondiente potencial de mayores aportes antropogénicos al medio acuático, es importante desarrollar una comprensión más profunda de su efecto en los peces (Palermo *et al.*, 2015). Así pues, en este estudio evaluamos en peces biomarcadores tempranos de la posible inducción de estrés oxidativo y la respuesta antioxidante, así como de la ocurrencia de genotoxicidad, que puedan ser de utilidad en la biomonitorización de la contaminación por níquel del medio acuático.

Es habitual que en los ecosistemas acuáticos se utilicen los peces como bioindicadores para conocer la toxicidad de los diferentes metales pesados presentes. Sin embargo, estos elementos se localizan en mezclas químicas complejas y variables que dificultan poder establecer para cada metal una respuesta específica. Al realizar los ensayos de toxicidad en el laboratorio, bajo condiciones controladas, se consigue aislar el efecto de un solo contaminante y relacionarlo directamente con las concentraciones definidas a las que se han expuesto los peces.

Para este estudio se evaluó el efecto que produce el níquel en la inducción del daño genotóxico mediante el ensayo de micronúcleos en eritrocitos. También se cuantificó el daño oxidativo en diferentes órganos de peces. Éstos se seleccionaron por su funcionalidad, su fisiología y su relación con el medio acuático, siendo las branquias, los más expuestos a los contaminantes; el hígado, por su relación con la detoxificación de productos metabólicos y xenobióticos; el músculo, por ser parte de la alimentación humana; y el cerebro, por las posibles alteraciones en el comportamiento y los efectos neurotóxicos que puedan producirse (Vieira *et al.*, 2012). Se utilizaron individuos adultos de la especie *Carassius auratus* (L.), comúnmente conocido como pez dorado, para realizar los bioensayos. Estos ejemplares se instalaron en el laboratorio, en tanques expuestos a distintas concentraciones de níquel (0.1 mg/L, 1 mg/L y 10 mg/L), y teniendo un tanque control como referencia. Para realizar un estudio lo más similar a las condiciones del medio y que no sufrieran estrés los peces, se utilizó un modelo estático (Rodríguez-Cea *et al.*, 2003). Se eligió el pez dorado por ser una especie modelo de uso frecuente en estudios relacionados con toxicidad, su fisiología y su comportamiento

gracias a su fácil cultivo, su adquisición y distribución, y su capacidad de resistencia al estrés (Garofalo *et al.*, 2012; Kubrak *et al.*, 2012a).

La acumulación de este metal en los tejidos de los peces suele ser bastante específica del tejido y cada uno tiene afinidades específicas para la acumulación de diferentes elementos (Ptashynski y Klaverkamp, 2002; Palermo *et al.*, 2015). Además, la magnitud y los patrones generales de distribución pueden variar según la fuente de exposición (es decir, a través del agua, los sedimentos o los alimentos), la concentración de las especies de metales disponibles en el medio ambiente, el tiempo de exposición y la capacidad de absorción de cada organismo. Si bien en nuestro estudio no hemos podido cuantificar los niveles de acumulación de Ni en los órganos evaluados, los datos de la literatura en peces de la misma especie y otras expuestos a concentraciones semejantes y en el mismo período experimental indican que la mayor acumulación se encontraba en el hígado, seguido de las branquias y músculo (Palermo *et al.*, 2015). Como se indica más adelante, esto es concordante con los niveles de alteración de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo evaluados en nuestro estudio.

Está aceptado que los compuestos de níquel producen efectos genotóxicos y cancerígenos (Denkhaus y Salnikow, 2002; Kasprzak *et al.*, 2003). No obstante, los estudios sobre el efecto genotóxico del níquel en los peces son todavía muy escasos (Kubrak *et al.*, 2012b; Palermo *et al.*, 2015). En un estudio se expusieron juveniles del pez de agua dulce *Prochilodus lineatus* a concentraciones de Ni 0.025, 0.25 y 2.5 mg/L por 96 h y se evaluó la aparición de daño en el ADN mediante el ensayo cometa (Palermo *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que el daño al ADN aumentó tanto en las células sanguíneas como en las branquias de los peces expuestos a todas las concentraciones del metal, confirmando el potencial genotóxico del níquel en los peces. En nuestro trabajo se ha abordado la evaluación del daño genotóxico temprano mediante el ensayo de micronúcleos, que es uno de los procedimientos más aplicados que se puede encontrar en la literatura para evaluar la genotoxicidad inducida por los xenobióticos, W. Schimid lo describió por primera vez en 1975, llegando a utilizarse actualmente como un método sencillo y práctico, además de accesible a nivel tecnológico y mundial para evaluar los daños producidos a nivel cromosómico (Zalacain *et al.*, 2005). En particular, se considera uno de los mejores métodos para evaluar la genotoxicidad en peces (Cavas *et al.*, 2005). Los micronúcleos (MN) son masas de cromatina citoplasmática que se originan de cromosomas enteros o fragmentos acéntricos al quedar excluidos de los núcleos durante la anafase mitótica. En el caso de los peces, esta prueba se puede realizar en cualquier tejido en proliferación, como células branquiales, sanguíneas o hepáticas entre otras (Cavas *et al.*, 2005, Zalacain *et al.*, 2005).

En nuestro estudio hemos observado un incremento significativo en la aparición de micronúcleos en los eritrocitos de los animales expuestos a todas las concentraciones de níquel evaluadas, 0.1 mg/L, 1 mg/L y 10 mg/L. Otros estudios han estudiado la exposición a diferentes metales y concentraciones obteniendo diversos resultados. Para las especies *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio*, y *Coydoras paleatus*, Cavas *et al.*, (2005) evaluaron la inducción de micronúcleos en sangre exponiéndolos a concentraciones de 0.01 mg/L y 0.21 mg/L de cobre. Para la primera especie no hubo ningún efecto significativo, para la segunda, se produjo una inducción de micronúcleos, y para la tercera especie se produjo una mortalidad total.

Canalejo *et al.*, (2016) expusieron a la especie *Dicentrarchus labrax* a concentraciones 0.01, 0.1, 1, y 10 mg/L de plomo, arsénico y cobre y describieron un aumento de la frecuencia de MN a medida que se aumentaba la concentración. Todos estos resultados indican evidencias de una relación directa entre la exposición de los diferentes metales y el aumento en la frecuencia de micronúcleos presentes en los eritrocitos de las diferentes especies.

Así mismo, se sabe que el níquel puede inducir estrés oxidativo; sin embargo, el mecanismo preciso y las vías que se activan en los peces aún no están claros. Existen evidencias de que puede desencadenar la generación de EROs, e inhibir la actividad de las enzimas antioxidantes en diversos tejidos de peces (Kubrak *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). De esta forma, el estrés oxidativo causado por este metal sería la consecuencia de la formación de EROs a través de reacciones de Fenton/Haber-Weiss, que involucran al par redox  $Ni^{2+}/Ni^{3+}$  (Torreilles y Guerin, 1990), o de una reducción en la capacidad antioxidante, tanto en la de mecanismos no enzimáticos como el agotamiento del GSH debido a la formación de complejos Ni-GSH, como de la supresión de la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD, etc. (Gui-hong *et al.*, 2014; Kubrak *et al.*, 2012b; Kubrak *et al.*, 2012a).

La peroxidación lipídica (LPO) es una de las consecuencias generada por las EROs y por ende un marcador del estrés oxidativo ampliamente aceptado que se ha cuantificado con diferentes métodos como mediante los niveles de TBARS y de hidroperóxidos (ROOH) (por el que hemos optado en nuestro estudio). La capacidad del níquel para inducir LPO se ha descrito en varias especies de peces, incluido *Carassius auratus*. (Zheng *et al.*, 2014; Topal *et al.*, 2017; Kubrak *et al.*, 2012, Kubrak *et al.*, 2013, Gui-hong *et al.*, 2014).

Nuestros resultados muestran un incremento de los niveles de ROOH en todos los tejidos evaluados, evidenciando la situación de estrés oxidativo en los peces. Se observó que las branquias e hígados los niveles de hidroperóxidos eran mucho más elevados que en músculo y cerebro, ordenándose de mayor a menor: hígados > branquias > cerebro > músculo. En los sujetos expuestos a mayores concentraciones (Ni 1 mg/L y Ni 10 mg/L) el daño es más acusado que en los expuestos a menor concentración (Ni 0.1 mg/L). El hígado resultó ser el órgano que mostró niveles más altos de estimulación de la peroxidación lipídica. En cambio, el músculo resultó el más sensible, pues el incremento tuvo lugar desde la concentración de níquel más baja evaluada (0.1 mg/L). Vieira *et al.*, (2012) muestra resultados similares a los presentes, donde la especie *Carassius auratus* (L.) es expuesta a manganeso, produciéndose un aumento de los niveles de hidroperóxidos en branquias, riñón, hígado y cerebro. En la trucha arcoíris, expuesta a concentraciones de Ni 1 mg/L y 2 mg/L, los niveles de peroxidación lipídica en el hígado fueron significativamente más altos que los de los controles (Topal *et al.*, 2017). Por su parte, en *C. auratus*, los niveles de TBARS en el hígado aumentaron en un 29, 60, 71 y 91 % después de la exposición de los peces a 10, 25, 50 y 100 mg/L de Ni, respectivamente (Zheng *et al.*, 2014). Otros estudios muestran una inducción de los niveles de TBAR por níquel en los hígados de ejemplares de *Carassius auratus* (Gui-hong *et al.*, 2014). Por lo tanto, estos resultados confirman que la exposición externa a níquel puede provocar la peroxidación lipídica; lo que indica la inducción del estrés oxidativo.

Las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular. Entre las principales enzimas capaces de reducir los niveles de las EROs y, por tanto, de brindar protección frente al daño oxidativo, se encuentran la catalasa y la superóxido dismutasa (Kubrak *et al.*, 2012, Kubrak *et al.*, 2013).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que actúa en la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo. Este mecanismo de defensa antioxidante cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno para su posterior detoxificación por la catalasa (CAT) y peroxidasa dependiente de glutatión (GPx).

Los resultados obtenidos de nuestro estudio muestran un aumento de la actividad de la enzima SOD en todos los órganos de los peces expuestos a las concentraciones de Ni más elevadas. Los órganos se pueden ordenar de mayor a menor actividad como: hígado > cerebro > branquia > músculo. No obstante, cabe destacar la mayor sensibilidad del músculo, en el que la concentración de Ni 0.1 mg/L fue suficiente para inducir un aumento de esta actividad. Además, e en la actividad incremento SOD se corresponde con los resultados obtenidos para los niveles de hidroperóxidos. Esto coincide con estudios previos en trucha arcoíris expuesta a 2 mg/L de níquel en los que se observó un aumento simultáneo en los niveles de LPO y la actividad SOD en los tejidos branquiales (Topal *et al.*, 2017) y en el cerebro (Topal *et al.*, 2015). En todo caso, diversos estudios han demostrado que la enzima superóxido dismutasa muestra diferentes comportamientos bajo el estrés oxidativo. Frente a un estrés moderado, la enzima es estimulada, aunque a medida que persiste ese estrés, puede estabilizarse o disminuir su actividad debido a que alcanza sus niveles de saturación (Annabi Berrahal *et al.*, 2007; Ates *et al.*, 2008). Por otro lado, en el estudio realizado por Kubrak *et al.*, (2012b) al tratar a los peces con níquel se muestra una supresión de la SOD de hasta el 50% en el riñón. En este mismo sentido, la actividad SOD hepática disminuyó un 39, 33, 46 y 55 % después de la exposición de los peces a niveles mucho más elevados de Ni, 10, 25, 50 y 100 mg/L, respectivamente (Zheng *et al.*, 2014), que los establecidos en nuestro estudio.

Otra de las enzimas más importantes en la defensa antioxidante es la catalasa (CAT). La actividad que ejerce puede encontrarse en casi todas las partes de las células, viéndose incrementada en las mitocondrias y los peroxisomas (Halliwell, 1995). Esta enzima es primordial para la detoxificación de las EROs ya que es la encargada de catalizar la reacción de descomposición del peróxido de hidrogeno, produciendo agua y oxígeno.

En el presente estudio se observó un aumento de la actividad catalasa frente al control en todas las dosis experimentales, y en todos los órganos estudiados. La mayor estimulación se observó en las branquias, donde se multiplicó por 4 respecto al control, seguidas del músculo, hígado y cerebro. Como se ha descrito para la actividad SOD, estos resultados se correlacionan con el aumento en los niveles de hidroperóxidos. Más aún, de nuevo el músculo aparece como un órgano muy sensible, al encontrarse un aumento en los animales expuestos a la menor concentración de Ni (0.1mg/L). Aunque este efecto también se puede observar para la CAT en el cerebro. Estos resultados concuerdan con otros estudios. Así en la

trucha arcoíris expuesta a Ni 2 mg/L se ha descrito un incremento de esta actividad en el tejido hepático (Topal *et al.*, 2017). Así mismo, en el estudio realizado por Kubrak *et al.*, (2012b) con los ejemplares de *Carassius auratus* (L.) se observó un aumento de la actividad CAT en el riñón a concentraciones de exposición de 10 y 25 mg/L. De igual forma, en otro estudio, Kubrak *et al.*, (2012) pudo observar para el níquel y la misma especie, que el hígado incrementó su actividad catalasa en los animales expuestos a concentraciones de 10 – 50 mg/L.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la exposición de los peces a concentraciones de níquel relevantes desde el punto de vista ambiental induce daño genotóxico y estrés oxidativo de forma generalizada (en todos los órganos evaluados) y temprana. Así, el aumento en la producción de EROs resulta en el daño oxidativo puesto de manifiesto por el incremento en la peroxidación lipídica. El exceso de este metal podría haber interactuado con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dando como resultado un aumento en la concentración de EROs como el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, siendo este radical el principal causante de la peroxidación lipídica. Adicionalmente, el aumento simultáneo de las actividades SOD y CAT en los tejidos puede explicarse como una respuesta adaptativa al aumento de los niveles de anión superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para tratar de reducir estos niveles y, por ende, el daño oxidativo. Así mismo, el aumento en la actividad catalasa podría deberse a la alta producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por la SOD. En todo caso, los resultados indican que, a pesar de producirse este aumento en la respuesta antioxidante, ésta no fue suficiente para prevenir el daño oxidativo en las membranas celulares (peroxidación lipídica) de ningún órgano; así como a nivel sanguíneo, donde se detectó un efecto genotóxico (incremento de los micronúcleos) que podría estar directamente relacionado con un daño oxidativo al ADN que resulte en rotura de la cadena. Aunque en el estudio no se observó letalidad ni otras alteraciones detectables *de visu*, es razonable considerar que estos efectos deletéreos evaluados tras 96 horas de exposición podrían tener consecuencias en la fisiología sistémica, el comportamiento o la capacidad reproductiva normales a más largo plazo; incluso aunque la exposición al metal cesara. En este sentido, el daño genotóxico es especialmente grave pues puede tener consecuencias no sólo para los individuos expuestos, sino para los de las siguientes generaciones.

Además, los cambios detectados en los diferentes órganos en los niveles de hidroperóxidos y de las actividades SOD y CAT, así como en la frecuencia de MN en los eritrocitos, demuestran la eficacia del uso de estos parámetros como marcadores tempranos de estrés oxidativo y genotoxicidad en peces, y, por tanto, su utilidad para la monitorización ambiental de la contaminación por níquel en el medio acuático.

Los resultados obtenidos han probado que la exposición al níquel induce estrés oxidativo y daño genotóxico en peces. Las concentraciones probadas son de gran relevancia ecológica y subrayan la importancia de establecer programas de evaluación y monitoreo en áreas que puedan ser potencialmente impactadas por níquel, utilizando peces como modelo biológico de estudio. En todo caso, es necesario evitar una contaminación del medio acuático, supervisar los desechos y vertidos que se realizan, y en mayor medida, los provenientes de la industria y la minería, y mantener el equilibrio y la estabilidad de este ecosistema y sus habitantes.

## CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Tras la exposición de ejemplares de la especie *Carassius auratus* (L.) a diferentes concentraciones de níquel (0.1; 1 y 10 mg/L) bajo condiciones controladas en laboratorio, se demostró:

1. La inducción del daño genotóxico en eritrocitos de sangre periférica, evidenciando mediante el ensayo de micronúcleos.
2. La inducción de una respuesta antioxidante en todos los órganos evaluados (branquias, hígado, cerebro y músculo), evidenciada por el incremento en las actividades catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).
3. La activación de las defensas antioxidantes no fue suficiente para prevenir el daño oxidativo, puesto de manifiesto por un incremento en la peroxidación lipídica (evaluada mediante los niveles de hidroperóxidos) en todos los órganos de estudio.
4. Los ejemplares en estadio adulto de la especie *Carassius auratus* (L.) constituyen un biomarcador temprano apto para la monitorización de la toxicidad inducida por el Ni en el medio acuático.

## CAPÍTULO 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H.E. (1983). Catalase. En: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol.3., *Verlag Chemie, Weinheim, Germany*: 273–286.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (2012). *Resumen de Salud Pública. Níquel*. Servicio de Salud Pública. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs15.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs15.html)
- Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno-Mateos, D., Alvarez-Barrientos, A., & Jiménez-Ruiz, A. (2007). Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Molecular and biochemical parasitology*, 152(2), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.006>
- Ameur, W. B., El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Driss, M. R., & Borràs, M. (2015). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, 135,67–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050>
- Annabi Berrahal, A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., & El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes rendus biologies*, 330(8), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.05.007>
- Arellano, J. M., Storch, V., & Sarasquete, C. (1999). Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 44(1), 62–72. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1801>
- Ates, B., Orun, I., Talas, Z. S., Durmaz, G., & Yilmaz, I. (2008). Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. *Fish physiology and biochemistry*, 34(1), 53–59. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9146-5>
- Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2007). Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.11.002>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Canalejo, A., Diaz-de-Alba, M., Granado-Castro, M. D., Cordoba, F., Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M. D., & Torronteras, R. (2016). Early genotoxic response

and accumulation induced by waterborne copper, lead, and arsenic in European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Environmental science and pollution research international*, 23(4), 3256–3266. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5435-1>

Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Genchi, G. (2016). Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 238, 45–67. [https://doi.org/10.1007/398\\_2015\\_5003](https://doi.org/10.1007/398_2015_5003)

Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(4), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>

Directiva 98/83/EC sobre la calidad del agua destinada a consumo humano.

Directiva 2008/105/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.

Domitrovic, H. (1997). El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: Evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870). *VI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral*.

Eisler, R., (1998). Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Patuxent Wildlife Research Center*, 95.

Eisler, R.; ZAROGIAN, G.; KENNEKEY, R. (1972). Cadmium uptake by organism. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 29, 1367-1369.

Ferrer A. (2003). Intoxicación por metales [Metal poisoning]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 26 Suppl 1, 141–153.

Gaete, H., Álvarez, M., Lobos, G., Soto, E., & Jara-Gutiérrez, C. (2017). Assessment of oxidative stress and bioaccumulation of the metals Cu, Fe, Zn, Pb, Cd in the polychaete *Perinereis gualpensis* from estuaries of central Chile. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.073>

Galán E.; Romero A. (2008). Contaminación de suelos por metales pesados. *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, Macla, nº 10

Garofalo, F., Imbrogno, S., Tota, B., & Amelio, D. (2012). Morpho-functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) heart. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 163(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.206>

- Gay, C., & Gebicki, J. M. (2000). A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical biochemistry*, 284(2), 217–220. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>
- Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49(10), 1341–1348. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00088-h](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00088-h)
- Ibarluzea, J., Aurrekoetxea, J. J., Porta, M., Sunyer, J., & Ballester, F. (2016). La biomonitorización de sustancias tóxicas en muestras biológicas de población general [The biomonitoring of toxic substances in biological samples of general population]. *Gaceta sanitaria*, 30 Suppl 1, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2016.02.012>
- Javed, M., Ahmad, M. I., Usmani, N., & Ahmad, M. (2017). Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. *Scientific reports*, 7(1), 1675. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01749-6>
- Jiménez H., Ortega Cerrilla M., Cobos Perahta, M., G, J., Herrera Haro, A. Díaz-Cruz, & G. Perrusquía, Raquel. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*, 30(12), 728-734. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005001200002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001200002&lng=es&tlng=es).
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental health perspectives*, 106(7), 375–384. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106375>
- Kubrak, O. I., Husak, V. V., Rovenko, B. M., Poigner, H., Kriews, M., Abele, D., & Lushchak, V. I. (2013). Antioxidant system efficiently protects goldfish gills from Ni(2+)-induced oxidative stress. *Chemosphere*, 90(3), 971–976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.044>
- Kubrak, O. I., Husak, V. V., Rovenko, B. M., Poigner, H., Mazepa, M. A., Kriews, M., Abele, D., & Lushchak, V. I. (2012b). Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 118-119, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.016>
- Kubrak, O. I., Rovenko, B. M., Husak, V. V., Storey, J. M., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2012a). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish *Carassius auratus* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.006>
- Łuczyńska, J., Paszczyk, B., & Łuczyński, M. J. (2018). Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk

- assessment for consumer's health. *Ecotoxicology and environmental safety*, 153, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.057>
- Martínez González S.; Cedano Díaz A.; Escalera Valente F.; Salgado Moreno S.; Carrillo Díaz F.; Macías Coronel H.; Peña Parra B. (2012) La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos. *Abanico Veterinario*, 4.
- Martínez, S. (2005). “El cerdo joven como bioindicador de concentraciones bajas de genotóxicas, mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica”. Trabajo de grado Doctor en Ciencias básicas. *Colima, México: Universidad de Colima. Facultad de Medicina: 21.*
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- Montes-Botella, C., & Tenorio, M. D. (2003). Water characterization and seasonal heavy metal distribution in the Odiel River (Huelva, Spain) by means of principal component analysis. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 45(4), 436–444. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0139-9>
- Ochoa, D.M., González, J.F. (2008) “Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales”. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 55: 115-126.
- Olías, M.; Cánovas, C. R.; Macías, F.; Basallote M.D.; Nieto, J.M. (2020) The Evolution of Pollutant Concentrations in a River Severely Affected by Acid Mine Drainage: Río Tinto (SW Spain). *Minerals*, 10: 598.
- Palermo, F. F., Risso, W. E., Simonato, J. D., & Martinez, C. B. (2015). Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 116, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.032>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Poonkothai M., B.S. Vijayavathi. (2012) Nickel as an essential element and a toxicant *International Journal of Environmental Sciences*, 1, 285-288.
- Poonkothai, M. & Vijayavathi, B.S. (2012). Nickel as an essential element and a toxicant.. *International Journal of Environmental Sciences*. 1, 285-288.
- Powers D. A. (1989). Fish as model systems. *Science (New York, N. Y.)*, 246(4928), 352–358. <https://doi.org/10.1126/science.2678474>
- Ptashynski, M. D., & Klaverkamp, J. F. (2002). Accumulation and distribution of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic toxicology*

(Amsterdam, Netherlands), 58(3-4), 249–264. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(01\)00231-4](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(01)00231-4)

Pyle, G. P. Couture. (2012) Nickel. En: A.P. Farrell, C.M. Wood, C.J. Brauner (Eds.), Fish Physiology 31A: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Elsevier, 253-289.

Rahimikia, E. (2017) Analysis of antioxidants and serum biochemical responses in goldfish under nickel exposure by sub-chronic test. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1): 320-325.

Rodríguez Perón, José Miguel, Menéndez López, José Rogelio, & Trujillo López, Yoel. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1):15-20.

Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2003). Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(3), 442–448. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(03)00073-3)

Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J. M., & Aït-Aïssa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology*, 19(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003>

Schmid W. (1975). The micronucleus test. *Mutation research*, 31(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8)

Shafaqat, A.; Mujahid, F.; Saima, B.; Rehan, A. (2014). Effect of different heavy metal pollution on fish. *Res. J. Chem. Envi. Sci.* 2, 74-79.

Topal, A., Atamanalp, M., Oruç, E., & Erol, H. S. (2017). Physiological and biochemical effects of nickel on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: Assessment of nuclear factor kappa B activation, oxidative stress and histopathological changes. *Chemosphere*, 166, 445–452. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.106>

Torre B.M.; Borrero-Santiago A.R.; Fabbri E.; Guerra R. (2019) Trace metal levels and toxicity in the Huelva Estuary (Spain): A case study with comparisons to historical levels from the past decades. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 1, 12–18.

Torreilles, J., & Guérin, M. C. (1990). Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS letters*, 272(1-2), 58–60. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80448-r](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80448-r)

Torres Bugarín O.; Ramos Ibarra M.L. (2013) Utility Micronucleus Test and Nuclear Abnormalities in Exfoliated Cells of Oral Mucosa in the Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Damage. *Int. J. Morphol.*, 31(2), 650-657.

- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
- Velma, V., & Tchounwou, P. B. (2010). Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, *carassius auratus*. *Mutation research*, 698(1-2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.03.014>
- Vieira, M. C., Torronteras, R., Córdoba, F., & Canalejo, A. (2012). Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 78, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.015>
- Vranová E., Inzé D., Van Breuseguem F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Y.K. Chau, O.T.R. Kulikovsky-Cordeiro. (1995). Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ. Rev.*, 3, 95-120
- Zalacain, M., Sierrasesúmaga, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos [The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272005000300007>
- Zhaohui Sun, Gong, C., Ren, J., Zhang, X., Wang, G., Liu, Y., Ren, Y., Zhao, Y., Yu, Q., Wang, Y., & Hou, J. (2020). Toxicity of nickel and cobalt in Japanese flounder. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 263(Pt B), 114516. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114516>
- Zheng G. H., Liu, C. M., Sun, J. M., Feng, Z. J., & Cheng, C. (2014). Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 147, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.015>