



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ELEMENTOS TRAZA E INDICADORES DE
ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TIBURÓN AZUL
(*Prionace glauca*) DE LA COSTA OCCIDENTAL DE
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

ANGÉLICA MARÍA BARRERA GARCÍA

La Paz, Baja California Sur, Mayo de 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 16 horas del día 6 del mes de MAYO del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ELEMENTOS TRAZA E INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TIBURÓN AZUL (*Prionace glauca*) DE LA COSTA OCCIDENTAL DE BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO"

Presentada por el alumno:

Angélica María Barrera García

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOLOGÍA MARINA

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

LA COMISION REVISORA



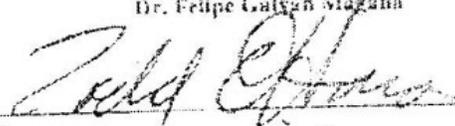
Dra. Tania Zenteno Savin



Dr. Felipe Galvan Magaña



Dra. Lis Celina Méndez Rodríguez



Dr. Todd O'Hara



Dr. Juan Antonio de Anda Montañez



DRA. ELISA SELVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín

Co- Directora de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Dr. Felipe Galván Magaña

Co- Director de Tesis

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR)

Dr. Todd O'Hara

Asesor

Institute of Arctic Biology and Department of Biology and Wildlife, University of Alaska
Fairbanks (UAF)

Dra. Lia Celina Méndez Rodríguez

Asesor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez

Asesor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Comité Revisor de Tesis y Miembros del Jurado del Examen de Grado

Dra. Tania Zenteno Savín (CIBNOR)

Dr. Felipe Galván Magaña (CICIMAR)

Dr. Todd O'Hara (UAF)

Dra. Lia Celina Méndez Rodríguez (CIBNOR)

Dr. Juan Antonio de Anda Montañez (CIBNOR)

Suplente

Dr. Eduardo Balart (CIBNOR)

RESUMEN

Los indicadores de estrés oxidativo y elementos traza fueron evaluados en músculo, hígado y riñón de tiburón azul de la costa occidental de Baja California Sur, para determinar diferencias por sexos y estadios de madurez, así como identificar la relación de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo mediante análisis de correlaciones y análisis de componentes principales. Diferencias significativas ($p < 0.05$) por sexo y estadios de madurez fueron encontradas en los tejidos del tiburón azul: en el músculo se presentaron diferencias en la concentración de mercurio (Hg) (maduros > inmaduros y machos > hembras), y en la concentración de carbonilos proteicos (machos>hembras); en el hígado, en la concentración de zinc (Zn) (hembras > machos) y la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) (inmaduros > maduros); en el riñón, en la actividad de catalasa (CAT) (inmaduros > maduros). Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tejidos (hígado y riñón) en la concentración de elementos traza (Hg, arsénico (As), Zn, cadmio (Cd), plomo (Pb)) y los indicadores de estrés oxidativo (actividad de CAT, superóxido dismutasa (SOD), concentración de TBARS). Se observaron correlaciones entre la concentración de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo en los diferentes tejidos del tiburón azul: en músculo, entre la producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y las concentraciones de Hg y As, así como entre la actividad de las enzimas glutatión reductasa (GR), SOD, glutatión S-transferasa (GST) y la concentración de TBARS; en el hígado entre la actividad de SOD y los niveles de carbonilos proteicos y la producción de $O_2^{\cdot-}$; entre la actividad de GST y la concentración de As, entre la concentración de Zn y la de Cd; en el riñón, entre la actividad de SOD y la concentración de TBARS y entre los niveles de carbonilos proteicos y la concentración de As y cobre (Cu). Es posible que las diferencias entre sexos y estadios de madurez reflejen preferencias alimenticias, las hembras consumen mayor cantidad de invertebrados como la langostilla, mientras que los machos adultos consumen más calamares y peces como la macarela. Esto sucede debido a los patrones de migraciones y la segregación espacial que presenta el tiburón azul en el Pacífico oriental. Futuros estudios deberían enfocarse en determinar las concentraciones de metil mercurio (MeHg) en tiburones y sus consumidores. Los elementos traza pueden inducir procesos prooxidantes, y es importante tenerlos en cuenta en estudios sobre aspectos de la salud y biología del tiburón azul.

Palabras claves: Antioxidantes, elementos traza, estrés oxidativo, tiburón azul.

ABSTRACT

Oxidative stress indicators and trace element concentration were quantified in muscle, liver and kidney of blue shark from the west coast of Baja California Sur, to determine differences between sex and maturity cohorts, as well as to identify the relationship of the trace elements and oxidative stress indicators via correlations and principal component analyses. Significant differences ($p < 0.05$) by sex and maturity cohorts were found in blue shark tissues: in muscle, differences in mercury (Hg) concentration (mature > immature; males > females), and in protein carbonyl concentrations (male > female) were found; in liver, differences in zinc (Zn) concentration (females > males) and glutathione peroxidase (GPx) activity (immature > mature) were found, and renal differences in the activity of catalase (CAT) (immature > mature) were found. Significant differences ($p < 0.05$) were found between tissues (liver and kidney) in the concentration of trace elements (Hg, arsenic (As), Zn, cadmium (Cd), Pb) and oxidative stress indicators (CAT activity, superoxide dismutase (SOD) activity, lipid peroxidation, TBARS levels). Correlations were found between trace elements and oxidative stress indicators as follows: in muscle, between the production of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) with the concentration of Hg and As; between the activities of glutathione reductase (GR), SOD, glutathione S-transferase (GST) and TBARS concentration; in liver, SOD activity with protein carbonyl levels; GST activity with As concentration; SOD activity with $O_2^{\cdot-}$ production and Zn concentration with Cd concentration; in kidney, SOD activity with TBARS concentration, and protein carbonyl levels with As and copper (Cu) concentrations. It is possible that sex and maturity cohort differences reflect feeding preferences, with females consuming more invertebrates such as red crabs and adult males consuming more fish such as mackerel and invertebrates such as giant squid. This feeding preference may result from migration and spatial segregation of blue sharks in the Eastern Pacific Ocean. Further studies should be conducted to include methylmercury (MeHg) to determine risk for shark and their consumers. Trace element concentrations may be important drivers of pro-oxidant processes and the potential consequences are important for physiological and health aspects of blue shark biology.

Key words: Blue shark, maturity status, oxidative stress, sex differences, trace elements

DEDICATORIA

A Carlos por estar a mi lado, siempre apoyarme, ser la compañía incondicional y caminar juntos de la mano en este camino, la vida nos ha llevado a muchas aventuras, que espero sigan llenando nuestras vidas, rodeados, de amor, comprensión, comunicación y felicidad. Porque gracias a ti y a nuestro amor estamos creando el mejor milagro, el de la vida.

A mi hija, aun no estás en mis brazos y ya eres el motor que me impulsa a ser mejor, eres mi compañía y la alegría que llena mi espíritu e inunda mi corazón.

A mis padres, porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado, me han ayudado, me han apoyado y han permitido que mi camino sea más fácil, llevadero y que esté lleno de virtudes, valores, mucho amor y felicidad.

A mi hermano, por estar conmigo a su manera, escucharme y seguir siendo el alcahueta de mis aventuras y travesuras.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR por ser la institución que me apoyó durante mis estudios de doctorado y a sus departamentos y miembros del Control Escolar por todos los trámites de cada semestre, Becas y Apoyo Estudiantil por el apoyo económico en las estancias, el Laboratorio de Cómputo por todas las asesorías tecnológicas e impresiones, a la Biblioteca por los artículos solicitados.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías (CONACyT) por brindarme la beca de estudios (206958) que me fue otorgada durante mis estudios de doctorado en el CIBNOR y la Beca Mixta para mis estancias en el extranjero.

A los miembros de mi comité tutorial conformado por mis codirectores, Dra. Tania Zenteno-Savín y Dr. Felipe Galván Magaña y mis asesores Dra. Lía Méndez Rodríguez, Dr. Juan Antonio de Anda Montañez y Dr. Todd O'Hara. Todos han contribuido significativamente en mi aprendizaje, en la culminación de los artículos, los seminarios y mi tesis.

Al Dr. Todd O'Hara (University of Alaska, Fairbanks), Dr. Seth Newsome y la Dra. Sora Kim (University of Wyoming) por recibirme para poder realizar mis estancias, las cuales fueron bastante enriquecedoras tanto a nivel personal como académico.

A Maggie Castellini y Lucero Correa por brindarme sus conocimientos, tener paciencia al enseñarme las metodologías, corregir mis ocurrencias y sobre todo por su amistad. Permanecerán siempre en mi corazón.

A Tania por no solamente cumplir sus funciones como directora, por enseñarme, corregirme y hacer de mí una mejor profesional, sino que además por su perseverancia ante mi terquedad y permitirme entender que existen mejores formas de expresarse y ser mejores personas, y que los gatos son animalitos tiernos y buenas mascotas. Por demostrarme que como profesional es increíble y es un modelo a seguir. Después de tantos regaños y dolores de cabeza, hoy entiendo que todo valió la pena.

A Felipe, porque siempre me has apoyado y nunca has dudado de mis capacidades, por ser más que un director, por ser como un papá para mí y para muchos de tus alumnos. Por brindarme a mí y a mi familia un lugar especial en tu casa, con Cristi, Laura, Omar y tu suegrita adorada, y saber que a pesar de la distancia y la soledad, siempre estuvieron ustedes brindándonos una familia para nosotros. Por último no puedo olvidar TODAS las reuniones con esa comida exquisita, el karaoke, las bailadas y la gran compañía.

A Lía, porque no solo me enseñaste cosas increíbles de ecotoxicología, sino porque además, siempre has visto las cosas buenas en mí, porque eres como una mamá con buenos

y sabios consejos para la vida, por escucharme y permitirme ser tu alumna. Inmensamente agradecida.

A Todd, O'Hara because you trusted me without knowing me, you gave me the great opportunity to make real one of my dreams of studying a doctorate. Because you opened to me, your heart, your home, your family, your lab and your knowledge, without hesitation. Your knowledge makes me a better professional and thanks for letting us share your home, your family, your life. Carla, Lars and Anne, I will never forget the wonderful time that I spend with you, the freezing camping and fishing time... there are a lot of things... thanks' for all.

A Juan Antonio de Anda por brindarme la oportunidad de aprender a tu lado cosas de estadísticas, y de ahí en adelante el tener la paciencia de corregirme y hacer que mejorara mi tesis, incluso cuando no era tu responsabilidad. Por las tardes de tenis, por tus enseñanzas en la vida personal, los consejos, las escuchadas, por ser como una padre con el que podía contar. Gracias!

A la Dra. Elisa Serviere, por su ayuda y apoyo en los momentos críticos de mi vida, por sus permisos y por uno de los mejores consejos que alguien pudo haberme dado, con el que decidí definir este momento de mi vida, sus palabras como profesional y madre me sirvieron mucho.

Al laboratorio de Biomedicina y Salud Ambiental, especialmente a Orlando Lugo y Norma Olgún por sus enseñanzas en las técnicas de EO, por su paciencia, por dejarnos oír música chévere, por la ayuda incondicional que me prestaron en mi época de laboratorio, mil gracias!

Al laboratorio de Absorción Atómica, especialmente a Gris y a Baudilio, por el arduo trabajo, las charlas, la colaboración, los consejos y sus enseñanzas, siempre los llevaré en mi corazón con un bonito recuerdo de presencia en mi vida.

Al grupo Proyecto Tiburones y Rayas del CICIMAR y todos sus miembros, por las enseñanzas, las bases de datos, los muestreos, las parrandas donde el Doc., la compañía en el laboratorio, sus asesorías y muchas cosas más.

Al grupo de Estrés Oxidativo por cada una de las reuniones del laboratorio donde se aprendieron cosas nuevas, porque sus consejos permitieron que las presentaciones y la tesis tuvieran un mejor sentido y pudieran mejorar. Se aprendió mucho con Uds., sin olvidar toda la comida que siempre brindaron platos mexicanos exquisitos que probé con Uds.

To Idea Wild for donation of a laptop, used for finished my thesis and published articles.

A Horacio, Claudia, Susana y Lupita por sus buenas charlas, ayuda, compañía. Son personas maravillosas y ojala la vida no los cambien y sigan siendo así de especiales.

A mi tío Lalito por su motivación y consejos, has hecho que llegara a este punto y te lo agradeceré eternamente. A Nohorita, Sarita y Santiago, por brindarme un hogar como siempre lo han hecho, y a mi media naranja ;), una segunda casa donde divertirnos, la compañía, los buenos momentos y por estar siempre conmigo, así sea en la distancia. Los amo. A mi tío Ari por su apoyo y con Sandrita por las pizzas y los buenos momentos en la finca.

A mis amigos colombianos Carlos y Pilar, Jose y Ana y los costes, por ser nuestra familia en la distancia y las personas con las que podemos contar en esta lejanía, los almuerzos, las lavadas, las jugadas, las comidas típicas, el compartir los problemas, las ayudas, todo. Que rico que nuestros caminos se unieron así hubiese sido solo por un corto tiempo.

A mis equipos de Fútbol y fútbol rápido, Atlas y Service, por tantos momentos de ocio y deportes, por todos los triunfos y campeonatos ganados, especialmente a Ari, Itzo, Tete y Almita son lo máximo. Pero sobre todo a Cachoras con Ana y Jose, sin ustedes no hubiera sido lo mismo estar ahí.

A panteras y todas sus integrantes, por mostrarme un deporte diferente, TOCHO? Que es eso? Fútbol flag? Aún siguen preguntándome como se come ;). La pase muy rico con ustedes son un grupo de personas muy chéveres con las que convivimos momentos muy divertidos. Pero sobre todo a Bruno, Karla, Anta, Victor, Ana, Jose y los niños, por darme su amistad fuera y dentro, por ser tan increíbles y brindarme su amistad, los años nuevos, el recorrido a la manzana, por todo, muchas gracias!

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron con su compañía, ayuda, y todo lo demás durante estos 3 años y medio de doctorado.

Finalmente, le agradezco a la vida el darme la oportunidad de estar acá, ahora, y de vivir este tiempo en México. Estaré infinitamente agradecida con este país por todas las oportunidades que me dio, por permitirme estudiar mi doctorado, un sueño que siempre tuve, que a pesar de las dudas y problemas, me demostré que puedo terminar lo que me propongo sin importar el que ni el cómo, estaré eternamente agradecida por todo lo que he crecido profesional y personalmente.

CONTENIDO

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	5
2.1	Tiburón azul, <i>Prionace glauca</i>	5
2.2	Indicadores de estrés oxidativo	7
2.3	Elementos traza y su potencial efecto cuantificado mediante los indicadores de estrés oxidativo.....	10
3	Justificación	15
4	Objetivos.....	16
4.1	Objetivo general	16
4.2	Objetivos específicos.....	16
5	Hipótesis	17
6	Materiales y métodos.....	18
6.1	Área de estudio.....	18
6.2	Fase de campo	18
6.3	Fase de laboratorio	20
6.3.1	Elementos traza.....	20
6.3.2	Indicadores de estrés oxidativo.....	22
6.4	Análisis estadísticos	26
6.4.1	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul	26
6.4.2	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón de tiburón azul.....	28
6.4.3	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	29
6.4.4	Elementos traza en calamar y langostilla como presas del tiburón azul.....	29
7	Resultados.....	30
7.1	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul....	30

7.2	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón de tiburón azul	37
7.3	Presas del tiburón azul.....	42
7.3.1	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	42
7.3.2	Elementos traza en calamar y langostilla como presas del tiburón azul.....	45
8	Discusión	47
8.1	Concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en los diferentes tejidos del tiburón azul, <i>Prionace glauca</i>	47
8.1.1	Comparaciones entre tiburones azules a nivel mundial.....	47
8.1.2	Comparaciones del tiburón azul con otras especies de tiburones a nivel mundial	48
8.2	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul....	50
8.3	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón del tiburón azul	53
8.4	Concentración de los elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en presas del tiburón azul.....	57
8.4.1	Elementos traza en calamar y langostilla como presas importantes del tiburón azul	57
8.4.2	Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i>	58
9	Conclusiones.....	62
10	Literatura Citada	64
11	Anexos	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tiburón azul, <i>Prionace glauca</i>	5
Figura 2. Distribución del tiburón azul, <i>Prionace glauca</i> ..	6
Figura 3. Defensas antioxidantes de las enzimas ante la presencia de especies reactivas de oxígeno.....	10
Figura 4. Lugares de colecta de las muestras de tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>) y calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en Baja California Sur.....	19
Figura 5. Intervalo de tallas de los tiburones azules (<i>Prionace glauca</i>) colectados en Punta Belcher, Baja California Sur.....	30
Figura 6. Actividad de las enzimas antioxidantes (U mg ⁻¹ proteína) en músculo de tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>) por grupos. A. GR: Glutación reductasa; B. GPx: Glutación peroxidasa; C. GST: Glutación S-transferasa; D. CAT: Catalasa; E. SOD: Superóxido dismutasa.....	33
Figura 7. A. Tasa de producción del radical superóxido (O ₂ ^{•-} , nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína). B. Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol mg ⁻¹ proteína). C. Niveles de carbonilos proteicos (µmol g ⁻¹ de tejido) (<i>Prionace glauca</i>).....	34
Figura 8. A. Relación lineal, B. relación exponencial de la concentración de Hg (mg kg ⁻¹ ww) con la longitud total (LT, cm) del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>) colectado en Punta Belcher Baja California Sur.....	35
Figura 9. Peso de los factores de los dos componentes principales (CP) que explican la variabilidad del 50% de los datos.	36
Figura 10. Intervalo de tallas de los tiburones azules (<i>Prionace glauca</i> , n=35) colectados en Punta Belcher, Baja California Sur de los cuales se colectaron muestras de hígado y riñón.	37
Figura 11. Actividad de las enzimas antioxidantes (U mg ⁻¹ proteína) en músculo (n:14) e hígado (n:14) de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>). A. GPx: glutación peroxidasa; B. GR: glutación reductasa; C. CAT: catalasa (músculo 11); D. SOD: superóxido dismutasa; E. GST: glutación S-transferasa.....	43
Figura 12. A. Tasa de producción del radical superóxido (O ₂ ^{•-} , nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína). B. Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol mg ⁻¹ proteína). C. Niveles de carbonilos proteicos (µmol g ⁻¹ de tejido) en músculo e hígado de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Límite máximo de la concentración de elementos traza establecido por la NOM 242-SSA1, NOM 027-SSA1, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para consumo de organismos marinos.	14
Tabla II. Concentraciones de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en músculo del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>).	31
Tabla III. Concentración de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en hígado y riñón del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>).	38
Tabla IV. Indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>). Actividad de las enzimas antioxidantes (U mg^{-1} proteína), tasa de producción de radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol mg^{-1} proteína), niveles de carbonilos proteicos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ tejido).	39
Tabla V. Coeficiente de correlación de Spearman calculado con y sin los organismos considerados como <i>outliers</i> entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo en el hígado y riñón del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>).	41
Tabla VI. Diferencias estadísticas entre tejidos de calamar (<i>Dosidicus gigas</i>).	42
Tabla VII. Coeficiente de correlación de Spearman calculado entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo en el músculo (n: 11) e hígado (n: 11) del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).	45
Tabla VIII. Concentraciones de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en músculo e hígado del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>), músculo e hígado del calamar (<i>Dosidicus gigas</i>) y langostilla (<i>Pleuroncodes planipes</i>).	46

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Concentraciones (mg kg^{-1} peso seco, dw) de los elementos traza en tejidos del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>), calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) y langostilla (<i>Pleuroncodes planipes</i>) capturados en Baja California Sur.	78
Anexo 2. Concentraciones (mg kg^{-1} ww) de elementos traza reportados por tejido para diferentes especies de tiburones.	79
Anexo 3. Oxidative stress indicators and trace elements in the blue shark (<i>Prionace glauca</i>) off the east coast of the Mexican Pacific Ocean.	82
Anexo 4. Trace elements and oxidative stress indicators in the liver and kidney of the blue shark (<i>Prionace glauca</i>).....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

CDNB	1-cloro 2,4 dinitrobenceno
DNPH	2,4-dinitrofenil hidrazina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HNO ₃	Ácido nítrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
ASB	Albúmina sérica bovina
As	Arsénico
Cd	Cadmio
C	Carbono
CAT	Catalasa
cm	Centímetro
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
CICIMAR	Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
Cu	Cobre
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FB	Factor de biomagnificación
PMSF	Fenil-metil-sufonil fluoruro
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HI _d	Hembras inmaduras capturadas en diciembre
HM _d	Hembras maduras capturadas en diciembre
kg	Kilogramo
LM	Longitud del manto
LT	Longitud total
MI _d	Machos inmaduro capturados en diciembre
MI _m	Machos inmaduro capturados en mayo
MDA	Malondialdehído
Mn	Manganeso
Hg	Mercurio
THg	Mercurio total
MT	Metalotioneina
MeHg	Metilmercurio o mercurio orgánico
m	Metro
mL	Mililitro
mg	Miligramo

mg mL ⁻¹	Miligramos por mililitro; mg/mL
NIST	National Institute of Standards and Technology – Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
Ni	Níquel
NBT	Nitroazul de tetrazolio
mg kg ⁻¹	Partes por millón: ppm; mg/kg (µg g ⁻¹ , µg/g)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ww	Peso húmedo; base húmeda
dw	Peso seco
Ag	Plata
Pb	Plomo
HO [•]	Radical hidroxilo
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
Se	Selenio
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
UAF	Universidad de Alaska campus Fairbanks
Zn	Zinc

1 INTRODUCCIÓN

Los tiburones al ser especies de larga vida, de lento crecimiento y depredadores tope, juegan un papel importante en el intercambio energético del ambiente marino (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2010). El tiburón azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), es una de las especies pelágicas más abundantes que habita aguas templadas y tropicales (Strasburg, 1958; Nakano y Stevens, 2008; Stevens *et al.*, 2010), que ha adquirido gran interés comercial, al ser una de las especies más capturadas por pesca incidental a lo largo de su intervalo de distribución (Stevens, 2005; Carvalho *et al.*, 2008). En México, es una especie objetivo que representa el 80% de la pesquería artesanal de tiburón en Baja California Sur (Carrera-Fernández *et al.*, 2010; Iemanya, 2010). La mayoría de los organismos capturados son tiburones inmaduros, generando una presión adicional para la especie (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2008).

El tiburón azul realiza migraciones verticales y horizontales asociadas a su reproducción, a la distribución de sus presas y a la temperatura del agua (Stevens, 1976; Stevens *et al.*, 2010). En el Océano Pacífico norte, se presenta una segregación por sexo y estadios de madurez, de tal manera que los juveniles de ambos sexos están distribuidos en un área considerada de crianza, entre 35-45°N; las hembras adultas se distribuyen al norte de esta área, y los machos adultos habitan aguas tropicales y subtropicales al sur del área de crianza (Nakano, 1994; Nakano y Seki, 2003). Esta segregación por talla sugiere que los machos adultos son oceánicos, mientras que las hembras son de hábitos más costeros (Litvinov, 2006). En Baja California Sur esta dispersión es corroborada por la pesca artesanal, la cual está basada en organismos juveniles, con proporciones sexuales entre juveniles de 0.7 hembras: 1 macho y en los adultos de 0.5 hembras: 1 macho (Blanco-Parra *et al.*, 2008; Carrera-Fernández *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado que la pesca de tiburón azul es más explotada durante el periodo de invierno – primavera (Blanco-Parra *et al.*, 2008; Carrera-Fernández *et al.*, 2010).

La segregación espacial y las migraciones del tiburón azul se ven reflejadas en su dieta. Se ha sugerido que, dependiendo del sexo y estadio de madurez, el tiburón azul presenta preferencias por algunas presas y que existe un cambio en la preferencia alimenticia entre invierno y primavera (Compagno, 1984; McCord y Campana, 2003; Hernández-Aguilar, 2008). Las hembras de tiburón azul se alimentan más de langostilla (*Pleuroncodes planipes*), mientras que los machos consumen principalmente cefalópodos y peces (Hernández-Aguilar, 2008).

Una de las principales presas del tiburón azul es el calamar gigante (*Dosidicus gigas*), el cual tiene una importancia ecológica y económica en el área de Baja California Sur (Aguilar-Castro, 2003). Adicionalmente, Salinas-Zavala *et al.* (2010) reportaron un incremento en la abundancia de este calamar del 2004 al 2007, afirmando que esta especie ha habitado la costa occidental de Baja California Sur al menos durante los últimos 30 años. Por otra parte, la langostilla (*P. planipes*), un crustáceo de hábitos pelágico y bentónico, muy abundante a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California (Hernández-Aguilar, 2008; Salinas-Zavala *et al.*, 2010; De Anda-Montañez *et al.*, 2013), es una presa de gran importancia en la dieta del tiburón azul. Las altas abundancias han convertido a la langostilla en un recurso disponible para sus depredadores como atún, jurel (Boyd, 1967), picudos (Abitía-Cárdenas *et al.*, 2002), calamar gigante (Salinas-Zavala *et al.*, 2010) y tiburones como el mako (Velasco-Tarelo, 2005), piloto (Cabrera-Chávez-Costa, 2003), y el tiburón azul (Hernández-Aguilar, 2008).

La alimentación puede contribuir a la concentración de los elementos traza en un depredador, ya que muchos de éstos son incorporados al organismo a través de la dieta (Gupta, 2007). Los elementos traza presentes en tejidos del tiburón azul pueden provenir del consumo de sus presas principales, los calamares y la langostilla (Tricas, 1979; Stevens, 2005; Blanco-Parra *et al.*, 2008; Hernández-Aguilar, 2008). La preferencia por un tipo de alimentación puede reflejarse en una acumulación diferencial de elementos traza entre sexos y estadio de madurez. Adicionalmente, los cefalópodos son considerados como

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

vectores de transferencia de elementos traza como el Cd a sus consumidores (Bustamante *et al.*, 1998).

Los elementos traza son tóxicos, persistentes y difíciles de biodegradar. Los elasmobranchios son susceptibles de acumular en sus tejidos concentraciones importantes de elementos, como el mercurio (Hg) (Storelli *et al.*, 2001; Storelli *et al.*, 2002; Pethybridge *et al.*, 2010), arsénico (As) (Storelli y Marcotrigiano, 2004; Storelli *et al.*, 2005), cobre (Cu) y zinc (Zn) (Lowman *et al.*, 1996). Por lo anterior, los tiburones pueden ser potenciales indicadores de contaminación ambiental (Marcovecchio *et al.*, 1991; Vas, 1991).

El tiburón azul al ser una especie objetivo en las pesquerías de México y en el mundo, es una especie altamente consumida como recurso pesquero (CONAPESCA, 2010; Cartamil *et al.*, 2011), lo cual puede afectar la salud humana. La presencia de Hg en los peces es la principal ruta de exposición para los humanos (Wagemann *et al.*, 1998; Berntssen *et al.*, 2004). El calamar gigante también es una especie importante como recurso pesquero en la región (Salinas-Zavala *et al.*, 2010), mostrando una tendencia a acumular altas concentraciones de Cd en sus tejidos, lo cual puede ser perjudicial para el consumo humano (Bustamante *et al.*, 1998). Por lo anterior, organizaciones nacionales (norma oficial mexicana NOM 242-SSA1) e internacionales (Organización Mundial de la Salud, OMS) han establecido límites permisibles para las concentraciones de elementos traza (e.g. Hg, Cd, As) en organismos marinos procedentes de la pesca artesanal e industrial que son empleados para consumo humano como peces y moluscos.

Los elementos traza pueden tener efectos letales si se encuentran en exceso en los organismos (Furness y Rainbow, 1990; Beyersmann, 1991; Abele, 1996). Estos elementos pueden generar alteraciones físicas y metabólicas que afectan órganos como el riñón, e incluso sistemas como el nervioso, el respiratorio o el reproductivo, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Hodgson, 2004). El efecto de estas ERO se pueden minimizar o evitar por la acción de los antioxidantes. Los antioxidantes son cualquier tipo de molécula que previene la generación de ERO, los remueve, bloquea o

neutraliza, y repara el daño oxidativo producido por éstas (Halliwell y Gutteridge, 2007). La acción de los antioxidantes balancea el efecto de las ERO evitando que se genere estrés oxidativo o daño a los lípidos, proteínas (carbonilos proteicos) y ADN de los diferentes tejidos de un organismo.

Los antioxidantes y los elementos traza interactúan de diferentes formas. Por ejemplo, la metalotioneína (MT) es una proteína con función antioxidante que regula la biodisponibilidad de elementos como cadmio (Cd), Cu, Hg, Zn y plata (Ag) (Hodgson, 2004). El selenio (Se) es un elemento traza que participa en la formación y la utilización del glutatión (GSH), un antioxidante que protege a las células del daño oxidativo (Beyersmann, 1991). El Cu y el Zn actúan como elementos catalíticos y de estabilidad para la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) (Gómez y Cuevas, 2008).

El estudio de los indicadores de estrés oxidativo puede contribuir a determinar el daño que ocasionan los elementos traza en los organismos marinos; sin embargo, este tipo de estudios son escasos en elasmobranquios (Velez, 2009). La escasa integración de conocimientos sobre la concentración de elementos traza, sus potenciales efectos (a través de la cuantificación de indicadores de estrés oxidativo) y los factores (edad, sexo y dieta) que pueden alterar, tanto la concentración de los elementos como sus efectos, resalta la necesidad de realizar este tipo de estudios en el tiburón azul y de realizar un seguimiento que permita crear medidas necesarias para su protección, cuidado y en el caso de ser necesario, evitar los efectos tóxicos en la población humana que consume este recurso en México.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de los diferentes elementos traza en el músculo, hígado y riñón del tiburón azul con el fin de conocer la respuesta fisiológica mediante el empleo de indicadores de estrés oxidativo. Esto permitirá aportar información base acerca del tiburón azul, indirectamente del ecosistema, y estimar valores de su salud teniendo en cuenta información específica generada por sexo,

estadio de madurez y la posible influencia de sus presas potenciales: el calamar gigante y la langostilla.

2 ANTECEDENTES

2.1 Tiburón azul, *Prionace glauca*

El tiburón azul se caracteriza por presentar un cuerpo delgado y fusiforme, un hocico largo y estrechamente redondeado y los ojos con párpados nictitantes (Compagno *et al.*, 1995). El tiburón azul presenta dientes anchos, aserrados, triangulares y encorvados en la mandíbula superior y dientes más angostos en la inferior (Compagno *et al.*, 1995). La primera aleta dorsal se ubica hacia la parte media del cuerpo, más cerca de la base de las aletas pélvicas que de las pectorales, las cuales son muy largas, angostas y levemente falciformes; el pedúnculo caudal presenta a cada lado una débil quilla (Compagno *et al.*, 1995). El dorso del cuerpo presenta una coloración azul oscuro, azul intenso en los flancos y blanco en el vientre; el color azul cambia a púrpura negruzco después de la muerte. Se ha registrado como talla máxima 380 cm de longitud total (LT) (Compagno *et al.*, 1995) (Fig. 1).

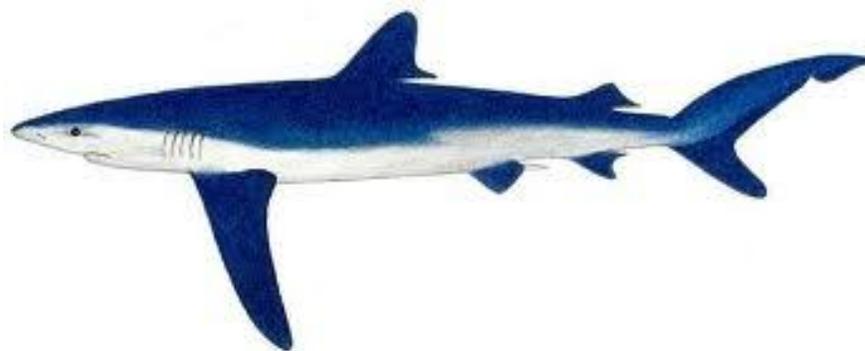


Figura 1. Tiburón azul, *Prionace glauca*. Tomado de www.discoverlife.org

Por su reproducción, los tiburones de esta especie son catalogados como organismos placentarios vivíparos con un periodo de gestación de 9 a 12 meses, generando aproximadamente 35 crías por ciclo reproductivo con una talla de 35 a 50 cm LT (Stevens,

2005). En la mayoría de las áreas su reproducción es estacional; las crías nacen entre la primavera y el verano (Stevens, 2005; Carrera-Fernández *et al.*, 2010). Estudios de edad revelan que el tiburón azul puede llegar a vivir 20 años, y se propone una edad de madurez de 4 a 6 años en machos y de 5 a 7 años en hembras (Stevens, 2005). Sin embargo, en el océano Pacífico mexicano se ha estimado una talla de madurez de 180 cm LT en machos y de 200 cm LT en hembras (Carrera-Fernández, 2003). Con base en los anillos de crecimiento de las vértebras, las longitudes reportadas para la talla de madurez corresponderían de 5 a 7 años en los machos y de 8 a 10 años en las hembras (Blanco-Parra, 2003).

El tiburón azul es uno de los tiburones con mayor intervalo de distribución, abarcando mares tropicales y templados, siendo el tiburón pelágico más abundante en el Océano Pacífico Norte. Ésta es una especie pelágica y oceánica que normalmente habita aguas superficiales y alrededor de los 350 m de profundidad (Stevens, 2005); sin embargo, se han registrado tiburones azules a profundidades hasta de 654 m (Carey *et al.*, 1990) (Fig. 2).

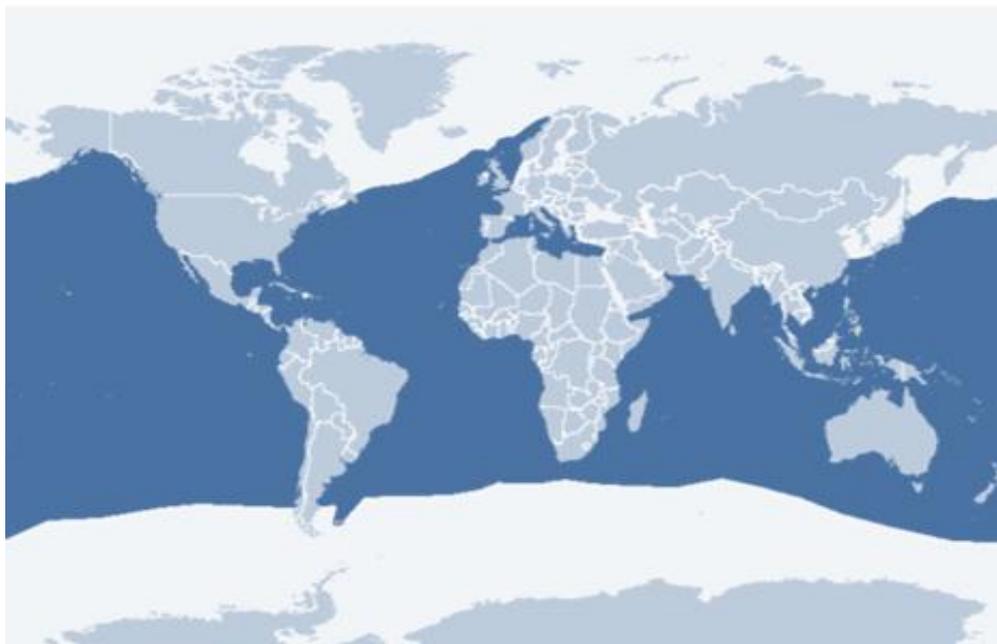


Figura 2. Distribución del tiburón azul, *Prionace glauca*. Tomado de Stevens, 2005.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

El tiburón azul se alimenta principalmente de calamares, peces y langostillas, encontrando diferencias en la dieta entre sexos (Compagno, 1984; Blanco-Parra, 2003; McCord y Campana, 2003; Hernández-Aguilar, 2008). Sin embargo, la dieta también puede variar de acuerdo al lugar donde se encuentre, a la abundancia y tipo de las presas potenciales, ya que este tiburón ha sido catalogado como especialista y oportunista (Henderson *et al.*, 2001; Pardo-Gandarillas *et al.*, 2007). La mayoría de las presas del tiburón azul son pelágicas, pero también se han reportado peces bentónicos en los contenidos estomacales. Este tiburón se alimenta las 24 horas del día, pero las horas de mayor actividad son en el atardecer y en la noche (Sciarrotta y Nelson, 1977).

En el Océano Atlántico norte, el tiburón azul se alimenta principalmente de peces pelágicos (McCord y Campana, 2003) y en el Atlántico sur tanto de peces como de cefalópodos (Bornatowski y Schwingel, 2008). En el océano Pacífico, los juveniles del tiburón azul se alimentan principalmente de peces (*Engraulis ringens*) y cefalópodos (*Dosidicus gigas*) (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2007). En el Pacífico noroccidental las principales presas del tiburón azul son los cefalópodos mesopelágicos y batipelágicos, así como pequeños peces mictófidios (Kubodera *et al.*, 2007). Los estudios tróficos sugieren que el tiburón azul es un depredador tope presentando un nivel trófico de 3.8 a 4.1 con base en el algoritmo propuesto por Christesen y Pauly (1992) (Christesen y Pauly, 1992; Cortés, 1999; Hernández-Aguilar, 2008).

2.2 Indicadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes que induce daño oxidativo (Sies, 1985). Dentro de los prooxidantes se incluyen a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los radicales libres, los cuales son moléculas, átomos o grupos de átomos con una alta capacidad reactiva (Chihuailaf *et al.*, 2002; Königsberg, 2008). El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es una de las ERO generadas por diversos sistemas biológicos (Königsberg, 2008) y es un radical libre altamente tóxico debido a que daña las proteínas que contienen centros Fe-S, como la succinato

deshidrogenasa, el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH) y la ubiquinona oxidoreductasa, pero también puede generar otras ERO como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Konigsberg, 2008). Este último es una de las ERO más estables; sin embargo, puede reaccionar con algunos metales de transición y generar otras especies más reactivas, como el radical hidroxilo (HO^\bullet) (Konigsberg, 2008). El HO^\bullet es una especie química cuya reactividad oxidante está limitada sólo por su nivel de difusión, de tal forma que en las células tiene la capacidad de reaccionar rápidamente con cualquier molécula (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El sistema antioxidante constituye el mecanismo por el cual los organismos aeróbicos contrarrestan el efecto dañino de las ERO, que incluye defensas enzimáticas y no enzimáticas (Halliwell y Gutteridge, 2007; Konigsberg, 2008). La SOD es una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y agua (Fridovich, 1998). Los miembros de esta familia incluyen SOD dependiente de Fe (Fe-SOD), SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD), SOD dependiente de níquel (Ni-SOD) y SOD dependiente de cobre y zinc (Cu, Zn-SOD) (Gómez y Cuevas, 2008). En esta última, la presencia de Zn le da estabilidad a la molécula y el Cu contribuye a la función catalítica (Gómez y Cuevas, 2008).

Catalasa (CAT) es una enzima con actividad peroxidasa que se encarga de descomponer el H_2O_2 en agua y oxígeno (Peraza, 2008). El sitio activo de la CAT tiene asociados átomos de Fe, pero también se ha descrito la pseudocatalasa o CAT dependiente de Mn, que tiene átomos de Mn en su centro catalítico (Peraza, 2008). En mamíferos, la expresión de la CAT es elevada en hígado y eritrocitos, alta en tejido adiposo y riñón, moderada en el páncreas y pulmones, y baja en suero, corazón y cerebro (Peraza, 2008).

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína antioxidante que requiere de GSH para reducir el H_2O_2 a agua (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008). GPx es el nombre genérico de una familia de isoenzimas caracterizadas por estar conformadas por una selenocisteína, una glutamina y un triptófano (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008). Algunas

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

isoenzimas de GPx como la citosólica, gastrointestinal, plasmática y fosfolipídica, dependen del Se (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).

La glutatión reductasa (GR) es una enzima que participa en la regeneración de GSH mediante la reducción del glutatión oxidado (GSSG); para ello, GR utiliza el NADPH producido por diferentes sistemas enzimáticos, como el de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008). La glutatión S-transferasa (GST) es una superfamilia de enzimas que, combinada con GSH, actúa sobre xenobióticos (contaminantes) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Normalmente, GST se encuentra en el hígado y puede metabolizar aldehídos citotóxicos que se generan por la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Si las ERO no son balanceadas por los antioxidantes intracelulares pueden causar daño oxidativo a los tejidos (Abele y Puntarulo, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007) (Fig. 3). Este daño se puede presentar en proteínas, lípidos y en la cadena de ADN. La peroxidación de lípidos es un proceso de reacciones en cadena, empezando cuando un lípido adquiere un átomo de hidrógeno (de una ERO) para formar un radical libre lipídico, el cual puede reaccionar con otra molécula lipídica, y así sucesivamente hasta que se paree con otro radical lipídico para formar una molécula no radical (Martínez-Cayuela, 1998; Bragadóttir, 2001). La susceptibilidad al daño oxidativo, la concentración de antioxidantes no enzimáticos y la actividad enzimática antioxidante varían de acuerdo a la función y estructura de los diferentes tejidos en los organismos (Fidan *et al.*, 2008; Cantú-Medellín *et al.*, 2009).

En elasmobranquios se han reportado pocos estudios enfocados a los indicadores de estrés oxidativo. En tiburones y rayas los niveles de peroxidación de lípidos, cuantificados como la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT son mayores en hígado, quizá debido al metabolismo y consumo de oxígeno de este tejido (Filho y Boveris, 1993). La actividad de la SOD y CAT es mayor en músculo rojo que en músculo blanco, mientras que la actividad de SOD es mayor en rayas que en tiburones y en peces teleósteos (Filho y Boveris, 1993).

Adicionalmente, se ha reportado que la ausencia de la actividad de CAT en la sangre del tiburón *Squalus acanthias* puede contribuir a los niveles observados de peroxidación de lípidos (Rudneva, 1997). Los niveles de TBARS en elasmobranchios son de 6 a 35 veces mayores que en peces teleósteos (Rudneva, 1997). La producción de $O_2^{\bullet-}$ y las defensas antioxidantes del músculo esquelético de tiburones parecen estar asociadas a la capacidad de nado de cada especie (López-Cruz *et al.*, 2010).

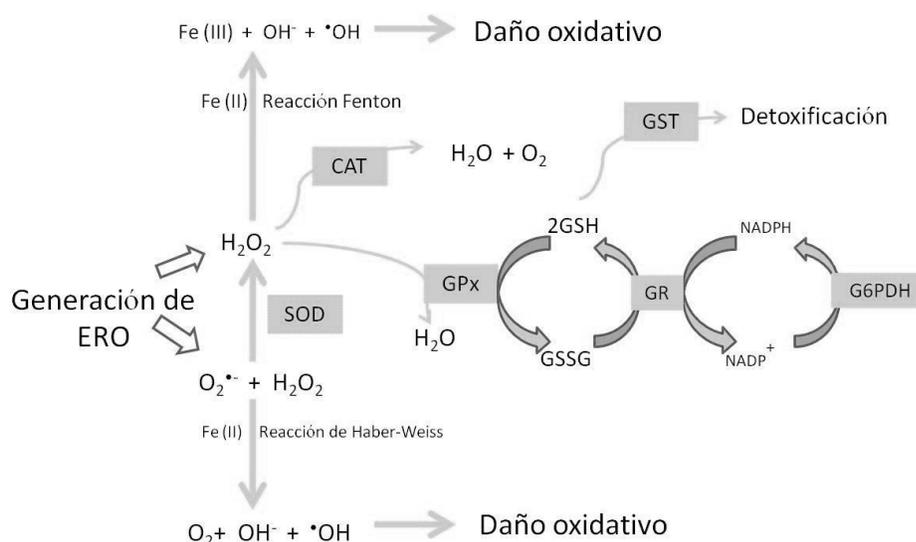


Figura 3. Defensas antioxidantes de las enzimas ante la presencia de especies reactivas de oxígeno. ERO: Especies reactivas de oxígeno; SOD: Superóxido dismutasa; CAT: Catalasa; GPx: Glutatión peroxidasa; GST: Glutatión S-transferasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. $O_2^{\bullet-}$ radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; HO^{\bullet} radical hidroxilo. Modificado de Hermes-Lima (2004).

2.3 Elementos traza y su potencial efecto cuantificado mediante los indicadores de estrés oxidativo

Algunos estudios reportan la concentración de diferentes elementos traza en tejidos de tiburones pelágicos (Anexo 2). La acumulación de elementos traza en peces ocurre principalmente en el músculo, mediante la unión del metal a las proteínas (e.g. metalotioneina, MT) (Núñez-Nogueira *et al.*, 1998; Storelli *et al.*, 2003). Sin embargo,

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

también otros órganos, como el hígado, riñón, páncreas, branquias o sangre, pueden acumular elementos traza (Núñez-Nogueira *et al.*, 1998; Berntssen *et al.*, 2004).

Las concentraciones de arsénico (As) y Cd en hígado de machos del tiburón martillo (*Sphyrna zygaena*) del Mar Mediterráneo son 44.22 ± 2.22 y 19.77 ± 1.29 mg kg⁻¹ peso húmedo (ww), respectivamente; estos niveles se atribuyen a que ambos elementos se acumulan en la cadena trófica y presentan niveles altos en cefalópodos y camarones, que son una parte del alimento del tiburón martillo (Storelli *et al.*, 2003). Las concentraciones de Zn y Cu en el hígado del tiburón martillo (26.66 ± 1.85 y 6.06 ± 1.2 mg kg⁻¹ ww, respectivamente) se atribuyen a que éstos son elementos esenciales y juegan un papel importante en el metabolismo de los organismos (Storelli *et al.*, 2003).

El Hg es un elemento que se encuentra de forma natural en el ambiente (Gupta, 2007). Existen muchas formas de Hg que varían de acuerdo a su fuente; por ejemplo, cuando se combina con el carbono (C) forma mercurio orgánico, como metilmercurio (MeHg), etilmercurio, fenilmercurio, entre otros. El MeHg es la forma más tóxica del Hg, tiende a acumularse en los animales tope de las cadenas tróficas y tiene una alta afinidad a los grupos tiol y sulfidrilo de las proteínas, por lo que puede inactivar enzimas y proteínas estructurales, afectar el transporte de proteínas, inducir estrés oxidativo, disminuir la concentración del GSH, y alterar el metabolismo de los grupos hemo y la síntesis de proteínas (Gupta, 2007).

García-Hernández *et al.* (2007) analizaron niveles de Hg en varias especies de tiburones y rayas en el Golfo de California, encontrando valores (hasta 20.83 mg kg⁻¹ ww) por encima de lo permitido por la norma sanitaria de México (NOM 242-SSA1, 2009) (1 mg kg⁻¹). Maz-Courrau y López-Vera (2006), basándose en el factor de biomagnificación (FB) propuesto por Gray (2002), reportaron que de las presas potenciales de los tiburones en las costas de la península de Baja California Sur, el calamar (*D. gigas*) es el que tiene una mayor contribución de Hg, seguido por la langostilla (*P. planipes*) y otras presas secundarias incluyendo algunos peces. Adicionalmente, se ha sugerido que en tiburones existe una correlación directa de la biomagnificación con el sexo y talla, y que los niveles

de Hg en músculo exceden los niveles permitidos por la norma oficial mexicana (1 mg kg^{-1}), excepto en el tiburón azul (Maz-Courrau y López-Vera, 2006).

El consumo de Hg inorgánico en dosis de 10 mg kg^{-1} reduce la absorción de aminoácidos y azúcares en el intestino, inhibe la actividad de las enzimas intestinales, reduce la longitud del intestino y genera hinchazón del mismo en el salmón del atlántico (*Salmo salar L.*) (Berntssen *et al.*, 2004). En el salmón del atlántico, el Hg aumenta la concentración de TBARS y disminuye la actividad de SOD y GPx (Lushchak, 2012). La intoxicación por Hg se caracteriza por la ausencia de enzimas específicas en el hígado y riñón, como aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, sugiriendo daño en dichos tejidos (Berntssen *et al.*, 2004). En los peces, el cerebro es más vulnerable a la presencia del Hg que en otros tejidos, como el hígado o el riñón (Lushchak, 2012).

El Cd y el plomo (Pb) pueden transmitirse a través de la cadena trófica (Elorriaga-Verplancken y Auriolles-Gamboa, 2008; Fidan *et al.*, 2008). Estos dos elementos traza pueden ser afectados por factores ambientales como el pH, oxígeno disuelto o temperatura (Wang, 1987; Hodgson, 2004). El Pb es un elemento tóxico asociado a la actividad humana (Gupta, 2007). En un organismo, el Pb se une a los grupos sulfidrilo y nucleofílicos alterando el metabolismo del calcio y de la vitamina D; adicionalmente, contribuye al estrés oxidativo e interfiere con los procesos enzimáticos de los grupos hemo, llegando a ocasionar anemia (Gupta, 2007). En humanos, la presencia de Pb puede incrementar la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y, al tener afinidad con los grupos sulfidrilo de las proteínas, puede inhibir la acción del GSH. En músculo de tiburón mako se encontró una correlación directa entre la concentración de Pb y la actividad de GPx (Velez, 2009).

El Cd es un elemento divalente de transición y usualmente se encuentra como un mineral en combinación con otros elementos (Valko *et al.*, 2005). En animales, la exposición a Cd es por ingestión; sin embargo, al estar unido a la MT puede estar menos disponible para ser absorbido (Gupta, 2007). Dentro de un organismo, el Cd es transportado en el plasma unido a la albumina y distribuido a todo el cuerpo; su mayor concentración se encuentra en el hígado y los riñones, ya que tejidos como el músculo y los

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

huesos no acumulan este elemento (Gupta, 2007). En las células, el Cd libre se une a los grupos sulfidrilo de las proteínas alterando su ciclo redox y disminuyendo la concentración del GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007). En músculo de tiburón mako se reportó un correlación inversa entre la concentración de Cd y la actividad de GPx (Velez, 2009).

El Zn es un elemento esencial en la nutrición de los organismos y componente de 20 metaloenzimas (Halliwell y Gutteridge, 2007). El Zn es absorbido principalmente por el duodeno y el intestino (Valko *et al.*, 2005). Una vez absorbido, el Zn se une a la albumina y a las macroglobulinas, y es transportado al hígado, riñón y páncreas (Gupta, 2007). Su concentración en estos tejidos, así como en el músculo puede inducir la producción de la MT (Valko *et al.*, 2005; Gupta, 2007). El Zn es parte de la molécula Cu, Zn-SOD y puede prevenir la formación del HO[•], puede inducir factores de transcripción de metaloproteínas como la MT que, a su vez, previenen la acción de otros elementos traza (Valko *et al.*, 2005). Sin embargo, el déficit de Zn en el organismo está relacionado con la producción de ERO y puede inducir daño a lípidos, proteínas y ADN en ratas y otras especies (Valko *et al.*, 2005).

El Cu es un elemento empleado por el hombre para elaborar cables y componentes electrónicos, pero también es un elemento esencial para plantas y animales; interactúa con muchas enzimas dependientes de Cu, como la citocromo C oxidasa y SOD (Gupta, 2007). La ingesta es la ruta por la que el Cu se incorpora al organismo, es absorbido por el intestino y transportado en la sangre por la albumina y la transcupreina, las cuales reducen los efectos oxidativos del Cu divalente (Gupta, 2007). La MT y el GSH se unen al Cu libre evitando que participe en la síntesis de ERO y en la inducción del daño oxidativo (Valko *et al.*, 2005). En peces loros (*Sparus aurata*) y bailarinas (*Carassius auratus*) la presencia de Cu incrementa la actividad de SOD y GST, disminuye la actividad de CAT y GPx y, en consecuencia, aumenta la concentración de TBARS en tejidos como el intestino y las branquias (Lushchak, 2012).

El Fe es abundante en la tierra, presenta formas que varían en el agua de forma natural. Fe⁺² es la forma fácilmente oxidable del elemento y se encuentra en altas concentraciones

en los fluidos hidrotermales (Furness y Rainbow, 1990). Éste es un elemento esencial, ya que contribuye al transporte de oxígeno en la hemoglobina y mioglobina y participa en reacciones biológicas de oxido-reducción, incluyendo la fotosíntesis (Halliwell y Gutteridge, 2007). Un exceso de Fe y procesos de oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , inhabilitan a la hemoglobina para transportar oxígeno. Las metaloproteínas son las encargadas de evitar que los elementos traza (Fe, en este caso en particular) donen un electrón para formar una ERO como el HO^{\bullet} e inicie el daño oxidativo (Gupta, 2007). La forma química Fe^{+2} se puede absorber por el tracto gastrointestinal y transformarse a Fe^{+3} en el suero, en donde se une a la transferrina (Gupta, 2007). En peces bailarinas (*C. auratas*) Fe^{+3} reduce la actividad de la CAT, GST, GR y aumenta el daño a proteínas (carbonilos proteicos) en tejidos como el hígado y el riñón (Lushchak, 2012).

Las normas oficiales mexicanas han establecido límites máximos de concentraciones de elementos traza en los productos de animales marinos destinados para el consumo humano (Tabla I). Sin embargo, la escasez de información sobre los niveles de elementos traza en tejidos de tiburones sugiere la necesidad de realizar un seguimiento con el fin de crear medidas necesarias para su protección, cuidado y, en caso de ser necesario, evitar los efectos tóxicos en la población consumidora de este recurso en México y en el mundo.

Tabla I. Límite máximo de la concentración de elementos traza establecido por la NOM 242-SSA1, NOM 027-SSA1, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para consumo de organismos marinos.

Elemento traza	Concentración límite	Grupo de organismo
Mercurio (MeHg)	1 mg kg ⁻¹	Peces
	0.5 mg kg ⁻¹	Otras especies
Cadmio	2 mg kg ⁻¹	Moluscos
	0.5 mg kg ⁻¹	Otras especies
Plomo	1 mg kg ⁻¹	Moluscos
	0.5 mg kg ⁻¹	Peces y otras especies
Arsénico	80 mg kg ⁻¹	Moluscos, crustáceos y bivalvos

3 JUSTIFICACION

El tiburón azul es una especie de importancia debido a que no se tiene información relevante del estado de su población, está siendo afectada por la alta explotación pesquera para consumo humano y, al ser un depredador tope y una especie longeva, tiende a acumular contaminantes, como los elementos traza, en sus tejidos, que pueden llegar a ser nocivos para su salud y alterar marcadores fisiológicos como los indicadores de estrés oxidativo, por lo cual ha sido considerada como una especie bioindicadora de la salud del ecosistema donde habita. Por lo anterior, es importante generar información base sobre la concentración de elementos traza que el tiburón azul acumula en sus tejidos, al igual que determinar alteraciones fisiológicas y/o crear bases de los diferentes indicadores de estrés oxidativo.

Esta información servirá como referencia para futuros estudios, como base para generar un monitoreo de las condiciones ambientales para la especie y su entorno y, de esta manera, desarrollar planes de conservación y manejo para el tiburón azul. Adicionalmente, esta información podrá ser útil para determinar las posibles implicaciones en la salud humana por el consumo de este recurso pesquero.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Conocer la respuesta fisiológica, en términos del estrés oxidativo, causada por la concentración diferencial por sexo y estadio de madurez de los elementos traza en los tejidos del tiburón azul (*Prionace glauca*).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de los elementos traza (Cd, Cu, Zn, Fe, Pb, Hg, Ag, Se, As) en músculo, hígado y riñón del tiburón azul.
- Medir la actividad de las enzimas SOD, GST, GR, GPx y CAT como indicadores de las defensas antioxidantes en músculo, hígado y riñón del tiburón azul.
- Determinar la producción del $O_2^{\cdot-}$ (como indicador de la presencia de ERO) en músculo, hígado y riñón del tiburón azul.
- Establecer los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilos proteicos como indicadores del daño oxidativo en músculo, hígado y riñón del tiburón azul.
- Determinar las concentraciones de elementos traza en las presas potenciales (*Dosidicus gigas* y *Pleuroncodes planipes*) del tiburón azul, así como recopilar referencias de las concentraciones de elementos traza en otras presas del espectro trófico del tiburón azul.

5 HIPÓTESIS

- Debido a la segregación espacio-temporal y a las preferencias alimenticias reportadas por sexos y estadio de madurez del tiburón azul, pueden existir diferencias significativas entre machos y hembras, así como entre juveniles y adultos en la concentración de los elementos traza. Como respuesta a la concentración diferencial, se espera observar un aumento en los indicadores de estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno, actividad antioxidante y daño oxidativo a lípidos y proteínas) entre machos y hembras, así como entre juveniles y adultos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

La costa occidental de la península de Baja California Sur es un área influenciada por dos grandes corrientes. La corriente de California proviene del norte, desde la costa oeste de Estados Unidos hasta Baja California Sur, trayendo aguas frías y es predominante en la época de invierno y primavera, y la corriente norecuatorial que aporta aguas cálidas desde el sur, predomina en las épocas de verano y otoño (De La Lanza, 2001).

Las surgencias son un aspecto importante en esta área, debido a que permiten que la zona sea más productiva por el abastecimiento de nutrientes. Esta característica está presente todo el año; sin embargo, es más notorio en el primer semestre del año (Longhurst, 1967; Norton *et al.*, 1985). Adicionalmente, la costa occidental de Baja California Sur es un área que no se ha visto influenciada por contaminación antropogénica, ya que no existe la presencia de industrias o agricultura a gran escala que ocasionarían descarga de contaminantes a la costa (Maz-Courrau y López-Vera, 2006).

6.2 Fase de campo

Las muestras de tejidos de tiburón azul se colectaron en el campo pesquero de Punta Belcher, cercano al puerto de San Carlos durante el año 2009 (Fig. 4) mediante la captura proveniente de la pesca artesanal de tiburones, la cual se realiza por medio de palangres con carnada. Se obtuvieron datos morfométricos, sexo y estadio de madurez de cada tiburón muestreado. Se extrajeron aproximadamente 10 g de hígado, riñón, y músculo de la parte posterior de la cabeza. El estadio de madurez fue asignado bajo el criterio de Pratt (1979); los tiburones machos con gonopterigio o *clasper* calcificado y con rotación, y hembras con embriones en el útero, huevos fertilizados u ovarios desarrollados, fueron considerados como adultos.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Los calamares (*D. gigas*) se colectaron en el campo pesquero Punta Lobos durante mayo del 2010, mediante la pesca artesanal, por medio de poteras. De cada organismo se registraron datos morfométricos y se extrajeron aproximadamente 10 g de músculo y hepatopáncreas.

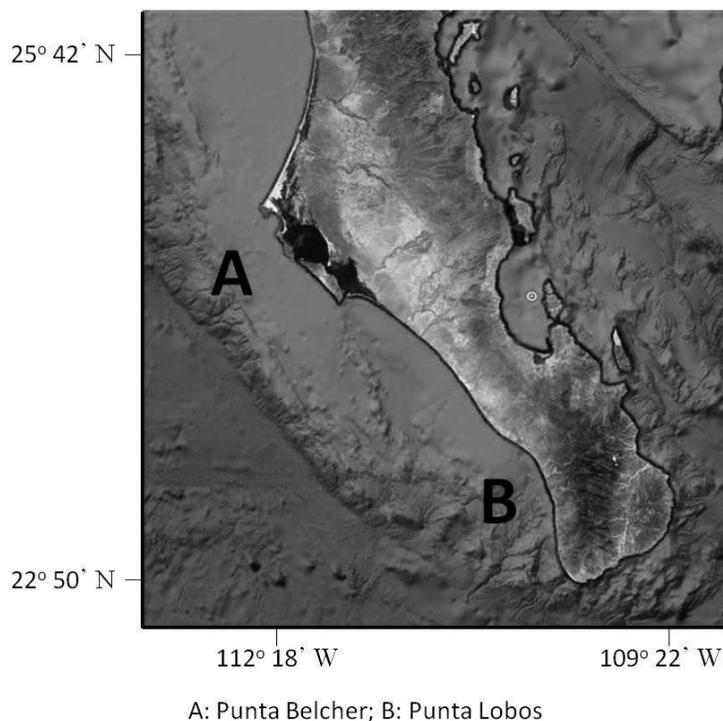


Figura 4. Lugares de colecta de las muestras de tiburón azul (*Prionace glauca*) y calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en Baja California Sur, México. A: Punta Belcher; B: Punta Lobos. Tomado y modificado de Google Earth.

La langostilla (*P. planipes*) se obtuvo de los cruceros de investigación a bordo del B/I BIP XII; estos datos pertenecen al informe técnico Sagarpa-CONACyT No. 19 (De Anda *et al.*, 2007). Los datos utilizados en este estudio corresponden a los obtenidos a partir del crucero 3, el cual se llevó a cabo en Noviembre del 2005, de las estaciones ubicadas cerca a los campos pesqueros de Punta Belcher ($24^{\circ} 15' N$ y $112^{\circ} 05' W$) a profundidades desde 95 m hasta 344 m.

Todas las muestras de tiburón azul y calamar se almacenaron en bolsas de plástico dentro de un contenedor con hielo, y se transportaron al laboratorio. Una vez en el

laboratorio se almacenaron en un congelador (-20°C) en el laboratorio de Ecología de Peces del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) hasta su posterior análisis. Las muestras de langostilla se congelaron (-20 °C), y se transportaron al laboratorio. Una vez en el laboratorio se almacenaron en un congelador (-80°C) en el laboratorio de Estrés Oxidativo (Salud Ambiental y Biomedicina) en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) hasta su análisis.

6.3 Fase de laboratorio

6.3.1 Elementos traza

La determinación de los elementos traza Cd, Cu, Zn, Pb y Fe se realizó en el Laboratorio de Absorción Atómica en el CIBNOR. Para la determinación de Cd, Cu, Zn, Pb and Fe se pesaron aproximadamente 5 g de los diferentes tejidos de tiburón y de calamar. Se hizo un homogenizado de 3 langostillas para obtener la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo los análisis. Las muestras se llevaron a una estufa a 60°C durante 72 h con el propósito de deshidratarlas. Se registró el peso húmedo y el peso seco con el fin de determinar la humedad, transformar y reportar los datos en mg kg^{-1} de peso húmedo (ww).

Para la digestión de las muestras se empleó un digestor electromagnético (CEM Mars 5x, Matthew, NC, U.S.A.), compuesto por un carrusel de 16 vasos de teflón, en los cuales se colocó aproximadamente 0.3 g de muestra seca y se le adicionó 2 mL de H_2O_2 (30%) y 5 mL de ácido nítrico (HNO_3) con el fin de eliminar los residuos y la materia orgánica. Posterior a la digestión y una vez enfriada la muestra, se transfirió a viales de plástico de 50 mL y se aforaron a 50 mL con agua desionizada para finalmente ser leído en el espectrofotómetro de absorción atómica (GBS Scientific AVANTA, Dandenog, Australia) mediante flama aire/acetileno.

Para la validación de los datos, se empleó el estándar de referencia TORT-2 (hepatopáncreas de langosta) del National Research Council of Canada. Todos los análisis

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

de muestras se realizaron por triplicado. El límite de detección (MDL) fue 0.017 mg kg^{-1} para Cd y Cu, 0.021 mg kg^{-1} para Zn, 0.074 mg kg^{-1} para Pb, y 0.65 mg kg^{-1} para Fe.

La determinación de los elementos traza As, Ag, Hg y Se, se realizó en el Laboratorio de Wildlife Toxicology en la Universidad de Alaska campus Fairbanks (UAF). Para determinar la concentración de mercurio total (THg) se tomó una sub-muestra de aproximadamente 3 g del tejido en bolsas de plástico (Nasco Whirl-Pack, capacidad 2 onzas) etiquetadas. Posteriormente, las muestras se liofilizaron por 72 horas (Freeze Dry System /Freezone 4.5 Lab conco, Kansas City, MO, USA). Se tomó el peso seco con el cual se determinó el porcentaje de humedad de la muestra para transformar los datos a peso húmedo. Se homogenizó el tejido seco mediante el empleo del equipo DMA-80 (Direct Mercury Analyzer, Milestone Inc, Shelton, CT, USA), para lo cual se pesaron de 10 a 35 mg de tejido y se colocaron en el carrusel del equipo (Knott *et al.*, 2011). Para la calibración del equipo se utilizaron 2 ng de Hg a 100 mg kg^{-1} ($20 \mu\text{L}$). Como material de referencia se emplearon DORM-3 (músculo del tiburón espinoso), DOLT-4 (hígado del tiburón espinoso) y TORT-2 establecidos por el National Research Council of Canada. Los datos se reportan en mg kg^{-1} de peso húmedo (ww). El límite de detección (MDL) fue 0.02 mg kg^{-1} para Cd.

Para la determinación de la concentración de Se, As y Ag mediante absorción atómica, se tomó una sub-muestra de aproximadamente 0.5 g y se colocó en viales de plástico de 50 mL rotulados. Para la digestión, la muestra se colocó en los vasos de teflón del horno (Multivawe 300 Microwave Sample Preparation System, Anton Para, Austria, Europe) y se adicionaron 6 mL de HNO_3 (70%) y 2 mL de H_2O_2 al (30%) (Baker Analyzed A.C.S Reagent Stabilized). La muestra digerida se envasó en viales de plástico de 50 mL y se aforó con agua destilada a 20 mL. En cada corrida de digestiones se emplearon los materiales de referencia DOLT-4 y trucha del Lago Superior (Lake Superior Fish - LSF) del National Research Council of Canada y el National Institute of Standards and Technology (NIST) y una mezcla enriquecida, la cual es una solución de HNO_3 (2%) que contiene 31.49 ng g^{-1} de As, 4.25 ng g^{-1} de Ag y 28.33 ng g^{-1} de Se. Para la lectura de As y

Ag se empleó un espectrómetro de absorción atómica (Atomic Absorption Spectroscopy, PerkinElmer Instruments, Shelton, CT, USA) con horno de grafito (Graphite Furnace + Autosample (AS) 93). Todos los análisis de muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan en mg kg^{-1} de peso húmedo (ww). Los límites de detección empleados fueron 0.01 mg kg^{-1} para Ag y 0.02 mg kg^{-1} para As.

Para la determinación de Se, se pesaron aproximadamente 2 g (2 mL) del producto de la primera digestión y se colocaron en los vasos de teflón adicionándoles 3 mL de agua destilada y 5 mL de HCl (37%) (OmniTrace). Las muestras se digirieron mediante el empleo de un horno (Multivawe 300 Microvawe Sample Preparation System, Anton Para, Austria, Europe). La muestra digerida se envasó en viales de plástico de 50 mL y se aforó con agua destilada a 20 mL. Para su lectura se empleó el espectrómetro de absorción atómica (PerkinElmer Instruments, Shelton, CT, USA) mediante el sistema de flujo de inyección (Flow Injection Analysis System (FIAS 100) AS 93). Los resultados se expresaron en mg kg^{-1} de peso húmedo. Se prepararon estándares de los elementos a diferentes concentraciones, empleados para calibrar el equipo (Tabla I). El límite de detección para Se fue de 0.04 mg kg^{-1} .

6.3.2 Indicadores de estrés oxidativo

Los indicadores de estrés oxidativo se analizaron en el laboratorio de Estrés Oxidativo (Salud Ambiental y Biomedicina) en el CIBNOR. Los indicadores del estrés oxidativo se cuantificaron mediante métodos espectrofotométricos (colorimétricos) en los diferentes tejidos del tiburón y del calamar. Todos los análisis de muestras se realizaron por triplicado.

6.3.2.1 Proteínas solubles totales

Para estandarizar los datos de los indicadores de estrés oxidativo, se midió la concentración de proteínas totales, utilizando el método descrito por Bradford (1976). Este método utiliza el colorante azul de Coomassie el cual reacciona con los residuos de amino

ácidos básicos, especialmente la arginina, en respuesta a la concentración de proteínas en la muestra.

Se preparó una curva estándar de 7 puntos en el rango de concentración de 0.005-0.2 mg mL⁻¹ de albúmina sérica bovina (ASB). En una microplaca, se mezcló agua destilada y albúmina (ASB) (para la curva estándar) o muestra. Se agitó y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 590 nm en un analizador automático (Microlab 300, Vital Scientific, Holanda). Los resultados se expresan en mg mL⁻¹ de proteína.

6.3.2.2 Producción de radical superóxido

La tasa de producción endógena de O₂^{•-} es un indicador de la producción de ERO y para su determinación se emplea un método fotolorimétrico indirecto y discontinuo que cuantifica la reducción del ferricitocromo C por la presencia de O₂^{•-} durante un intervalo de tiempo fijo (Drossos *et al.*, 1995). El músculo (50 mg) fue colocado en solución amortiguadora de fosfato Krebs (NaCl 110 mM; KCl 4.7 mM; MgSO₄ 12 mM; NaH₂PO₄ 12 mM; NaHCO₃ 25 mM; glucosa 1 mM).

Después de adicionar citocromo c (15 μM), las muestras fueron incubadas en un baño de agua en agitación por 15 min a 37°C. Se agregó N-etimaleimida (3 mM) para parar la reacción. Las muestras se centrifugaron a 1509 x g a 4°C por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió mediante un espectrofotómetro (Jenway 6505, Princeton, NJ, USA). La producción del O₂^{•-} se calculó usando el coeficiente de extinción para el cambio de ferricitocromo a ferrocitocromo a 21 nm L⁻¹ cm⁻¹. Se utilizó como blanco una mezcla que contiene los mismos reactivos excepto el citocromo c. Los datos de tiburón y calamar se expresaron en nmol O₂^{•-} min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

6.3.2.3 Actividad de las enzimas antioxidantes

Para medir la actividad de las enzimas antioxidantes, se pesó aproximadamente 0.1 g del tejido y se homogenizó en tubos de ensayo con 2 mL de solución para homogenizar (50 mM, pH 7.0; solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, EDTA 1 mM y agua desionizada) y

fenil-metil-sufonil fluoruro (PMSF, 1 mM). El homogenizado se centrifugó por 10 min a $1509 \times g$ a 4°C ; el sobrenadante se utilizó para el análisis inmediato de la actividad de las enzimas antioxidantes. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, USA).

La actividad de GPx se mide indirectamente mediante el monitoreo del decremento continuo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) con niveles constantes de GSH (Flohé y Günzler, 1984). En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), GR (15 U mL⁻¹), NADPH (1.5 mM), agua desionizada fría, GSH (250 mM) y H₂O₂ (10 mM). Se registró el decremento en la absorbancia a 340 nm durante 40 segundos. Los resultados se expresaron como unidades (U) de GPx mg⁻¹ de proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de NADPH por minuto.

Para cuantificar la actividad de GR, se empleó la metodología propuesta por Goldberg y Spooner (1987), en la cual la actividad enzimática se determina de una forma indirecta al leer el decremento en la absorbancia durante la oxidación del NADPH. Se adicionó en una celda de cuarzo solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), agua desionizada fría, NADPH (1.5 mM), muestra y GSSG (10 mM). Se registró el decremento en la absorbancia del blanco y de la muestra a 340 nm por 40 segundos. Los resultados se expresaron como U mg⁻¹ de proteína para tiburones y como mili-unidades (mU) mg⁻¹ de proteína para calamar. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de GSSG por minuto.

Para determinar la actividad de GST se empleó la metodología de Habig y Jakoby (1981) en la cual se monitorea la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenzeno formado al conjugarse GSH y 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm por 6 minutos. Se agregó en una celda de plástico CDNB (10 mM) y solución de corrida, la cual contiene GSH, solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) y EDTA (60 mM). Los resultados se expresan como U GST mg⁻¹ de proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que sintetiza 1 μmol de producto por minuto.

Para la determinación de la actividad de SOD se utilizó el método empleado por Suzuki (2000). Es un método indirecto que sigue el decremento en la concentración del formazán, generado como producto de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), a 560 nm durante 5 minutos. En una celda de plástico se adicionó solución para homogenizar, xantina oxidasa y solución de trabajo la cual contiene solución amortiguadora sodio-carbonato (50 mM), xantina (0.1 M), NBT y EDTA a 25°C. Los resultados se expresan como U SOD mg^{-1} de proteína. Cada unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la máxima reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el NBT.

Para determinar la actividad de CAT se empleó el método de Aebi (1984) el cual mide el decremento de la concentración de H_2O_2 , sustrato de la catalasa, a 240 nm durante 3 minutos. En una celda de cuarzo se agregó muestra y solución de trabajo, la cual contiene solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) y H_2O_2 (20 mM). Los resultados se expresaron en U CAT mg^{-1} de proteína. Una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para consumir un μmol de H_2O_2 por minuto.

6.3.2.4 Daño oxidativo

6.3.2.4.1 *Carbonilos proteicos*

Se cuantificaron los niveles de carbonilos proteicos mediante la obtención de sus derivados con 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH), que se precipitan con ácido tricloroacético (TCA) y se mide la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm (Levine *et al.*, 1994). Se pesó aproximadamente 0.1 g del tejido y se homogenizó con ácido sulfosalísílico al 5% (Sigma-0640); se centrifugó por 5 min a $17005 \times g$ a 4°C, para obtener el precipitado. Se adicionó 2,4-dinitrofenil hidracina (DNPH) a los tubos de muestra y HCl (2 M) a los blancos. Los tubos se agitaron en un vortex durante 40 segundos y se incubaron durante una hora con agitación cada 15 minutos.

Posteriormente, se adicionó TCA (2%) y se centrifugaron los tubos por 5 min a $17005 \times g$ a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se procedió a lavar el precipitado agregándole etanol: acetato de etilo (1:1) y se centrifugó nuevamente por 5 min a $17005 \times g$ a 4°C. Este

procedimiento se repitió 3 veces. A continuación se adicionó clorato de guanidina, se agitaron los tubos en vortex y se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 min con agitación. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 17005 \times g a 4°C. El sobrenadante se colocó en celdas de plástico y se procedió a la lectura de la máxima absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, USA) realizando un barrido en el rango de 340-410 nm. Los resultados se expresaron en μ moles de carbonilos proteicos por gramo de tejido.

6.3.2.4.2 *Peroxidación de lípidos*

Se cuantificó la peroxidación de lípidos como el contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) (Persky *et al.*, 2000). La muestra se homogenizó en solución salina (0.9%) a pH 7 en un recipiente con hielo. El homogenizado (250 μ L) se incubó en un baño de agua con agitador por 15 min a 37°C. La reacción se detuvo al adicionar HCl (0.8 M) frío en ácido tricloroacético (TCA) al 12.5%. A la muestra se le adicionó ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% y se incubó por 10 min en un baño de agua hirviendo; finalizando el periodo de incubación se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se centrifugó a 1509 \times g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se leyó a 532 nm. Una curva estándar de malondialdehido (MDA) se corrió en paralelo a las muestras y la concentración de TBARS en las muestras se calculó con base en la curva estándar. Los resultados se expresaron en nmol TBARS mg^{-1} proteína.

6.4 **Análisis estadísticos**

6.4.1 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul

Los datos fueron agrupados en cinco categorías: hembras inmaduras colectadas en diciembre (HI_d), hembras maduras colectadas en diciembre (HM_d), machos inmaduros colectados en diciembre (MI_d), machos inmaduros colectados en mayo (MI_m) y machos maduros colectados en mayo (MM_m). El estadio de madurez fue determinado bajo el criterio de Pratt (1979), como se mencionó anteriormente. Para determinar las diferencias entre sexos se compararon las HI_d contra los MI_d y MI_m y las HM_d contra los MM_m. Las

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

diferencias por estadio de madurez se realizaron mediante la comparación de HId contra HMd y de MIm y MId contra MMm.

Para incluir en los análisis descriptivos a las muestras en las que un elemento traza se encontró por debajo del límite de detección (MDL), se les asignó una concentración aleatoria por debajo del MDL específico para cada elemento y por encima de cero (Helsel, 2006). Cuando más del 50% de las muestras presentaron concentraciones de algún elemento traza por debajo de su MDL, esta información no fue tomada en cuenta para los análisis estadísticos (Dehn *et al.*, 2006).

La normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos se estimó mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Barlett (Zar, 1999). Las diferencias entre el estadio de madurez en hembras (HId vs. HMd) y entre sexos en tiburones maduros (HMd vs. MMm) se estimaron mediante pruebas paramétricas (t de Student) o no paramétricas (U de Mann-Whitney). Diferencias entre sexos en tiburones inmaduros (HId vs. MId vs. MIm) y entre estadios de madurez (MId vs. MIm vs. MMm) se estimaron a través de ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis. Se realizaron pruebas a posteriori o de comparaciones múltiples (Prueba de Tukey) para determinar diferencias entre los grupos comparados (Zar, 1999). El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha \leq 0.05$.

Se realizaron correlaciones para determinar si existe una relación entre la LT del tiburón azul y la concentración de los elementos traza. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar el patrón de distribución basado en la concentración de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo. Los MMm no fueron incluidos en el análisis (Clarke y Warwick, 2001) debido a que no se midieron todas las variables analizadas. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar (SE).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistica 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Se utilizó el software Sigma plot 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA) para generar las gráficas.

6.4.2 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón de tiburón azul

Los datos fueron agrupados en cuatro categorías: hembras inmaduras (HI_d), hembras maduras (HM_d), machos inmaduros de diciembre (MI_d) y machos inmaduros de mayo (MI_m). Para determinar las diferencias entre sexos se compararon las HI contra los MI_d y MI_m. Las diferencias entre estadio de madurez se analizaron mediante la comparación entre HM_d y HI_d.

Se estimó la normalidad y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Barlett (Zar, 1999). Las comparaciones por sexo y estadio de madurez se realizaron mediante los métodos paramétricos (ANOVA y t de Student) y no paramétricos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney). Se realizaron comparaciones múltiples (Tukey o prueba de comparaciones múltiples) para determinar diferencias entre los grupos comparados. Las comparaciones entre tejidos se realizaron mediante métodos paramétricos (t de Student) y no paramétricos (Mann-Whitney). El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha \leq 0.05$.

Se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman para determinar la relación entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo (Clarke y Warwick, 2001). Se realizó una prueba para determinar la presencia de casos extremos (*outliers*, prueba de Grubbs); se repitieron los análisis estadísticos mencionados anteriormente (comparaciones paramétricas, no paramétricas y correlaciones de Spearman), excluyendo a los organismos identificados como *outliers* por la prueba de Grubbs. Los resultados fueron expresados como promedio \pm SE.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistica 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Se utilizó el software Sigma plot 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA) para generar las gráficas.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

6.4.3 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de Calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Se estimó la normalidad y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Barlett (Zar, 1999). Las comparaciones entre tejidos se realizaron mediante métodos paramétricos (t de Student) y no paramétricos (Mann-Whitney). El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha \leq 0.05$. Se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman para determinar la relación existente entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo (Clarke y Warwick, 2001). Se realizó una prueba para determinar la presencia de organismos *outliers* (prueba de Grubbs); se repitieron los análisis estadísticos mencionados anteriormente, excluyendo a los organismos identificados como *outliers* por la prueba de Grubbs. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm SE.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistica 8.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Se utilizó el software Sigma plot 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, USA) para generar las gráficas.

6.4.4 Elementos traza en calamar y langostilla como presas del tiburón azul

Mediante Métodos paramétricos (ANOVA y t de Student) y no paramétricos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney) se determinaron diferencias entre la concentración de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo. En músculo se realizaron comparaciones entre el tiburón, el calamar y la langostilla, y para el hígado entre el tiburón azul y el calamar.

7 RESULTADOS

7.1 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul

Se obtuvieron muestras de músculo de 44 tiburones en un intervalo de tallas de 117 a 269 cm LT (187.4 ± 39.9 cm). De los organismos muestreados, 11 fueron clasificados como HIId (167.3 ± 28.1 cm), 9 HMd (209.4 ± 5.4 cm), 9 MIId (141.7 ± 16.2 cm) y 6 MIm (194.3 ± 44.3 cm) y 9 MMm (231.3 ± 20.1 cm) (Fig. 5).

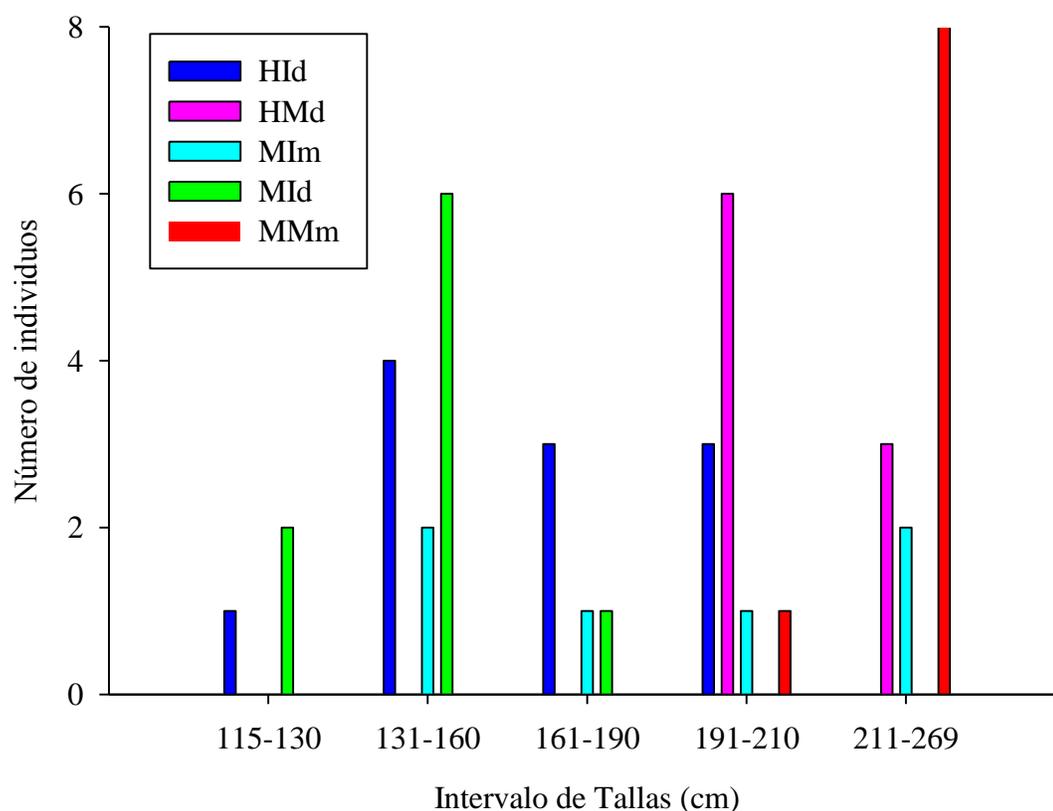


Figura 5. Intervalo de tallas de los tiburones azules (*Prionace glauca*, n=44) colectados en Punta Belcher, Baja California Sur de los cuales se colectaron muestras de músculo. HIId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre; HMd: Hembras maduras colectadas en diciembre; MIm: Machos inmaduros colectados en mayo; MIId: Machos inmaduros colectados en diciembre; MMm: Machos maduros colectados en mayo.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Los resultados de las concentraciones de los elementos esenciales Cu, Zn, Fe, Se y de los elementos no esenciales Cd, Pb, Hg, As y Ag en el músculo del tiburón azul se presentan en la Tabla II en base húmeda (ww) y en el anexo I en peso seco (dw).

Tabla II. Concentraciones de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en músculo del tiburón azul (*Prionace glauca*).

	HId	HMd	MIm	MIId	MMm	Tiburón azul
Hg	0.76±0.09 ^{‡,*}	0.99±0.08 ^I	1.29±0.32 ^{‡a}	0.58±0.05 ^{*b}	1.69±0.18 ^{IIa}	1.03±0.08
Se	0.24±0.02	0.21±0.03	0.17±0.02	0.28±0.03	0.21±0.02	0.22±0.02
As	5.76±0.68	7.15±0.97	7.47±2.11	4±0.68	9.38±1.35	6.66±0.55
Ag	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Cu	1.61±0.29 ^{‡,*}	2.05±0.2	0.83±0.07 [*]	1.80±0.19 [‡]	NA	1.64±0.13
Fe	25.57±4.35	33.14±10.8	24.25±6.37	25.97±6.47	NA	27.39±3.57
Zn	6.06±0.25	7.56±1.16	5.24±0.47	5.28±0.26	NA	6.10±0.37
Cd	0.59±0.37	0.02±0.01	<MDL	<MDL	NA	0.2±0.12
Pb	0.07±0.02	0.09±0.2	<MDL	<MDL	NA	<MDL

Los datos se presentan como promedio \pm SE HId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); HMd: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); MIm: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 6); MIId: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9). MMm: Machos maduros colectados en mayo (n: 9). Números romanos diferentes denotan diferencias significativas entre sexos ($p < 0.05$). Letras diferentes denotan diferencias entre estadios de madurez. ($p < 0.05$). MDL: Límite mínimo de detección. NA: No se midió.

Las concentraciones de Ag, Cd y Pb estuvieron por debajo del límite de detección (MDL) en más del 50% de las muestras del tiburón azul. Las concentraciones de Cd y Pb en machos inmaduros (MIm y MIId) se encontraron por debajo del MDL. La concentración de Hg fue menor en MIId que en MIm ($p = 0.02$) y menor que en MMm ($p < 0.003$) (Tabla II). La concentración de Cu fue menor en MIm que en MIId ($p = 0.002$) (Tabla II). En tiburones maduros, la concentración de Hg fue mayor en MMm que en HMd ($t_{0.05 (2) 16} = -3.43$; $p = 0.005$).

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) por sexo ni por estadio de madurez en la actividad de las enzimas CAT, SOD, GPx, GR y GST en músculo de tiburón

azul (Fig. 6). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) por sexo ni por estadio de madurez en la producción de $O_2^{\cdot-}$ ni en la concentración de TBARS en músculo de tiburón azul (Fig. 7). Los niveles de carbonilos proteicos fueron mayores en MIm que en HId ($p = 0.004$) (Fig. 7).

Se observó una relación lineal ($R^2 = 0.64$, $p < 0.001$) y exponencial ($R^2 = 0.7$, $p < 0.001$) significativa entre la concentración de Hg y la LT en el músculo de los tiburones (Fig. 8). Los análisis de PCA generaron 3 componentes principales (CP), los cuales explican el 50% de la variabilidad de los datos (20.2%, 16.5% y 13,4% respectivamente), con eigen-valores > 1.5 (Fig. 9). El peso de los factores (≥ 0.6) representa las variables que están correlacionadas en el CP, explicando la contribución de la varianza en los datos: 1) producción de $O_2^{\cdot-}$, concentración de Hg y As y 2) actividad de las enzimas GR, SOD, GST y concentración de TBARS.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

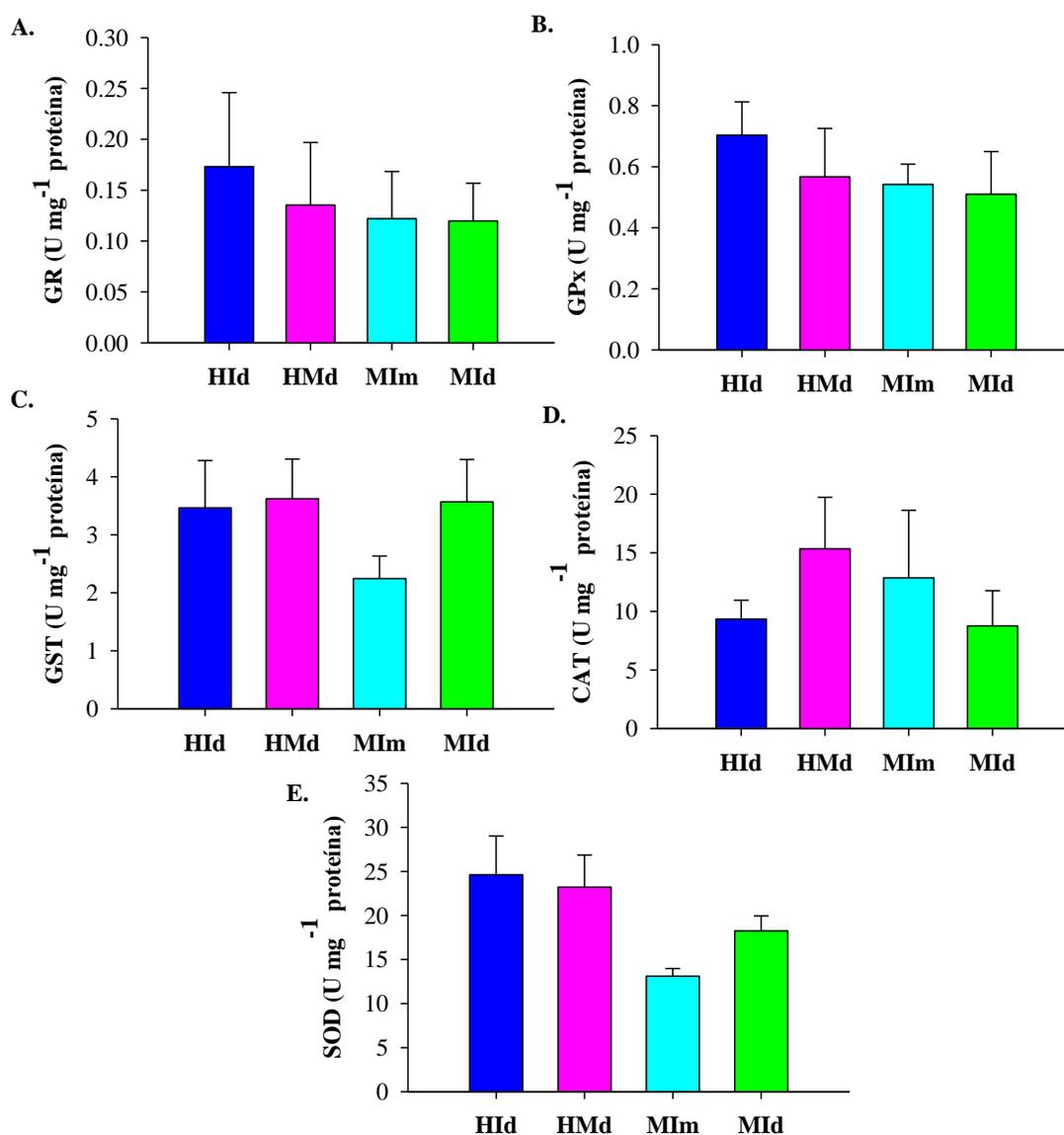


Figura 6. Actividad de las enzimas antioxidantes (U mg⁻¹ proteína) en músculo de tiburón azul (*Prionace glauca*) por grupos. A. GR: Glutación reductasa; B. GPx: Glutación peroxidasa; C. GST: Glutación S-transferasa; D. CAT: Catalasa; E. SOD: Superóxido dismutasa. Los datos se presentan como promedio \pm SE. HIId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); HMd: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); MIm: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 11); MIId: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9); MMm: Machos maduros colectados en mayo (n: 9).

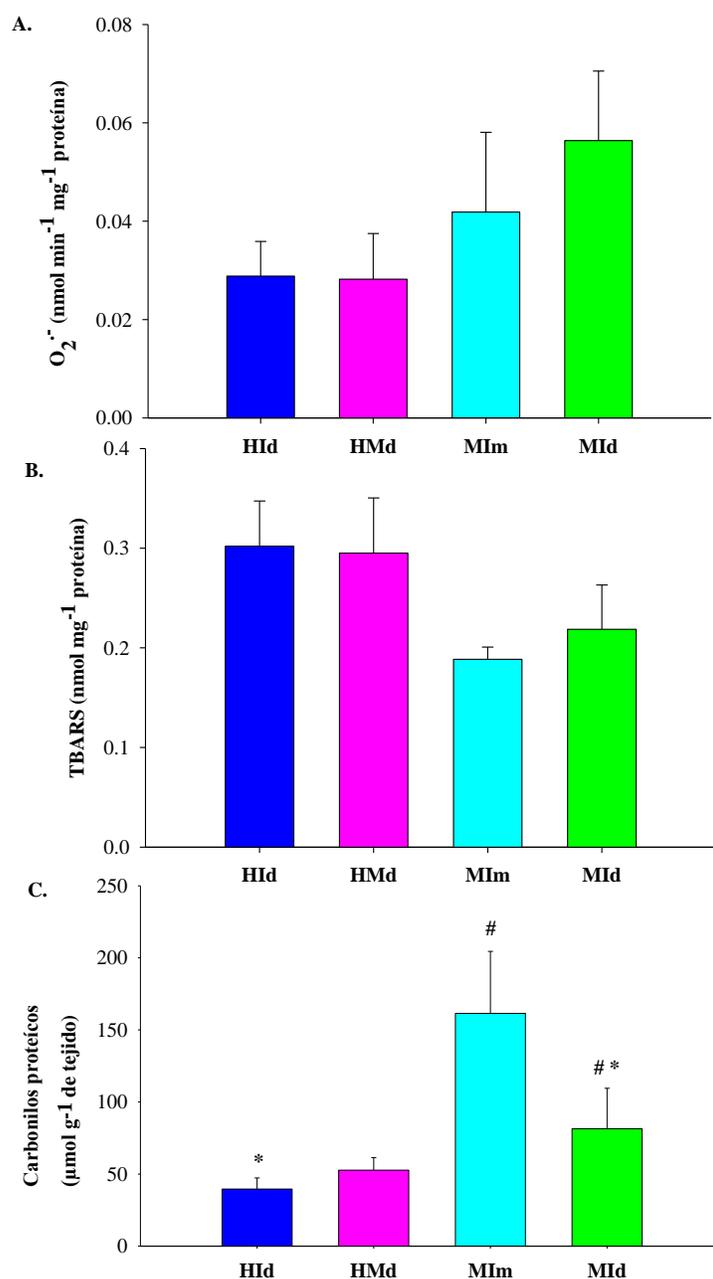


Figura 7. **A.** Tasa de producción del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). **B.** Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol mg^{-1} proteína). **C.** Niveles de carbonilos proteicos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido) (*Prionace glauca*). Los datos se presentan como promedio \pm SE. HIId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); HMd: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); MIm: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 11); MId: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9); MMm: Machos maduros colectados en mayo (n: 9). Símbolos diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre sexos en tiburones inmaduros: HI vs MId vs MIm.

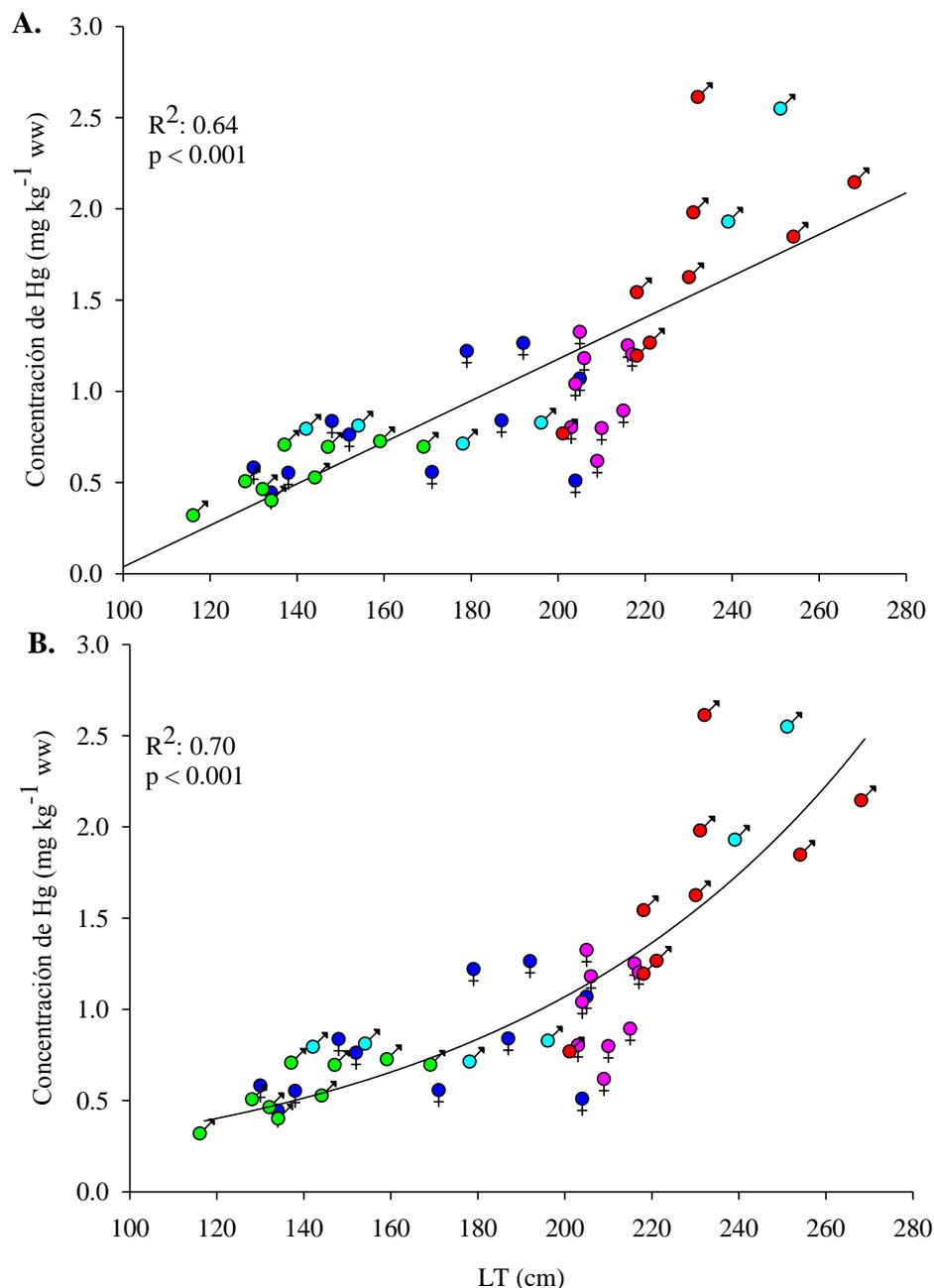


Figura 8. **A.** Relación lineal, **B.** relación exponencial de la concentración de Hg ($\text{mg kg}^{-1} \text{ ww}$) con la longitud total (LT, cm) del tiburón azul (*Prionace glauca*) colectado en Punta Belcher Baja California Sur. •Hf: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); •Hm: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); •Mf: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 11); •Md: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9). •Mm: Machos maduros colectados en mayo (n: 9).

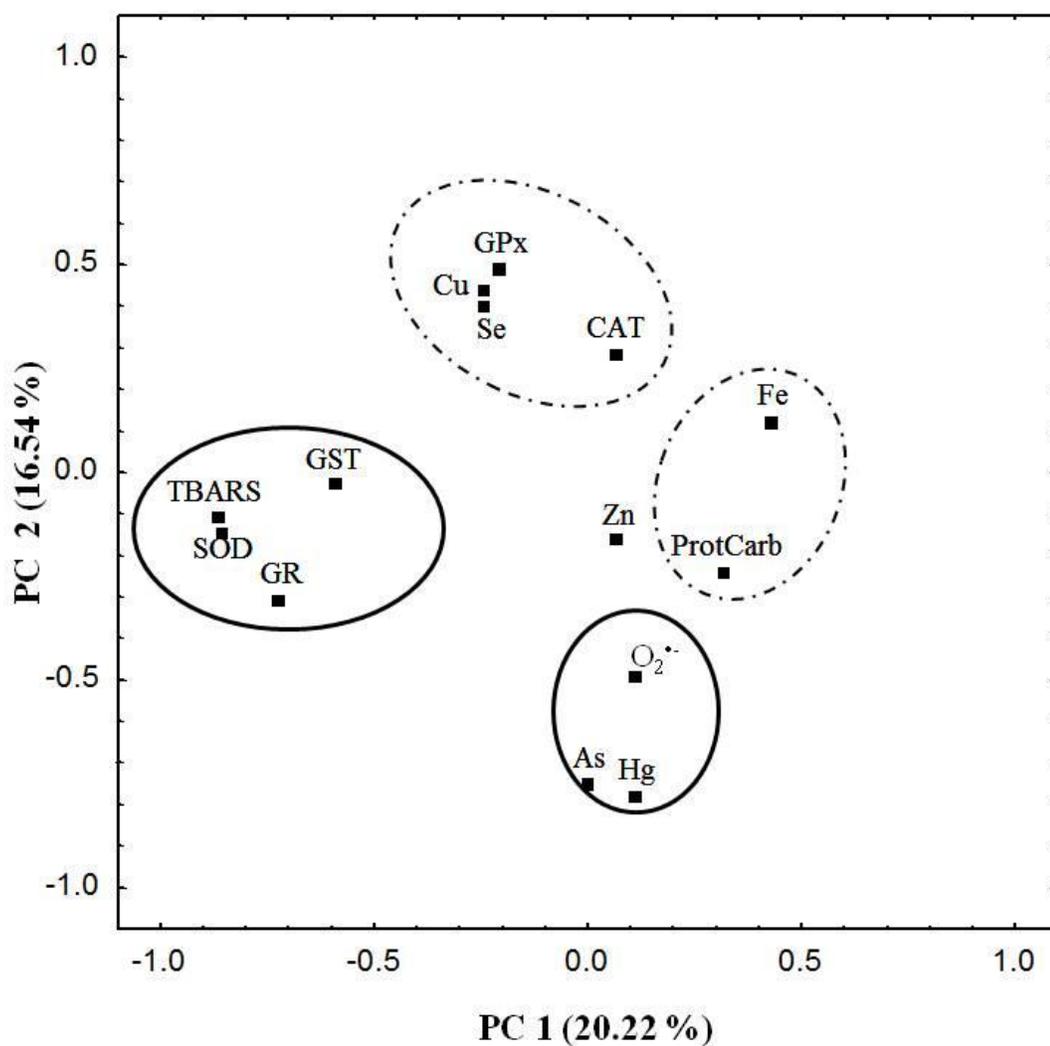


Figura 9. Peso de los factores de los dos componentes principales (CP) que explican la variabilidad del 50% de los datos. Línea = Peso de los factores > 0.6; guiones = pesos de los factores 0.03 - 0.6. GR: glutatión reductasa; GST: glutatión S-transferasa; GPx: glutatión peroxidasa; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; ProtCarb: carbonilos proteicos; O₂^{•-}: radical superóxido.

7.2 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón de tiburón azul

Se emplearon los mismos organismos muestreados previamente mencionados, a excepción de los MMm. Se analizaron las muestras de hígado y riñón de un total de 35 tiburones en un intervalo de tallas de 117 a 252 cm LT (176.2 ± 29.8 cm). De los organismos analizados, 11 fueron HI, 9 HM, 9 MI y 6 MIm (Fig. 10).

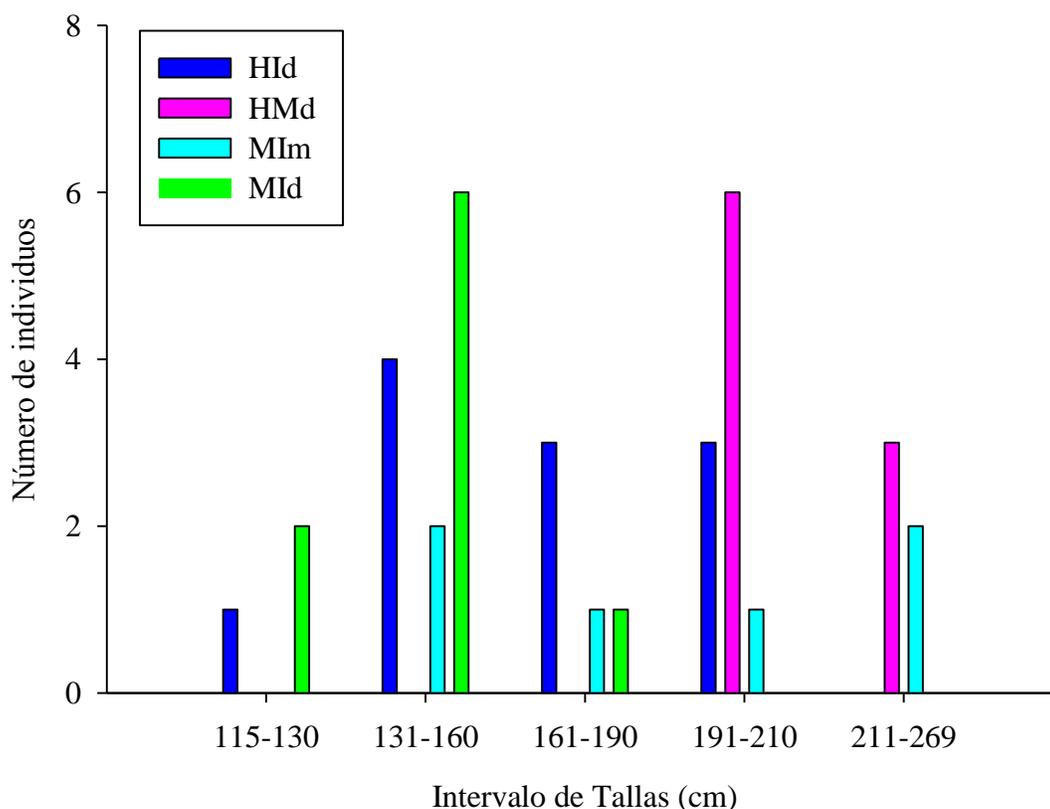


Figura 10. Intervalo de tallas de los tiburones azules (*Prionace glauca*, n=35) colectados en Punta Belcher, Baja California Sur de los cuales se colectaron muestras de hígado y riñón. HI: Hembras inmaduras colectadas en diciembre; HM: Hembras maduras colectadas en diciembre; MIm: Machos inmaduros colectados en mayo; MI: Machos inmaduros colectados en diciembre; MM: Machos inmaduros colectados en mayo.

Los resultados de las determinaciones de las concentraciones de los elementos esenciales Cu, Zn, Fe, Se y de los elementos no esenciales Cd, Pb, Hg, As y Ag en hígado y riñón del tiburón azul se presentan en la Tabla III en base húmeda (ww) y en el anexo I en

peso seco (dw). Las concentraciones de Ag en todos los organismos se encontraron por debajo del MDL. Las concentraciones de Pb en el 50% de los MIm se observaron por debajo de MDL.

Tabla III. Concentración de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en hígado y riñón del tiburón azul (*Prionace glauca*).

Tejido	HIId	HMDd	MIm	MIId	Tiburón	
Hígado	Hg	0.15±0.03	0.18±0.03	0.65±0.38	0.12±0.03	0.22±0.06 ^I
	Se	1.5±0.13	1.42±0.18	2.07±0.43	2.04±0.19	1.67±0.11
	As	9.74±0.073	11.01±1.54	14.71±4.24	9.07±0.8	10.62±0.83 ^I
	Cu	7.65±1.2	5.62±0.94	18.12±5.43	9.04±3.04	9.28±1.44
	Zn	38.95±2.7 [‡]	41.84±4.02	87.85±19.33*	46.23±3.86 ^{‡*}	49.94±4.65 ^I
	Fe	163.35±14.12	234.68±43.2	247.7±54.61	161.55±13.35	195.67±16.19
	Cd	22.91±2.61 [‡]	30.77±5.25	74.08±21.33	26.63±5.1	34.66±5.08 ^I
	Pb	0.47±0.13	0.29±0.09	<MDL	0.36±0.09	0.37±0.06 ^I
Riñón	Hg	0.24±0.05	0.4±0.08	0.81±0.34	0.31±0.04	0.38±0.06 ^I
	Se	1.69±0.18	1.75±0.15	1.32±0.13	2.25±0.48	1.84±0.16
	As	2±0.36	2.59±0.31	24.76±22.21	2.13±0.37	5.14±2.93 ^{II}
	Cu	8.72±0.72	7.57±0.83	8.09±1.49	8.17±0.83	8.17±0.45
	Zn	59.2±1.05	61.76±2	69.16±11.6	58.07±2.03	61.27±2.13 ^{II}
	Fe	160.69±11.48	175.79±21.88	201.66±41.33	215.55±45.99	185.7±15.27
	Cd	4.81±0.54	6.79±1.17	13.74±6.47	4.19±0.56	6.68±1.24 ^{II}
	Pb	1.49±0.07	1.41±0.09	0.96±0.15	1.55±0.11	1.39±0.06 ^{II}

Los datos se expresan como promedio \pm SE. HIId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); HMDd: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); MIm: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 11); MIId: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9). MMm: Machos maduros colectados en mayo (n: 9). Diferencias significativas ($p < 0.05$) se denotan con diferentes números romanos (tejidos), símbolos (sexo en tiburones inmaduros) y letras (estado de madurez en tiburones hembras). MDL = Concentración por debajo del límite de detección.

En el hígado se encontró una mayor actividad de CAT ($U_{0.05} (2)_{33,34} = 53$; $p < 0.001$), y concentración de TBARS ($U_{0.05} (2)_{31,34} = 4$; $p < 0.001$), As ($U_{0.05} (2)_{34,30} = 0$; $p < 0.001$) y Cd

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

($U_{0.05} (2)_{33,32} = 17$; $p < 0.001$) que en el riñón. En el hígado se observó una menor actividad de SOD ($U_{0.05} (2)_{32,34} = 311$; < 0.001) y concentración de Hg ($U_{0.05} (2)_{33,33} = 244$; < 0.001), Zn ($U_{0.05} (2)_{34,34} = 219$; < 0.001) y Pb ($U_{0.05} (2)_{35,35} = 49$; < 0.001) en comparación con el riñón (Tabla IV).

Tabla IV. Indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón del tiburón azul (*Prionace glauca*). Actividad de las enzimas antioxidantes ($U \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$), tasa de producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$, $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$), concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína}$), niveles de carbonilos proteicos ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ tejido}$).

Tejido	Variable	HId	HMd	MIm	MId	Tiburón
Hígado	GR	1.25±0.35	1.92±0.4	0.69±0.24	1.77±0.46	1.48±0.21
	GPx	0.81±0.14 ^a	1.74±0.28 ^b	1.02±0.41	1.38±0.44	1.23±0.17
	GST	44.67±11.94	35.73±18.49	14.7±4.92	16.04±7.07	30.32±6.78
	CAT	233.29±68.78	315.67±59.66	506.69±268.17	236.34±34.71	296.11±48.91
	SOD	685.77±240.84	1393.42±516.72	26.85±11.75	490.14±191.11	724.4±178.56
	PC	116.05±14	99.3±24.75	180.15±48.63	100.69±17.14	116.97±11.88
	TBARS	2.98±0.67	6.9±2.99	4.38±2.07	6.86±2.28	5.251.08I
	$O_2^{\cdot-}$	0.10±0.03	0.18±0.09	0.24±0.07	0.10±0.04	0.14±0.03
Riñón	GR	1.16±0.15	1.13±0.22	0.98±0.16	1.48±0.26	1.21±0.11
	GPx	0.74±0.15	0.9±0.17	1.09±0.16	0.8±0.08	0.85±0.07
	GST	10.51±2.3	15.32±1.65	11.62±14.91	10.07±1.5	11.82±1.18
	CAT	17.22±4.1 ^a	31.4±5.21 ^b	27.67±5.09	19.95±4.91	23.23±2.57II
	SOD	739.18±147.23	951.67±166.73	640.95±153.98	989.27±146.77	847.18±79.21II
	PC	135.64±16.54	110.51±21.96	92.33±12.56	131.3±22.51	121.47±10.17
	TBARS	0.25±0.03	0.32±0.03	0.3±0.03	0.32±0.03	0.29±0.02II
	$O_2^{\cdot-}$	0.08±0.01	0.22±0.15	0.06±0.02	0.07±0.02	0.11±0.04

HId: Hembras inmaduras colectadas en diciembre (n: 11); HMd: Hembras maduras colectadas en diciembre (n: 9); MIm: Machos inmaduros colectados en mayo (n: 11); MId: Machos inmaduros colectados en diciembre (n: 9). GR: Glutación reductasa; GST: glutación S-transferasa; GPx: glutación peroxidasa; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa. Los datos se presentan como promedio ± SE. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se denotan con diferentes números romanos (tejidos), símbolos (sexo en tiburones inmaduros) y letras (estado de madurez en tiburones hembras).

Las concentraciones de Hg en hígado fueron menores en MIId que en MIm ($p = 0.034$) (Tabla III). Las hembras inmaduras presentaron menor concentración de Zn ($p = 0.016$) y Cd ($p = 0.013$) que los MIm. La actividad de GPx fue mayor en HMd que en HIId ($t_{0.05 (2) 20} = -3.15$; $p = 0.005$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en el hígado por sexo y estadio de madurez en la producción de $O_2^{\bullet-}$ ni en la concentración de TBARS y carbonilos proteicos. En el riñón, las hembras presentaron mayor actividad de CAT en HMd que en HIId ($U_{0.05 (2) 11,9} = 15$; $p = 0.008$); mientras que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) ni por sexos ni por estadio de madurez en la concentración de los elementos traza, en la producción de $O_2^{\bullet-}$, ni en la concentración de TBARS y carbonilos proteicos (Tabla IV).

El análisis de Grubbs identificó dos organismos con valores extremos (*outliers*) en el grupo de los MIm, grupo en el cual se presentaron las tallas más grandes (240 y 252 cm TL). Se realizaron nuevamente las pruebas estadísticas sin estos organismos, y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de Hg entre MIId y MIm del hígado, ni en la concentración de Cd entre las HIId y los MIm.

Se encontraron correlaciones entre a) la concentración de los elementos traza, b) los indicadores de estrés oxidativo y c) elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón del tiburón azul (Tabla V). Las correlaciones persistentes entre las variables, tanto en presencia como en ausencia de los *outliers*, fueron las siguientes: En el hígado, la actividad de GR con la actividad SOD; actividad de GST con la concentración de As; actividad de SOD con la concentración de carbonilos proteicos y la producción de $O_2^{\bullet-}$; la concentración de Zn y de Cd. En el riñón, la actividad de SOD y la concentración de TBARS; la concentración de carbonilos proteicos y de As; las concentración de Cu y As y la concentración de Cu y de Cd (Tabla V).

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Tabla V. Coeficiente de correlación de Spearman calculado con y sin los organismos considerados como *outliers* entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo en el hígado y riñón del tiburón azul (*Prionace glauca*). La correlación se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

	Variables	GR	GPx	GST	SOD	PC	TBARS	Hg	As	Se	Zn
Hígado	GPx	0.55									
	SOD	0.44									
	O ₂ ⁻	-0.7*			-0.5						
					-						
					0.73*						
	PC		-0.48		-0.52						
					-						
	TBARS		0.64*	0.59*	0.68*						
	As			0.51				0.48			
	Fe			0.68*		0.6	-0.76*				
Cd								0.51	0.57	0.80	
Zn								0.51	0.52	0.83*	
Riñón	TBARS	0.57	0.58		0.50						
					0.68*						
	As		0.67*			0.45				0.78	
						0.6*				*	
	Se		0.72*					0.6*			
	Cu					0.57					
	Fe	-0.58*				0.71*					
	Cd				0.64*		0.62*		0.52		
Zn								0.61*			
Pb		0.58*						0.43			

GR: Glutación reductasa; GPx: glutación peroxidasa; GST: glutación S-transferasa; SOD: superóxido dismutasa; O₂⁻: radical superóxido; PC: carbonilos proteicos. * correlación de Spearman sin *outliers*.

7.3 Presas del tiburón azul

7.3.1 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Se capturaron 14 calamares gigantes en un intervalo de tallas de 66 a 77cm (72 ± 2.83 cm) de longitud del manto (LM). El análisis de Grubbs identificó tres organismos con valores extremos (*outliers*) en sus variables. Se realizaron las pruebas estadísticas sin estos organismos, y no se encontraron diferencias significativas en la concentración de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo.

La concentración de los elementos traza Cu, Zn, Fe, Cd, Se, Pb y Hg, la actividad de GST y de CAT y la producción de $O_2^{\bullet-}$ fueron mayores en hígado que en músculo de calamar (Tabla VI y Figuras 11 y 12). Mientras que la actividad de GPx y la concentración de TBARS fueron mayores en músculo que en hígado (Figuras 11 y 12). No se encontraron diferencias significativas entre tejidos en la actividad de SOD y la de GR, ni en la concentración de carbonilos proteicos (Tabla VI y Figuras 11 y 12).

Tabla VI. Diferencias estadísticas entre tejidos de calamar (*Dosidicus gigas*).

Variable	U Mann–Whitney	P valor	Diferencia
Cu	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
Zn	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
Fe	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
Cd	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
Pb	$U_{0.05(2) 14,14} = 16$	< 0.001	Hígado > Músculo
Se	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
Hg	$U_{0.05(2) 14,14} = 25$	< 0.001	Hígado > Músculo
GST	$U_{0.05(2) 14,14} = 0$	< 0.001	Hígado > Músculo
CAT	$U_{0.05(2) 11,14} = 12$	< 0.001	Hígado > Músculo
$O_2^{\bullet-}$	$U_{0.05(2) 14,14} = 30$	0.001	Hígado > Músculo
GPx	$U_{0.05(2) 14,14} = 40$	0.006	Músculo > Hígado
TBARS	$U_{0.05(2) 14,14} = 6$	0.052	Músculo > Hígado
SOD	$U_{0.05(2) 14,14} = 81$	0.45	Músculo = Hígado
GR	$U_{0.05(2) 14,14} = 92$	0.8	Músculo = Hígado
Carbonilos proteicos	$U_{0.05(2) 14,14} = 89$	0.7	Músculo = Hígado

GR: Glutación reductasa; GPx: glutación peroxidasa; GST: glutación S-transferasa; SOD: superóxido dismutasa; $O_2^{\bullet-}$: radical superóxido; PC: carbonilos proteicos.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

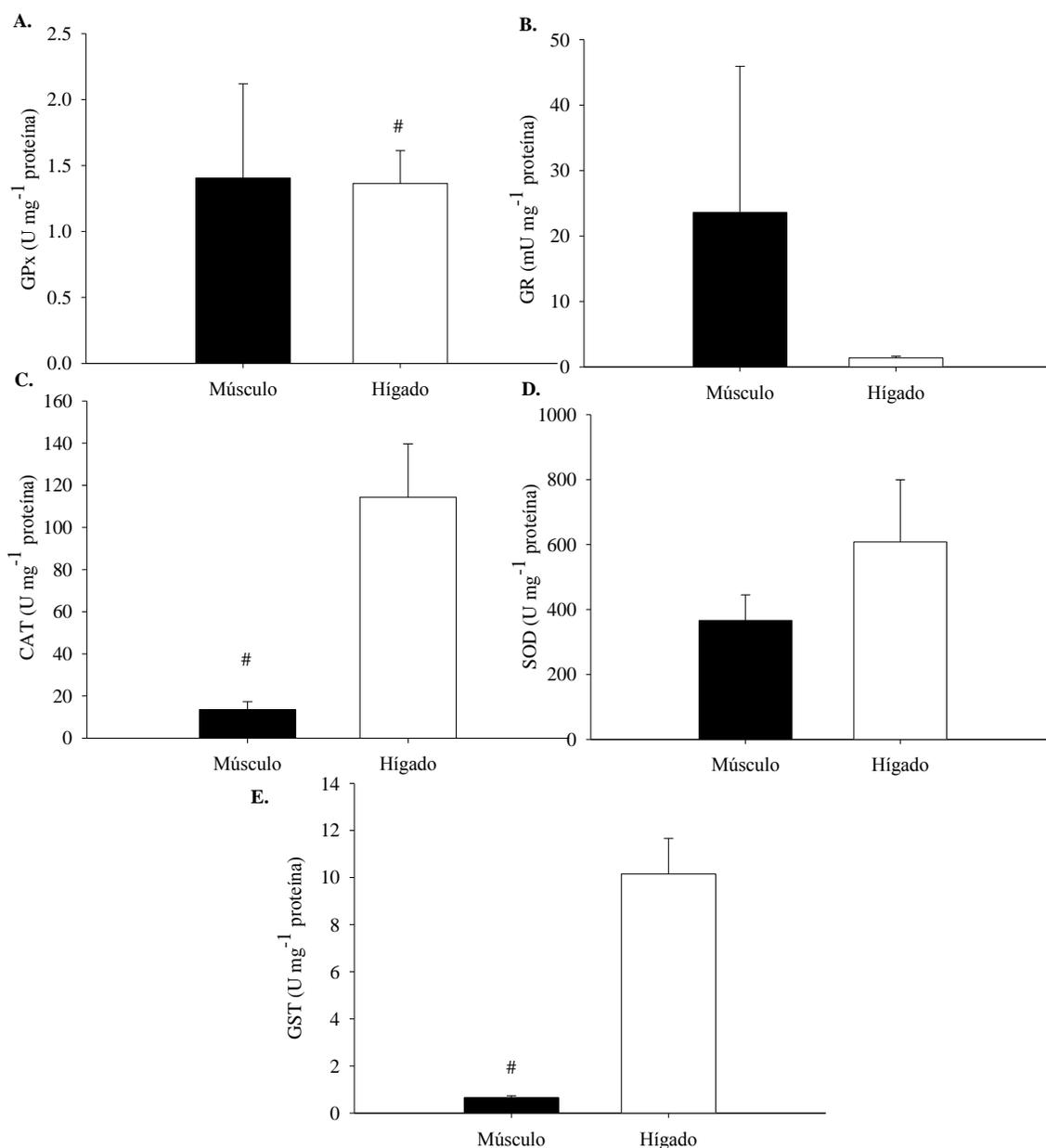


Figura 11. Actividad de las enzimas antioxidantes (U mg⁻¹ proteína) en músculo (n:14) e hígado (n:14) de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). **A.** GPx: glutatión peroxidasa; **B.** GR: glutatión reductasa; **C.** CAT: catalasa (músculo 11); **D.** SOD: superóxido dismutasa; **E.** GST: glutatión S-transferasa. Los datos se presentan como promedio ± SE. El símbolo # denota las diferencias significativas (p<0.05) entre tejidos de calamar.

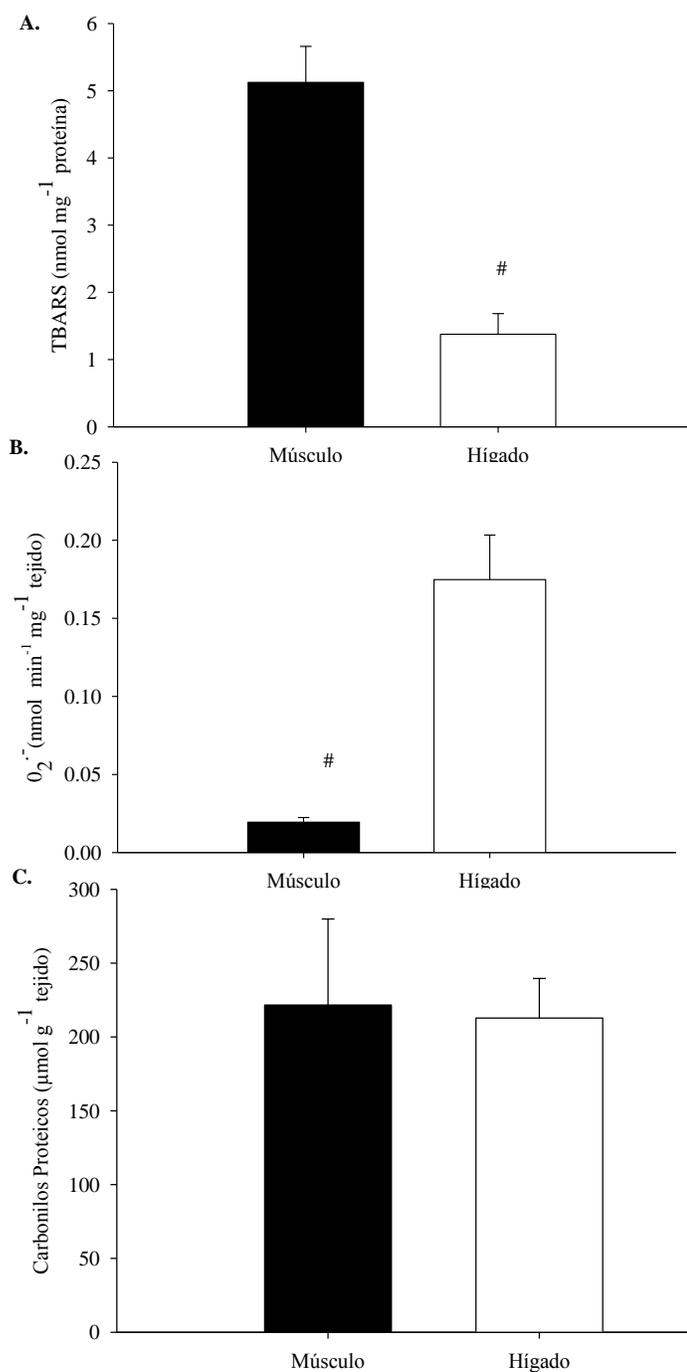


Figura 12. A. Tasa de producción del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). B. Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol mg^{-1} proteína). C. Niveles de carbonilos proteicos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de tejido) en músculo (n: 14) e hígado (n:14) de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos se presentan como promedio \pm SE. El símbolo # denota diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tejidos de calamar.

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Se analizaron las potenciales correlaciones entre: a) la concentración de los elementos traza, b) los indicadores de estrés oxidativo y c) elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado del calamar gigante (Tabla VII). En el músculo se observaron correlaciones entre, la concentración de Cu - Zn, Cu - Cd, Cd - Zn y Hg - Pb; concentración de Hg y Pb – carbonilos proteicos; actividad de GR - GPx; una correlación negativa entre la actividad de SOD y la de GPx - la concentración de TBARS y la producción de $O_2^{\cdot-}$ - la concentración de TBARS. En hígado de calamar se observó una correlación entre la concentración de Cu - Fe, Cu - Cd y una correlación negativa entre la concentración de Fe y carbonilos proteicos (Tabla VII).

Tabla VII. Coeficiente de correlación de Spearman calculado entre los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo en el músculo (n: 11) e hígado (n: 11) del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). La correlación se considera significativa cuando $p < 0.05$.

Tejidos	VARIABLES	Cu	Zn	Hg	PC	TBARS	GPx
Músculo	Zn	0.92					
	Cd	0.83	0.83				
	Hg				0.65		
	Pb			0.66	0.81		
	SOD					-0.71	
	GPx					-0.85	
	$O_2^{\cdot-}$					-0.79	
	GR						0.66
Hígado	Fe	0.68			-0.82		
	Cd	0.71					

GR: Glutación reductasa; GPx: glutación peroxidasa; GST: glutación S-transferasa; SOD: superóxido dismutasa; $O_2^{\cdot-}$: radical superóxido; PC: carbonilos proteicos.

7.3.2 Elementos traza en calamar y langostilla como presas del tiburón azul

En músculo, las concentraciones de Zn y Cd son significativamente más altas ($p < 0.001$) en el calamar y la langostilla que aquellas observadas en el tiburón azul (Tabla VIII); mientras que las concentraciones de Cu son mayores en la langostilla que en el calamar ($p < 0.001$) y el tiburón ($p < 0.001$). En músculo, las concentraciones de Fe son similares entre la langostilla y el tiburón azul ($p > 0.05$), y son mayores en el tiburón que en el calamar ($p < 0.001$). Las concentraciones de Pb y Se son similares en el tiburón azul y el

calamar, y en la langostilla se encontraron por debajo del MDL. Finalmente, en músculo, las concentraciones de Hg son mayores en el tiburón azul con respecto al calamar ($p < 0.001$) y la langostilla ($p < 0.001$).

Tabla VIII. Concentraciones de los elementos traza (mg kg^{-1} ww) en músculo (n: 44) e hígado (n: 35) del tiburón azul (*Prionace glauca*), músculo (n: 14) e hígado (14) del calamar (*Dosidicus gigas*) y langostilla (*Pleuroncodes planipes*) (n: 28, 14(Hg, Se)).

	Músculo			Hígado	
	Tiburón	Calamar	Langostilla [^]	Tiburón	Calamar
	Músculo			Hígado	
Cu	1.64±0.13 ^a	4.29±0.68 ^{# a}	14.05±0.15 ^b	9.28±1.44 ^a	361.12±22.04 ^b
Fe	27.39±3.57 ^a	2.37±0.35 ^{# b}	34.93±0.44 ^a	195.67±16.19 ^a	49.66±3.71 ^b
Zn	6.1±0.37 ^a	13.84±1.11 ^{# b}	16.2±0.06 ^b	49.94±4.65 ^a	572.11±109.85 ^b
Cd	0.2±0.12 ^a	1.53±0.27 ^{# b}	2.79±0.04 ^b	34.66±5.08 ^a	207.66±30.81 ^b
Pb	0.09±0.01	0.08±0.01 [#]	MDL	0.37±0.06	0.24±0.03
Hg	1.03±0.08 ^a	0.07±0.01 ^{# b}	0.007±0.0004 ^b	0.22±0.06	0.13±0.02
Se	0.22±0.02	0.27±0.03	NA	1.67±0.11 ^a	5.59±0.98 ^b

Los datos se presentan como promedio \pm SE. [^] Muestra homogenizada. [#] El símbolo denota diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tejidos de calamar; letras denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre especies. MDL: Debajo del límite de detección. NA: No se midió.

En el hígado las concentraciones de Cu ($U_{0.05(2) 35,14} = 0$; $p < 0.001$), Zn ($U_{0.05(2) 35,14} = 4$; $p < 0.001$), Cd ($U_{0.05(2) 35,14} = 4$; $p < 0.001$) y Se ($U_{0.05(2) 30,14} = 43$; $p < 0.001$) fueron significativamente mayores en el calamar que en el tiburón. Mientras que las concentraciones de Fe ($U_{0.05(2) 35,14} = 0$; $p < 0.001$) son mayores en el tiburón azul que en el calamar. Por último, las concentraciones de Pb ($U_{0.05(2) 35,14} = 227$; $p = 0.69$) y Hg ($U_{0.05(2) 34,14} = 209$; $p = 0.051$) son semejantes entre las dos especies (Tabla VIII).

8 DISCUSIÓN

8.1 Concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en los diferentes tejidos del tiburón azul, *Prionace glauca*

8.1.1 Comparaciones entre tiburones azules a nivel mundial

El tiburón azul es una especie objetivo de las pesquerías mundiales y es importante para el consumo humano. Es por ello que los estudios en esta especie se han enfocado principalmente a la determinación de Hg en músculo e hígado. En Baja California Sur, Maz-Courrau y López-Vera (2006) y Escobar-Sánchez *et al.* (2011) reportaron concentraciones de Hg para el tiburón azul en músculo (0.82 ± 0.34 y 1.39 ± 1.58 mg kg⁻¹, respectivamente) dentro del intervalo de los valores encontrados en el presente estudio. Sin embargo, en los tiburones azules en el Atlántico Norte se reportan concentraciones de hasta 2.5 mg Hg kg⁻¹ww en músculo y 2.2 mg Hg kg⁻¹ww en hígado (Branco *et al.*, 2004; Branco *et al.*, 2007) (Anexo 2).

En Inglaterra, Vas (1991) reportó para tiburón azul concentraciones menores de Cu (0.24 mg kg⁻¹), Fe (6.34 mg kg⁻¹), y Pb (<0.02 mg kg⁻¹) (Anexo 2), pero concentraciones mayores de Cd (0.45 mg kg⁻¹ ww) a las observadas en el presente estudio en casi todas las categorías de sexo y estadio de madurez, con excepción de los MI (0.6 mg Cd kg⁻¹ ww). En hígado de tiburón azul, Vas (1991) reportó concentraciones de Pb que son 13 veces mayores, pero concentraciones de Cu, Fe y Cd, 4, 22 y 64 veces menores, respectivamente, a las concentraciones encontradas en el presente estudio. No se tienen reportes anteriores de las concentraciones de los elementos traza cuantificados en el riñón del tiburón azul (Anexo 2).

McMeans *et al.* (2007) sugieren que la diferencia en las concentraciones de los elementos esenciales (e.g. Cu, Zn, Se) en el tiburón azul en localidades separadas, se debe a requerimientos fisiológicos específicos de la especie o a que la regulación de estos elementos no es eficiente. Las diferencias en las concentraciones de los elementos no

esenciales (e.g. Hg, Cd, As) se puede deber a diferencias en la exposición ambiental a estos elementos entre localidades (McMeans *et al.*, 2007; Storelli *et al.*, 2011). Las concentraciones de Pb ($1.14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$) encontradas por Vas (1991) se atribuyen a la contaminación antropogénica presente en aguas británicas, mientras que en Baja California Sur se ha considerado como una zona prístina (Rodríguez-Meza *et al.*, 2009).

8.1.2 Comparaciones del tiburón azul con otras especies de tiburones a nivel mundial

Las concentraciones de Hg encontradas en este trabajo para tejidos de tiburón azul son semejantes a las reportadas para otras especies (Anexo 2). Sin embargo, se han reportado concentraciones más elevadas de Hg en músculo de otras especies de tiburones comparadas con las del tiburón azul: *Sphyrna zygaena* $12.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$ (Storelli *et al.*, 2003), *Galeus melastomus* $0.99\text{-}8.76 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$ (Hornung *et al.*, 1993), *Carcharhinus leucas* $3.65 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$ (Endo *et al.*, 2008), y *C. limbatus* $3.33 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$ (Núñez-Nogueira, 2005); en hígado *Sphyrna zygaena* $32.31\text{-}39.48 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$ (Storelli *et al.*, 2003). Sin embargo, las concentraciones de Hg reportadas en el riñón de *I. oxyrinchus* (Velez, 2009) y *Negaprion brevirostris* (Nam *et al.*, 2010) son más bajas (0.04 y $0.03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$, respectivamente) que las reportadas para el tiburón azul en el presente estudio (Anexo 2).

Las concentraciones de Cd, Pb, Fe y Zn reportadas por Storelli *et al.* (2003) en músculo e hígado de *S. zygaena* (Anexo 2) están dentro de los intervalos registrados en el presente estudio para el tiburón azul (Tabla II). Mientras que Núñez-Nogueira (2005) reportó valores elevados de Zn y Pb en músculo de *Carcharhinus limbatus* (43.97 y $2.51 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$, respectivamente) con respecto a las concentraciones encontradas para el tiburón azul en el presente estudio. Estas diferencias se pueden deber a los requerimientos fisiológicos específicos de cada especie y a las condiciones ambientales propias de cada región (McMeans *et al.*, 2007).

Las concentraciones de elementos traza en el músculo de *I. oxyrinchus* en las costas de Baja California Sur reportadas por Velez (2009) están dentro de los valores encontrados en el presente estudio, excepto que la concentración de Pb es más alta ($0.29 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$) y la de Hg más baja ($0.4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ww}$) en *I. oxyrinchus* que en *P. glauca* (0.09 ± 0.01 y $0.87 \pm$

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

0.07 mg kg⁻¹ ww respectivamente; Tabla II). En el hígado las concentraciones de Hg (0.05 ± 0.03 mg kg⁻¹ ww), Cd (1.12 ± 0.65 mg kg⁻¹ ww) y Pb (0.14 ± 0.07 mg kg⁻¹ ww) son más bajas en el tiburón mako (Velez, 2009) que en el tiburón azul (0.22 ± 0.06, 34.66 ± 5.08 y 0.37 ± 0.06 mg kg⁻¹ ww respectivamente). En riñón, las concentración de Hg (0.04 ± 0.01 mg kg⁻¹ ww), Cd (0.97 ± 0.29 mg kg⁻¹ ww) y Pb (0.27 ± 0.07 mg kg⁻¹ ww) de tiburón mako (Velez, 2009) son más bajas que en tiburón azul (0.38 ± 0.06, 6.68 ± 1.24 y 1.39 ± 0.06 mg kg⁻¹ ww, respectivamente) (Anexo 2; Tabla II).

La actividad de la enzima antioxidante GST en el hígado del tiburón azul (29.55 ± 6.65 U mg⁻¹ proteína) observada en el presente trabajo es mayor que aquella reportada para la misma localidad en el hígado del tiburón mako (10.10 ± 4.44 U mg⁻¹ proteína) (Velez, 2009). La elevada actividad de GST en hígado del tiburón azul respecto aquella reportada para el tiburón mako puede sugerir que el organismo está respondiendo ante la presencia de elementos traza (Halliwell y Gutteridge, 2007). La concentración de carbonilos proteicos que se encontró en el músculo e hígado del tiburón azul (75.42 ± 12.91 y 115.47 ± 12.18 μmol g⁻¹ tejido, respectivamente) en este estudio es mayor que lo reportado para los mismos tejidos del tiburón mako (55.56 ± 9.95 y 104.23 ± 14.92 μmol g⁻¹ tejido, respectivamente) (Velez, 2009).

Esto sugiere que los tejidos del tiburón azul tienen mayor daño oxidativo a proteínas que los tejidos del tiburón mako, posiblemente porque en los tejidos del tiburón azul se encontraron mayores concentraciones de los elementos traza que en los tejidos del tiburón mako. Aparentemente, la actividad de las enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GPx no es suficiente para prevenir el daño oxidativo a proteínas en esta especie. Adicionalmente, las diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes puede deberse a otros factores como por ejemplo, la reproducción, actividad de nado, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 2007). En procesos como el nado y la etapa de reproducción hay un mayor consumo de oxígeno o aumento en la tasa metabólica, lo que induciría un aumento en la producción de ERO y como respuesta el organismo puede incrementar la

actividad antioxidante en sus tejidos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Konigsberg, 2008; López-Cruz *et al.*, 2010; Garratt *et al.*, 2011).

En el hígado del tiburón azul la actividad de CAT fue significativamente mayor en machos, mientras que en las hembras se observó mayor actividad de GR, GST y SOD (Tabla III). En hígado y músculo de *I. oxyrinchus* se reportó mayor actividad de CAT (2651.79 ± 1144.87 y 62830.67 ± 44912.75 U mg⁻¹ proteína, respectivamente) y de SOD (1190.22 ± 886.66 y 1272.84 ± 495.13 U mg⁻¹ proteína, respectivamente), y en el hígado de GR (51.4 ± 37.07 U mg⁻¹ proteína) en machos que en hembras (Velez, 2009). La actividad de las enzimas antioxidantes está ligada a la producción de ERO; por ejemplo, se sabe que la SOD cataliza la dismutación del O₂^{•-}, por lo que es posible esperar que se encuentre mayor producción de O₂^{•-} en las hembras que en los machos del tiburón azul, de manera similar a lo reportado para el hígado del tiburón mako, en el cual los machos presentaron mayor tasa de producción de O₂^{•-} que las hembras (0.16 ± 0.12 y 0.01 ± 0.007 nmol mg⁻¹ proteína, respectivamente) (Velez, 2009). La actividad de las enzimas GR y GPx es mayor en el hígado de HM que en HI del tiburón azul (Tabla III). Esta diferencia puede estar relacionada con la función de la enzima GR, la cual participa directamente en la regeneración del GSH, que a su vez es necesario para que la GPx pueda reaccionar con las ERO (e.g. O₂^{•-} y H₂O₂) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

8.2 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo de tiburón azul

La concentración de Hg en peces ha sido de gran preocupación debido a que a través del consumo de carne de estos organismos marinos se puede transferir Hg a los humanos (Wagemann *et al.*, 1998; Berntssen *et al.*, 2004). Sin embargo, la toxicidad del Hg depende de las formas químicas y la valencia del elemento. Por ejemplo, el Hg se puede encontrar en forma inorgánica y orgánica, también conocida como metilmercurio (MeHg o CH₃Hg), siendo esta última la forma más tóxica de este elemento (Berntssen *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2008; Cardona-Marek *et al.*, 2009).

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Se ha sugerido que el músculo de los peces tiende a ser tóxico debido a que el 95% del Hg total que está presente en este tejido es MeHg (Bloom, 1992; Watras *et al.*, 1998; Piraino y Taylor, 2009). Se ha reportado que en los peces lenguados (*Paralichthys dentatus* y *Pseudopleuronectes americanus*) del 95% al 98% del Hg en el músculo se encuentra en la forma metilada (Payne y Taylor, 2010), y en bacalao (*Boreogadus saida*) se ha reportado que el 100% del Hg es tóxico (Campbell *et al.*, 2005). En filete de tiburones en general, el porcentaje de MeHg es $\geq 94\%$ (Krystek y Ritsema, 2005), mientras que para el tiburón azul del Atlántico Norte se ha reportado entre 88 y 100% (promedio 92%) (Storelli *et al.*, 2001).

Lo anterior sugiere que las concentraciones de Hg son más altas del límite permitido para consumo humano ($1 \mu\text{g MeHg g}^{-1} \text{ ww}$) por agencias nacionales e internacionales (Tabla I). Sin embargo, es importante resaltar que la toxicidad depende de la dosis y la frecuencia en el consumo del producto (Baynes, 2004). Es importante cuantificar en tiburón azul en las costas de Baja California Sur cuál es la fracción del Hg total (analizado en este estudio) que corresponde a la forma orgánica (MeHg).

En este estudio se encontraron diferencias entre estadios de madurez, así como una relación con la talla en la concentración de Hg. En el músculo del tiburón azul de la costa occidental de Baja California Sur se encontró una relación entre la concentración de Hg total y la talla del organismo ($R^2 = 0.64$; $p=0$) (Fig. 8). Se ha sugerido que la concentración de Hg en el músculo tiende a incrementarse con el tamaño (probablemente con la edad) (de Pinho *et al.*, 2002; Branco *et al.*, 2007) y el nivel trófico del tiburón (Escobar-Sánchez *et al.*, 2011).

El tiburón azul tiende a incrementar su nivel trófico a lo largo de su vida (Kim *et al.*, 2011), quizás porque el aumento de tamaño le permite consumir presas de mayor tamaño y más rápidas (Ruiz-Cooley *et al.*, 2006; McMeans *et al.*, 2007). Esto se ha sugerido a partir del enriquecimiento del isótopo de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) observado en el músculo de machos adultos de tiburón azul, asociado a la preferencia en el consumo de macarela (*Scomber japonicus*) (Polo-Silva, com pers.). Adicionalmente, se han encontrado mayores concentraciones de Hg en depredadores que consumen peces en su dieta (Baeyens *et al.*,

2003; Dehn *et al.*, 2005); por ejemplo, la macarela tiene una mayor concentración de Hg ($0.57 \pm 0.02 \text{ g kg}^{-1}$) que la langostilla ($0.13 \pm 0.01 \text{ g kg}^{-1}$) y el calamar gigante ($0.12 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) (Maz-Courrau y López-Vera, 2006).

Con base en las diferentes concentraciones de Hg en los tejidos que las presas potenciales, la diferencia en la concentración de Hg observada entre hembras y machos del tiburón azul puede estar relacionada a las preferencias alimenticias de cada género (Hernández-Aguilar, 2008; Escobar-Sánchez *et al.*, 2011). Esta diferencia puede respaldar la hipótesis de la segregación del tiburón azul por sexo y estadio de madurez propuesta por Nakano (1994).

En peces existe una variación de los indicadores de estrés oxidativo en respuesta a la exposición de elementos traza. Los elementos traza Hg y As tienen una gran afinidad por los grupos tiol, tienen la capacidad de reducir al GSH, inducir la producción de ERO y, como consecuencia, producir daño oxidativo (Livingstone, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007; Konigsberg, 2008; Jomova *et al.*, 2011). Berntssen *et al.* (2003) encontraron que la exposición a MeHg en el salmón del atlántico (*Salmo salar parr*) puede disminuir la actividad de SOD y de GPx e incrementar la concentración de TBARS. Bagnyukova *et al.* (2007) no encontraron un incremento en la concentración de TBARS o carbonilos proteicos en la bailarina (*Carassius auratus*) expuesta a As en forma de arsenato. Sin embargo, la exposición a Fe en la bailarina (*C. auratus*) incrementa la concentración de TBARS y carbonilos proteicos y como respuesta, aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes en hígado y riñón (Bagnyukova *et al.*, 2007). En la bailarina se reportó un decremento en la actividad de GPx y CAT ante la exposición de Cu (Liu *et al.*, 2006), mientras que en trucha (*Salmo trutta*) no se encontró un incremento en la actividad de CAT ni de GPx ante la exposición de Cd (Hansen *et al.*, 2007).

En el presente estudio se observaron diferencias entre sexos y estadios de madurez en la concentración de Cu y Hg en el tiburón azul. Las diferencias entre sexos pueden deberse a factores reproductivos. En ratas, cuando las hembras se están preparando para la gestación, incrementa la inducción de la concentración de metalotioneina (MT) y, por ende, la

capacidad de almacenar elementos esenciales, como el Cu (Suzuki *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1993).

Elementos traza como el Cu y el Zn tienen la capacidad de inducir el factor de transcripción de metales (MTF-1), el cual a su vez, induce la producción de MT y otras enzimas de transporte (Valko *et al.*, 2005). Se han reportado concentraciones de MT de 0.55 a 0.86 mg g⁻¹ ww en músculo de un escualido (*Etmopterus princeps*) (Company *et al.*, 2010). La MT y otras proteínas chaperonas en los tejidos de tiburones pueden prevenir la toxicidad y el daño oxidativo de algunos elementos esenciales y no esenciales, como el Hg en el músculo, ya que tienen la capacidad de unirse a los elementos, evitando su reactividad y toxicidad (Bonwick *et al.*, 1990; Storelli *et al.*, 2011).

En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas por sexo o estadio de madurez en la actividad de las enzimas antioxidantes, en la concentración de TBARS, ni en la producción de O₂^{•-} del tiburón azul. En los machos se observaron mayores concentraciones de carbonilos proteicos que en las hembras. En la sangre de las hembras de pez loro (*Symphodus melops*), se reporta mayor concentración de carbonilos proteicos que en los machos (Almroth *et al.*, 2008). Sin embargo, los estrógenos (Borras *et al.*, 2007), la vitamina E y el GSH (Goldfarb *et al.*, 2007) en hembras tienen la capacidad de prevenir el daño oxidativo, incluyendo el daño a proteínas (cuantificado como la concentración de carbonilos proteicos). La diferencia entre sexos en la concentración de carbonilos proteicos en el músculo de tiburón azul también puede deberse a las preferencias alimenticias que pudieran aportar diferentes concentraciones de elementos traza (Hernández-Aguilar, 2008; Escobar-Sánchez *et al.*, 2011), y como consecuencia afectar a las defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007).

8.3 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en hígado y riñón del tiburón azul

Se presentaron diferencias entre sexos (IFd vs IMm vs IMd) en la concentración hepática de Hg y Cd por la presencia de dos organismos *outliers* (IMm: 240 y 252 cm LT).

Con base en el criterio establecido por Pratt (1979) y estimaciones de edad y de madurez sexual de los tiburones azules en la costa occidental de México (Blanco-Parra *et al.*, 2008; Carrera-Fernández *et al.*, 2010), la madurez sexual en machos parece ocurrir cuando alcanzan un talla alrededor de 170 cm (LT). Por el tamaño, ambos tiburones considerados como *outliers* en el este estudio, se clasificarían como machos maduros. Sin embargo, sus órganos sexuales no estaban desarrollados aún y sus gonopterigios no presentaron rotación ni calcificación como se esperaría en machos maduros. A pesar de esto, se observaron altas concentraciones de algunos elementos traza (Hg y Cd) propias de organismos adultos. Esto puede deberse a que el tamaño es un factor que permite a los depredadores desarrollar habilidades y estructuras morfológicas (e.g. aumento del tamaño de la boca) apropiados para explorar diferentes ambientes y de esta manera ampliar su espectro alimenticio a presas más rápidas y grandes como algunos peces y calamares pelágicos (Estupiñán-Montaña *et al.*, 2009; Cabrera-Chávez-Costa *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2012). Adicionalmente, al ser organismos más viejos o que han vivido más tiempo, acumulan una mayor cantidad de elementos traza en sus tejidos que los organismos juveniles (de Pinho *et al.*, 2002; Branco *et al.*, 2007; Barrera-García *et al.*, 2012).

En el presente trabajo, se encontraron diferencias en las concentraciones de elementos traza y los niveles de los indicadores de estrés oxidativo entre tejidos, las cuales también han sido reportadas previamente para tiburones. Nam *et al.* (2010) encontraron que las concentraciones de Hg en hígado son mayores que en riñón en el tiburón limón (*Negaprion brevirostris*). Las concentraciones de Zn son mayores en riñón que en hígado en el tiburón *G. galeus* (Vas, 1987). En relación a los indicadores de estrés oxidativo, Filho y Boveris (1993) encontraron, para diferentes especies de tiburones y rayas, que la actividad de CAT y la concentración de TBARS son mayores en hígado que en riñón. Estas diferencias entre tejidos pueden deberse a la afinidad que tengan los elementos entre órganos y a la función de éstos; el hígado es un tejido relacionado al metabolismo, y al tener alto contenido lipídico, es un órgano de almacenaje de energía, es detoxificante y, especialmente en tiburones, contribuye a la flotabilidad (Hinton *et al.*, 2008; Zambonino *et*

al., 2008). El riñón en tiburones sirve como órgano filtrador, excretor y de absorción (Marshall y Grosell, 2008).

No se encontraron diferencias significativas entre sexos en los indicadores de estrés oxidativo (ERO, antioxidantes y daño a tejidos) ni en la mayoría de los elementos traza. Sin embargo, las concentraciones de Zn fueron mayores en machos que en hembras. Vas (1987) y Endo *et al.* (2008) tampoco encontraron diferencias entre sexos en la concentración de elementos traza (e.g. Cu, Fe, Cd, Zn, Pb, Hg) en *G. galeus* y *S. acanthias*. Al-Yousuf *et al.* (2000) encontraron concentraciones de Zn más altas en hembras que en machos en el pez *Lethrinus lentjan* y atribuyeron esta diferencia a la disponibilidad de sitios activos dependientes de Zn en las proteínas. Es posible que en el tiburón azul, esta diferencia esté relacionada con la preferencia alimenticia, ya que gran parte del Zn es incorporado a través de la dieta (Hernández-Aguilar, 2008).

La mayor concentración de Zn en los machos que en hembras inmaduros del tiburón azul quizá puede estar relacionada a la presencia de Cd, ya que el Zn es un elemento esencial que tiene la capacidad indirecta de proteger al organismo de la toxicidad del Cd en tejidos como el hígado; este proceso ocurre a través de la acción de la MT afín a estos elementos (Hidalgo *et al.*, 1985; Heath, 1995). Como se mencionó anteriormente para el músculo del tiburón azul, el Zn puede activar al MTF-1, el cual induce a su vez a la MT (Di Giulio y Meyer, 2008; Hahn y Hestermann, 2008). En el hígado, la MT está unida a las moléculas de Zn, el cual es reemplazado por Cd, de tal manera que el Cd queda unido a la MT, y de esta manera, previene su efecto tóxico en el organismo (Nordberg, 1998). Este mecanismo puede ocurrir en tiburones, ya que se ha comprobado la presencia de MT en tejidos de tiburones escuálidos y carcarrínidos (Bonwick *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 2005; Company *et al.*, 2010).

No se encontraron diferencias significativas entre juveniles y adultos en la concentración de elementos traza, TBARS y carbonilos proteicos, ni en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en hígado y riñón. Sin embargo, la actividad de GPx y CAT en el hígado de tiburones azules fue mayor en HMd que en Hid. Cambios similares en la actividad antioxidante con

la edad se han reportado previamente para otras especies de peces. Wdzięczak *et al.* (1982) reportaron una reducción en la actividad enzimática de SOD con la edad en eritrocitos de robalo (*Dicentrarchus labrax*), y Sanz *et al.* (2001) reportaron una mayor actividad de CAT y GPx en células rojas del esturión (*Acipenser naccarii*). Sin embargo, no se reportan diferencias relacionadas con la edad en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el bagre (*Ameiurus melas*) (Otto y Moon, 1996). Las diferencias en la actividad enzimática antioxidante con la edad pueden estar relacionadas a procesos reproductivos, ya que durante la gestación la tasa metabólica y la producción de ERO aumentan, y es posible que aumente la actividad de enzimas antioxidantes en los tejidos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Konigsberg, 2008; Garratt *et al.*, 2011).

Cambios en los indicadores de estrés oxidativo en respuesta a concentraciones elevadas de elementos traza se ha reportado previamente para peces en diferentes tejidos; por ejemplo, en el hígado del pez cabeza de serpiente moteada (*Channa punctatus*) se observó un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes (e.g. GPx, GR, CAT) a la exposición prolongada de As (Allen y Rana, 2004), y un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GST en diferentes tejidos (e.g. hígado y riñón) del bagre de África (*Clarias gariepinus*) (Farombi *et al.*, 2007). En el tiburón azul se observó una relación entre la concentración de Cu y los niveles de carbonilos proteicos en hígado. Este indicador de estrés oxidativo se ha usado como biomarcador de la presencia de elementos traza (e.g. Cu) en hígado y riñón de bagre (*Wallago attu*) (Parvez *et al.*, 2006) y en sangre del pez lábrido (*Symphodus melops*) (Almroth *et al.*, 2008).

Correlaciones entre indicadores de estrés oxidativo han sido previamente reportadas en músculo y sangre de tiburones (Rudneva, 1997; Barrera-García *et al.*, 2012). En el presente estudio, se observó una correlación entre la actividad de SOD y GR, la actividad de SOD y la producción de $O_2^{\cdot-}$, y la actividad de SOD y la concentración de carbonilos proteicos. Es probable que en tiburones azules la actividad antioxidante pueda prevenir el efecto de las ERO, como el $O_2^{\cdot-}$, y de esta manera reducir el daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN (Halliwell y Gutteridge, 2007; Di Giulio y Meyer, 2008; Konigsberg, 2008).

8.4 Concentración de los elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en presas del tiburón azul

8.4.1 Elementos traza en calamar y langostilla como presas importantes del tiburón azul

El calamar *D. gigas* es una especie que cumple un papel ecológico muy importante en el ecosistema marino debido a su amplia distribución y abundancia (Nigmatullin *et al.*, 2001). Esta especie es depredador de una gran variedad de presas que incluyen peces, crustáceos, calamares y otros invertebrados (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2003), siendo la langostilla una de sus principales presas (Bazzino *et al.*, 2010).

La langostilla (*P. planipes*), en su fase pelágica, se encuentra en altas abundancias desde la superficie hasta una profundidad de 200 m (Aurioles-Gamboa, 1992, 1994, 1995). De Anda-Montañez *et al.* (2013) reportan abundancias de langostilla por estrato de profundidad desde los 51 hasta los 400 m, con las mayores abundancias entre los 201 y 300 m en las proximidades de Bahía Magdalena. La langostilla es un alimento importante para numerosos depredadores, como el tiburón azul (Hernández-Aguilar, 2008; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2010) y el calamar *D. gigas* (Markaida, 2006), entre otros.

Las concentraciones de Cu que se encontraron tanto en el calamar como en la langostilla pueden deberse a que estos organismos contienen, como pigmento respiratorio, hemocianina en vez de hemoglobina (Van Holde *et al.*, 2001). La hemocianina contiene Cu en su sitio activo en vez de Fe, como ocurre en la hemoglobina de vertebrados, entre ellos los peces y los mamíferos (Craig y Overnell, 2003).

Los cefalópodos, aún aquellos que habitan en lugares no contaminados, acumulan Cd en el hepatopáncreas (Bustamante *et al.*, 1998). Los calamares que pertenecen a las familias Ommastrephidae, Onychoteuthidae, Histioteuthidae y Gonatidae, al ser las presas más comunes de los depredadores tope, como los tiburones, pueden aportar, en comparación con otras presas, mayores concentraciones de Cd a sus consumidores (Bustamante *et al.*, 1998). La mayoría de los cefalópodos han desarrollado mecanismos eficientes de detoxificación de Cd en el hepatopáncreas (Bustamante *et al.*, 2002). El Cd en el

hepatopáncreas en especies de cefalópodos pertenecientes a la familia Sepiidae, Loliginidae y Ommastrephidae tiene una distribución subcelular en el citosol y los organelos, asociándose con proteínas citosólicas y no con la MT (Bustamante *et al.*, 2002; Craig y Overnell, 2003), como se ha observado en otros organismos. El Cd también se une a compuestos insolubles, lo que hace que este elemento no esté en una forma biodisponible para los cefalópodos (Bustamante *et al.*, 2002).

La presencia de Cd en presas como calamares, no necesariamente implica un efecto tóxico en los depredadores que las consumen. En ballenas consumidoras de cefalópodos se reportan valores de hasta 200 mg Cd kg⁻¹ ww; estas concentraciones parecen no afectar a la ballena debido a que han desarrollado mecanismos fisiológicos (e.g. unión del elemento a la MT) para detoxificar el Cd (Bustamante *et al.*, 1998). Los invertebrados gasterópodos acumulan elementos traza en gránulos insolubles en el hepatopáncreas, el riñón y el intestino; estos gránulos son defecados, por lo que no hay un proceso de asimilación de los elementos traza, y se reduce la biodisponibilidad de dichos elementos a través de la cadena trófica (Nott y Nicolaidou, 1990).

8.4.2 Elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en músculo e hígado de calamar gigante *Dosidicus gigas*

En diferentes especies de invertebrados como en los calamares *Loligo forbesi* (Craig y Overnell, 2003), *Todares filippovae* (Kojadinovic *et al.*, 2011) y el pulpo *Octopus vulgaris* (Semedo *et al.*, 2012), se ha encontrado que los elementos traza (e.g. Ag, Fe, Zn, Cu, As, Cd y Pb) se acumulan en el hígado en mayor cantidad que en otros órganos, como el músculo, los tentáculos o el manto. Elementos como el Hg y el As se acumulan mayormente en el músculo de cefalópodos como *T. filippovae* (Kojadinovic *et al.*, 2011) y *Octopus vulgaris* (Semedo *et al.*, 2012), contrario a lo que se observó en el presente trabajo en *D. gigas*.

La acumulación de elementos traza en el hígado con respecto a otros tejidos puede ser muy variable entre especies e individuos (Martin y Flegal, 1975). Es probable que la acumulación de Hg y As en el hígado de *D. gigas* esté en función de los procesos de

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

detoxificación y excreción; mientras que en otras especies de cefalópodos se podría deber al proceso de redistribución y a la transformación química de estos elementos en tejidos como el músculo que, por ser un tejido rico en proteínas con grupo sulfidrilo, tiene afinidad por Hg (MeHg) y As (Bustamante *et al.*, 2006; Kojadinovic *et al.*, 2011).

La actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR fue mayor en músculo que en el hígado en *D. gigas*, quizá debido a que el músculo puede ser un tejido con elevada actividad de enzimas dependientes de metales (Craig y Overnell, 2003). Un hallazgo similar se reportó en el mejillón *Mytilus edulis*, mayor actividad de GPx en músculo que en hígado (Gamble *et al.*, 1995).

En moluscos, frecuentemente se ha reportado una asociación entre la concentración de Cu y Zn y la concentración de Cd debido a la presencia de proteínas afines a metales, como la MT (Isani *et al.*, 2000; Kojadinovic *et al.*, 2011). En cefalópodos se ha reportado la presencia de la MT en calamares, sepias y pulpos (Castillo y Maita, 1991; Bustamante *et al.*, 2002). La interacción entre elementos esenciales y no esenciales es un indicador de que los elementos esenciales juegan un papel importante en los procesos de detoxificación de los organismos (Kojadinovic *et al.*, 2011).

Los elementos traza inducen la producción de ERO (Livingstone, 2003) y, como mecanismo de defensa, se incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes (Semedo *et al.*, 2012). Los indicadores de estrés oxidativo se han utilizado en invertebrados como biomarcadores de la presencia de contaminantes, como por ejemplo, en la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) se ha evidenciado que existe una correlación entre la presencia de metales (e.g. Cd, Pb, Fe) con indicadores de estrés oxidativo (e.g. TBARS, SOD y GST) (Cantú-Medellín *et al.*, 2009). Sin embargo, Semedo *et al.* (2012) reportaron en el pulpo *Octopus vulgaris* una correlación inversa entre la actividad enzimática (e.g. SOD, CAT, GST) y el daño oxidativo a lípidos, lo cual relacionaron al papel que juegan estos antioxidantes para prevenir el daño oxidativo a tejidos.

En el músculo del calamar se observó una correlación positiva de la concentración de Hg y Pb con los niveles de carbonilos proteicos, sugiriendo que la actividad antioxidante no es suficiente para prevenir el daño oxidativo a proteínas. Adicionalmente, a pesar de no haberse observado una correlación significativa, entre las concentraciones de Hg y As presentes en músculo, la mayor actividad de CAT y GST, y la mayor concentración de TBARS en músculo, pueden ser un indicador de que la actividad antioxidante en este tejido no es suficiente para prevenir el daño oxidativo a lípidos.

En el hígado de *D. gigas* se observó una correlación negativa entre la concentración de Fe y los niveles de carbonilos proteicos. El Fe, al ser un elemento divalente, tiene la capacidad de generar daño oxidativo a tejidos a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weis (Halliwell y Gutteridge, 2007). Sin embargo, es posible que la mayor actividad de enzimas (e.g CAT, SOD y GST) en este tejido pueda prevenir el daño oxidativo generado por la presencia del Fe.

Con base en las diferencias significativas entre tejidos, el hígado tiene mayor concentración de elementos traza que pueden ser tóxicos para el organismo, generando una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, la mayor actividad de CAT, SOD y GST en hígado en comparación con el músculo, y el menor daño oxidativo a lípidos en el hígado, sugiere que la actividad de estas enzimas disminuye el daño oxidativo en el hígado. La actividad de estas enzimas (CAT, SOD y GST) para disminuir el daño oxidativo fueron reportadas por Semedo *et al.* (2012) para el pulpo *O. vulgaris*.

8.4.2.1 Calamares como indicadores para la salud humana

El calamar gigante es una especie de cefalópodos altamente capturada y comercializada a nivel mundial, ya que a nivel mundial se desembarcan aproximadamente 800,000 toneladas métricas (FAO, 2006). A nivel nacional, se reportan en el Golfo de California en 1997, 140,000 toneladas (Rosas-Luis *et al.*, 2008), y en el Océano Pacífico en el 2005 4,500 toneladas de calamar capturado (Bazzino *et al.*, 2010).

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Debido a su explotación pesquera, es importante tener en cuenta las concentraciones de elementos traza en los tejidos de *D. gigas* como el músculo, ya que pueden tener efectos en la salud de sus consumidores, incluyendo humanos. Instituciones gubernamentales nacionales e internacionales, como la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (US Food and Drug Administration, FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), y las normas oficiales mexicanas, NOM 242-SSA1 y NOM 027-SSA1, han establecido los límites permisibles para consumo humano (Tabla I).

Las concentraciones de Cd en músculo de *D. gigas* en el presente estudio exceden los límites permisibles por las leyes para consumo humano. La toxicidad del Cd puede causar enfermedades del riñón, a los glomérulos del riñón, daños al túbulo renal, también puede afectar los pulmones, el hígado, los huesos, el sistema inmune y puede llegar a ser cancerígeno (Valko *et al.*, 2005; Dehn *et al.*, 2006; United States Environmental Protection Agency, 2007).

9 CONCLUSIONES

Existen diferencias entre sexos y por estadio de madurez en las concentraciones de Hg y Cu en músculo, y en las concentraciones de Hg, As, Zn, Cd y Pb en hígado y riñón del tiburón azul. Debido a que la mayoría de los elementos traza son adquiridos a través de la alimentación, las diferencias en concentraciones observadas en este estudio pueden estar relacionadas con la segregación sexual, distribución espacial y las preferencias alimenticias entre sexos y por estadio de madurez. Las hembras del tiburón azul consumen más invertebrados, específicamente langostilla, mientras que los machos adultos comen más peces, como la macarela.

En el músculo del tiburón azul existen asociaciones entre las concentraciones de Hg y As, y la producción de $O_2^{\bullet-}$; entre la actividad de las enzimas SOD, GST y GR, y la concentración de TBARS. En el hígado se observaron asociaciones entre la actividad de SOD y de GR, y los niveles de carbonilos proteicos; entre la actividad de GST y la concentración de As. En el riñón se observaron asociaciones entre la actividad de SOD y la concentración de TBARS; la concentración de carbonilos proteicos y las concentraciones de As y Cu. Estas relaciones entre elementos traza e indicadores de estrés oxidativo sugieren que la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de carbonilos proteicos pueden servir como biomarcadores de la presencia y el posible efecto de los elementos traza en tiburones azules silvestres

Existen correlaciones entre las concentraciones de los elementos traza en los diferentes tejidos del tiburón azul: En el hígado, entre las concentraciones de Cd y Zn, y en riñón, entre las concentraciones de As y Cd. Estas interacciones sugieren la presencia y la acción de la MT y otras proteínas de transporte que pueden estar previniendo el efecto tóxico de los elementos traza al evitar su toxicidad.

Las concentraciones de Hg en el músculo del tiburón azul son mayores a las concentraciones reportadas anteriormente para la misma especie y para el tiburón mako en las costas de Baja California Sur. En algunos ejemplares, especialmente aquellos de tallas

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

mayores (>200 cm LT), estas concentraciones son mayores al límite permitido por la NOM-242-SSA1 para consumo humano ($0.5 - 1 \text{ mg Hg kg}^{-1} \text{ ww}$). La talla puede ser un factor importante para determinar la acumulación de elementos traza en tejidos del tiburón azul. Se recomienda realizar análisis específicos de MeHg en estos organismos para confirmar la fracción de Hg orgánico (la fracción tóxica) en el músculo del tiburón azul.

Con excepción de la actividad de GST en hígado, la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GR, GST, CAT y SOD fueron menores y el daño oxidativo a proteínas fue mayor en el músculo, hígado y riñón del tiburón azul (presente estudio) comparado con los resultados reportados para el tiburón mako en la misma localidad.

En el hígado y músculo del calamar y la langostilla se encontraron concentraciones más altas de Cd, Pb, Zn y Cu que las de su posible depredador, el tiburón azul. Las concentraciones de Cu se atribuyen al complejo de este elemento traza con la hemocianina de invertebrados.

10 LITERATURA CITADA

- Abele, D., S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 138(4): 405-415.
- Abele, P. 1996. *Water Pollution Biology*. Taylor and Francis. Primera Edición. Philadelphia. 286p.
- Abitía-Cárdenas, L.A., A. Muhlia-Melo, V. Cruz-Escalona, F. Galván-Magaña. 2002. Trophic dynamics and seasonal energetics of striped marlin *Tetrapturus audax* in the southern Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 57(3): 287-295.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Aguilar-Castro, N. 2003. Ecología trófica de juveniles del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith y Smith, 1834) en el Golfo de California. Tesis de Maestría. CICIMAR - Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S. 113p.
- Al-Yousuf, M.H., M.S. El-Shahawi, S.M. Al-Ghais. 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Sci. Total Environ.* 256(2-3): 87-94.
- Allen, T., S.V.S. Rana. 2004. Effect of Arsenic (AsIII) on Glutathione-Dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus*. *Biol. Trace Elem. Res.* 100(1): 39-48.
- Almroth, B.C., J. Sturve, E. Stephensen, T.F. Holth, L. Förlin. 2008. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar. Environ. Res.* 66(2): 271-277.
- Auriolles-Gamboa, D. 1992. Inshore-Offshore movements of pelagic red crabs *Pleuroncodes planipes* (Decapoda. Anomura, Galatheidea) off the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. *Crustaceana.* 62(11): 71-84.
- Auriolles-Gamboa, D. 1994. Annual mass stranding of pelagic red crabs *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Anomura: Galatheidae), in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Fish Bull. US.* 92: 464-470.
- Auriolles-Gamboa, D. 1995. Distribución y abundancia de la langostilla bentónica (*Pleuroncodes planipes*) en la plataforma continental de la costa oeste de Baja California. En: Auriolles-Gamboa, D., Balart, E.F. (eds). *La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). La Paz, B.C.S. México. 59-78p.
- Baeyens, W., M. Leermakers, T. Papina, A. Saprykin, N. Brion, J. Noyen, M. De Gieter, M. Elskens, L. Goeyens. 2003. Bioconcentration and Biomagnification of Mercury and

Methylmercury in North Sea and Scheldt Estuary Fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45(4): 498-508.

Bagnyukova, T.V., L.I. Luzhna, I.P. Pogribny, V.I. Lushchak. 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. Environ. Mol. Mutag. 48(8): 658-665.

Barrera-García, A., T. O'Hara, F. Galván-Magaña, L.C. Méndez-Rodríguez, J.M. Castellini, T. Zenteno-Savín. 2012. Oxidative stress indicators and trace elements in the blue shark (*Prionace glauca*) off the east coast of the Mexican Pacific Ocean. Comp. Biochem. Physiol. C. 156(2): 59-66.

Baynes, R.E. 2004. Human Health Risk Assessment. En: Hodgson, E. (ed). A Textbook of Modern Toxicology. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 423-438p.

Bazzino, G., W.F. Gilly, U. Markaida, C.A. Salinas-Zavala, J. Ramos-Castillejos. 2010. Horizontal movements, vertical-habitat utilization and diet of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Pacific Ocean off Baja California Sur, Mexico. Prog. Oceanogr. 86(1-2): 59-71.

Berntssen, M.H.G., A. Aatland, R.D. Handy. 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. Aquat. Toxicol. 65(1): 55-72.

Berntssen, M.H.G., K. Hylland, K. Julshamn, A.K. Lundebye, R. Waagbø. 2004. Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. Aquacult. Nutr. 10(2): 83-97.

Beyersmann, D. 1991. The significance of interactions in metal essentiality and toxicity. En: Merian, E. (ed). Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance. VCH Publishing. New York, NY. 491-509p.

Blanco-Parra, M.d.P., F. Galván-Magaña, F. Márquez-Farías. 2008. Age and growth of the blue shark, *Prionace glauca* Linnaeus, 1758, in the Northwest coast off Mexico. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 43(3): 513-520.

Blanco-Parra, P. 2003. Edad y crecimiento del tiburón azul, *Prionace glauca* (Linnaeus 1758), en la costa occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología - UNAM. México, D.F. 43p.

Bloom, N.S. 1992. On the Chemical Form of Mercury in Edible Fish and Marine Invertebrate Tissue. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49(5): 1010-1017.

Bonwick, G.A., P. Vas, P.R. Fielden, J.D.M. Gordon. 1990. Metallothionein-like proteins in the livers of squaloid and carcharhinid sharks. Mar. Pollut. Bull. 21(12): 567-570.

Bornatowski, H., P. Schwingel. 2008. Feeding and reproduction of the blue shark, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), off Southeastern and Southern Brazil. Arq. Cienc. Mar. 41(1): 98-103.

- Borras, C., J. Gambini, J. Vina. 2007. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Frontiers in Bioscience*. 12: 1008-1013.
- Boyd, C.M. 1967. Benthic and pelagic habitats of the red crab, *Pleuroncodes planipes*. *Pac. Sci.* 21: 394-403.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Bragadóttir, M. 2001. Endogenous antioxidants in fish. Tesis de Maestría. University of Iceland. 59p.
- Branco, V., J. Canário, C. Vale, J. Raimundo, C. Reis. 2004. Total and organic mercury concentrations in muscle tissue of the blue shark (*Prionace glauca* L.1758) from the Northeast Atlantic. *Mar. Pollut. Bull.* 49(9-10): 871-874.
- Branco, V., C. Vale, J. Canário, M.N.d. Santos. 2007. Mercury and selenium in blue shark (*Prionace glauca*, L. 1758) and swordfish (*Xiphias gladius*, L. 1758) from two areas of the Atlantic Ocean. *Environ. Pollut.* 150(3): 373-380.
- Bustamante, P., F. Caurant, S.W. Fowler, P. Miramand. 1998. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Sci. Total Environ.* 220(1): 71-80.
- Bustamante, P., R.P. Cosson, I. Gallien, F. Caurant, P. Miramand. 2002. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar. Environ. Res.* 53(3): 227-241.
- Bustamante, P., V. Lahaye, C. Durnez, C. Churlaud, F. Caurant. 2006. Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: Influence of geographical origin and feeding ecology. *Sci. Total Environ.* 368(2-3): 585-596.
- Cabrera-Chávez-Costa, A. 2003. Hábitos alimenticios del tiburón piloto *Carcharhinus falciformis* (Bibron, 1839) en la costa occidental de Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR - Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S. 110p.
- Cabrera-Chávez-Costa, A.A., F. Galván-Magaña, O. Escobar-Sánchez. 2010. Food habits of the silky shark *Carcharhinus falciformis* (Müller & Henle, 1839) off the western coast of Baja California Sur, Mexico. *J. Appl. Ichthyol.* 26(4): 499-503.
- Campbell, L.M., R.J. Norstrom, K.A. Hobson, D.C.G. Muir, S. Backus, A.T. Fisk. 2005. Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay). *Sci. Total Environ.* 351-352(0): 247-263.
- Cantú-Medellín, N., N.O. Olguín-Monroy, L.C. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín. 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squallida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56(1): 60-66.

- Cárdenas-Rodríguez, N., O.N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverrí. 2008. Glutación Peroxidasas: Una familia de enzimas. En: Konigsberg, M. (ed). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual Moderno. México D.F. 183-200p.
- Cardona-Marek, T., K.K. Knott, B.E. Meyer, T.M. O'Hara. 2009. Mercury concentrations in Southern Beaufort Sea polar bears: Variation based on stable isotopes of carbon and nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(7): 1416-1424.
- Carey, F.G., J.V. Scharold, A.J. Kalmijn. 1990. Movements of blue sharks (*Prionace glauca*) in depth and course. *Mar. Biol.* 106(3): 329-342.
- Carrera-Fernández, M. 2003. Biología reproductiva del tiburón azul, *Prionace glauca*, (Linnaeus, 1758) en la costa occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. CICIMAR - Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S. 82p.
- Carrera-Fernández, M., F. Galván-Magaña, B.P. Ceballos-Vázquez 2010. Reproductive biology of the blue shark *Prionace glauca* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) off Baja California Sur, México. *Aqua Int. J. Ichthyol.* 16(3): 101-110.
- Cartamil, D., O. Santana-Morales, M. Escobedo-Olvera, D. Kacev, L. Castillo-Geniz, J.B. Graham, R.D. Rubin, O. Sosa-Nishizaki. 2011. The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Fish. Res.* 108: 393-403.
- Carvalho, F., F.H.V. Hazin, H.G. Hazin, P. Travassos. 2008. Historical Catch Rates of Blue shark (*Prionace glauca*) in the Southwestern Equatorial Atlantic Ocean Between 1958 and 1962. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT.* 62(5): 1553-1559.
- Castillo, L.V., Y. Maita. 1991. Isolation and partial characterization of cadmium binding proteins from the oceanic squid, *Ommastrephes bartrami*. *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.* 42: 26-34.
- Chan, H.M., Y. Tamura, M.G. Cherian, R.A. Goyer. 1993. Pregnancy-Associated Changes in Plasma Metallothionein Concentration and Renal Cadmium Accumulation in Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202(4): 420-427.
- Chihuailaf, R.H., P.A. Contreras, F.G. Wittwer. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 33(3): 265-283.
- Cho, Y.S., B.I. Choi, E.-M. Ha, K.H. Kim, S.K. Kim, D.S. Kim, Y.K. Nam. 2005. Shark (*Scyliorhinus torazame*) metallothionein: cDNA cloning, genomic sequence, and expression analysis. *Mar. Biotechnol.* 7(4): 350-362.
- Christesen, V., D. Pauly. 1992. Ecopath II - a software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. *Ecol. Model.* 61: 169-185.
- Clarke, K., R. Warwick. 2001. Primer v6: User manual/tutorial. Primer-E Ltd. Primera Edición. Plymouth. 91p.
- Compagno, L.J.V. 1984. FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of sharks species known to date. Part 2. Carchariniiformes. FAO Fisheries Synopsis (125), Roma. p.

Compagno, L.J.V., F. Krupp, W. Schneider. 1995. Tiburones. En: Fisher, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., Niem, V.H. (eds). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental Volumen II. Vertebrados - Parte 1. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 647-1200p.

Company, R., H. Felícia, A. Serafim, A.J. Almeida, M. Biscoito, M.J. Bebianno. 2010. Metal concentrations and metallothionein-like protein levels in deep-sea fishes captured near hydrothermal vents in the Mid-Atlantic Ridge off Azores. Deep Sea Res. (I Oceanogr. Res. Pap.). 57(7): 893-908.

CONAPESCA, 2010. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2008.I SAGARPA. Mazatlán, México. 212p.

Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. ICES J. Mar. Sci. 56(5): 707-717.

Craig, S., J. Overnell. 2003. Metals in squid, *Loligo forbesi*, adults, eggs and hatchlings. No evidence for a role for Cu- or Zn-metallothionein. Comp. Biochem. Physiol. C. 134(3): 311-317.

De Anda-Montañez, J., R. Perez-Enriquez, S. Martínez-Aguilar, F. Hernández-Martínez, F. García-Rodríguez, A. Amador-Buenrostro. 2013. Abundance and genetic diversity of the red crab *Pleuroncodes planipes* along the western coast of the Baja California Peninsula, Mexico. Fish. Sci. 79(1): 21-32.

De Anda, J., E. Balart-Paez, R. Pérez-Enríquez, T. Zenteno-Savín, L.C. Méndez-Rodríguez, A. Amador-Buenrostro, C. Jaramillo-Rodríguez, I. Espina-Olguín, G. Galindo-Cortés, F. Hernández-Martínez, J. Rodríguez-Romero, 2007. Estimación de parámetros poblacionales y evaluación de la biomasa de crustáceos galateidos (*Pleuroncodes planipes* y *Munida spp*) en la costa occidental de la península de Baja California. I Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Informe técnico Sagarpa-CONACyT No .19 La Paz, B.C.S. 152p.

De La Lanza, G. 2001. Características físicoquímicas de los mares de México. Intituto de Geografía- UNAM y Plaza y Valdés. Primera Edición. México D.F. 149p.

de Pinho, A.P., J.R.D. Guimarães, A.S. Martins, P.A.S. Costa, G. Olavo, J. Valentin. 2002. Total mercury in muscle tissue of five shark species from Brazilian offshore waters: effects of feeding habit, sex, and length. Environ. Res. 89(3): 250-258.

Dehn, L.-A., E.H. Follmann, D.L. Thomas, G.G. Sheffield, C. Rosa, L.K. Duffy, T.M. O'Hara. 2006. Trophic relationships in an Arctic food web and implications for trace metal transfer. Sci. Total Environ. 362(1-3): 103-123.

Dehn, L.-A., G.G. Sheffield, E.H. Follmann, L.K. Duffy, D.L. Thomas, G.R. Bratton, R.J. Taylor, T.M. O'Hara. 2005. Trace elements in tissues of phocid seals harvested in the Alaskan and Canadian Arctic: influence of age and feeding ecology. Canadian Journal of Zoology. 83(5): 726-746.

- Di Giulio, R.T., J.N. Meyer. 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (eds). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. Boca Raton, FL. 273-326p.
- Drossos, G., A. Lazou, P. Panagopoulos, S. Westaby. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* 59(1): 169-172.
- Elorriaga-Verplancken, F., D. Auriolles-Gamboa. 2008. Trace Metal Concentrations in the Hair of *Zalophus californianus* Pups and their Relation to Feeding Habits. *Biol. Trace Elem. Res.* 126(1): 148-164.
- Endo, T., Y. Hisamichi, K. Haraguchi, Y. Kato, C. Ohta, N. Koga. 2008. Hg, Zn and Cu levels in the muscle and liver of tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) from the coast of Ishigaki Island, Japan: Relationship between metal concentrations and body length. *Mar. Pollut. Bull.* 56(10): 1774-1780.
- Erickson, R.J., N.J. W., C.P. M., A.G. T. 2008. Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (eds). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. Boca Raton, FL. 9-54p.
- Escobar-Sánchez, O., F. Galván-Magaña, R. Rosiles-Martínez. 2011. Biomagnification of Mercury and Selenium in Blue Shark *Prionace glauca* from the Pacific Ocean off Mexico. *Biol. Trace Elem. Res.* 144(1): 550-559.
- Estupiñán-Montaña, C., L.G. Cedeño-Figueroa, F. Galván-Magaña. 2009. Hábitos alimentarios del tiburón martillo *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834) (Chondrichthyes) en el Pacífico ecuatorial. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44: 379-386.
- FAO, 2006. Fish, crustaceans, molluscs, etc. Capture production by principal species in 2006. I Food and Agricultural Organization. <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/a1e.pdf>. 2p.
- Farombi, E., O. Adelowo, Y. Ajimoko. 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int. J. Env. Res. Public Health.* 4(2): 158-165.
- Fidan, A., İ. Ciğerci, M. Konuk, İ. Küçükkurt, R. Aslan, Y. Dündar. 2008. Determination of some heavy metal levels and oxidative status in *Carassius carassius* L., 1758 from Eber Lake. *Environ. Monit. Assess.* 147(1): 35-41.
- Filho, D.W., A. Boveris. 1993. Antioxidant defences in marine fish—II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 106(2): 415-418.
- Flohé, L., W.A. Günzler. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114-120.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201(8): 1203-1209.
- Furness, R.W., P.S. Rainbow. 1990. *Heavy Metals in the Marine Environment*. CRC Press. Primera Edición. 264p.

- Gamble, S.C., P.S. Goldfarb, C. Porte, D.R. Livingstone. 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39(1-4): 191-195.
- García-Hernández, J., L. Cadena-Cárdenas, M. Betancourt-Lozano, L.M. García-De-La-Parra, L. García-Rico, F. Márquez-Farías. 2007. Total mercury content found in edible tissues of top predator fish from the Gulf of California, Mexico. *Toxicol. Environ. Chem.* 89(3): 507-522.
- Garratt, M., A. Vasilaki, P. Stockley, F. McArdle, M. Jackson, J.L. Hurst. 2011. Is oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in house mice. *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B: Biol. Sci.* 278(1708): 1098-1106.
- Goldberg, D.M., R.J. Spooner. 1987. Glutathione reductase. *Methods of Enzymatic Analysis*. vol. III: pp. 256-258.
- Goldfarb, A.H., M.J. McKenzie, R.J. Bloomer. 2007. Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32(6): 1124-1131.
- Gómez, L.E., D.B. Cuevas. 2008. Superóxido Dismutasa. En: Königsberg, M. (ed). *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. Manual Moderno. México D.F. 169-182p.
- Gray, J.S. 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 46-52.
- Gupta, R.C. 2007. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Academic Press. Primera Edición. New York, N.Y. 1201p.
- Habig, W.H., W.B. Jakoby. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77: 218-235.
- Hahn, M.E., E.V. Hestermann. 2008. Receptor mediated mechanisms of toxicity. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (eds). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press. New York. 235-272p.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Cuarta Edición. Oxford, UK. 888p.
- Hansen, B., S. Rømme, Ø.A. Garmo, S.A. Pedersen, P.A. Olsvik, R.A. Andersen. 2007. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere.* 67(11): 2241-2249.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press. Segunda Edición. Boca Raton, FL. 259p.
- Henderson, A.C., K. Flannery, J. Dunne. 2001. Observations on the biology and ecology of the blue shark in the North-east Atlantic. *J. Fish Biol.* 58(5): 1347-1358.

- Hernández-Aguilar, S.B. 2008. Espectro trófico del tiburón azul *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) en la costa occidental de Baja California Sur, México. CICIMAR. La Paz, B.C.S. . 86p.
- Hidalgo, J., L. Tort, R. Flos. 1985. Cd-, Zn-, Cu-binding protein in the elasmobranch *Scyliorhinus canicula*. Comp. Biochem. Physiol. C. 81(1): 159-165.
- Hinton, D.E., H. Segner, D.W.T. Au, S.W. Kullman, R.C. Hardman. 2008. Liver toxicity. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (eds). The Toxicology of Fishes. CRC Press. Boca Raton, FL. 327-400p.
- Hodgson, E. 2004. A textbook of modern toxicology. John Wiley and Sons Inc. Tercera Edición. New Jersey. 543p.
- Hornung, H., M.D. Krom, Y. Cohen, M. Bernhard. 1993. Trace metal content in deep-water sharks from the eastern Mediterranean Sea. Mar. Biol. 115(2): 331-338.
- Iemanya, O., 2010. Cuarta reunión de la red de conservación de tiburones. Abril de 2010. La Paz, Baja California Sur, México.
- Isani, G., G. Andreani, M. Kindt, E. Carpena. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. Cell. Mol. Biol. 64(2): 311.
- Jomova, K., Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C.J. Rhodes, M. Valko. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. J. Appl. Toxicol. 31(2): 95-107.
- Kim, S., D. Casper, F. Galván-Magaña, R. Ochoa-Díaz, S. Hernández-Aguilar, P. Koch. 2011. Carbon and nitrogen discrimination factors for elasmobranch soft tissues based on a long-term controlled feeding study. Environ. Biol. Fishes: 1-16.
- Knott, K.K., D. Boyd, G.M. Ylitalo, T.M. O'Hara. 2011. Concentrations of mercury and polychlorinated biphenyls in blood of Southern Beaufort Sea polar bears (*Ursus maritimus*) during spring: variations with lipids and stable isotope ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) values. Canadian Journal of Zoology. 89(11): 999-1012.
- Kojadinovic, J., C.H. Jackson, Y. Cherel, G.D. Jackson, P. Bustamante. 2011. Multi-elemental concentrations in the tissues of the oceanic squid *Todarodes filippovae* from Tasmania and the southern Indian Ocean. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74(5): 1238-1249.
- Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual Moderno. Primera Edición. México D.F. 623p.
- Krystek, P., R. Ritsema. 2005. Mercury speciation in thawed out and refrozen fish samples by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy. Anal. Bioanal. Chem. 381(2): 354-359.
- Kubodera, T., H. Watanabe, T. Ichii. 2007. Feeding habits of the blue shark, *Prionace glauca*, and salmon shark, *Lamna ditropis*, in the transition region of the Western North Pacific. Rev. Fish Biol. Fish. 17(2-3): 111-124.

- Levine, R.L., J.A. Williams, E.P. Stadtman, E. Shacter. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. En: Lester, P. (ed). *Methods Enzymol.* Academic Press. 346-357p.
- Litvinov, F.F. 2006. On the role of dense aggregations of males and juveniles in the functional structure of the range of the blue shark *Prionace glauca*. *J. Ichthyol.* 46(8): 613-624.
- Liu, H., W. Wang, J. Zhang, X. Wang. 2006. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65(3): 350-354.
- Livingstone, D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire (Toulouse)*. 154(6): 427-430.
- Longhurst, A.R. 1967. Diversity and trophic structure of zooplankton communities in the California Current. *Deep Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 14(4): 393-408.
- López-Cruz, R.I., T. Zenteno-Savín, F. Galván-Magaña. 2010. Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 156(1): 50-56.
- Lowmanm, E.G., D.K. Phelps, R. McClin, V.R. De Vega, I.O. Padovani, R.J. García, 1996. Interactions of the environmental and biological factors on the distribution of trace elements in the marine environment. Disposal of radioactive wastes into seas, oceans and surface waters. Vienna: International Atomic Energy Association. Vienna, Italia.
- Lushchak, V.I. 2012. Environmentally induced oxidative stress in fish. En: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T. (eds). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK. 295-307p.
- Marcovecchio, J.E., V.J. Moreno, A. Pérez. 1991. Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Mar. Environ. Res.* 31(4): 263-274.
- Markaida, U. 2006. Food and feeding of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California and adjacent waters after the 1997–98 El Niño event. *Fish. Res.* 79(1–2): 16-27.
- Markaida, U., O. Sosa-Nishizaki. 2003. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 83(3): 507-522.
- Markaida, U., O. Sosa-Nishizaki. 2010. Food and feeding habits of the blue shark *Prionace glauca* caught off Ensenada, Baja California, Mexico, with a review on its feeding. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 90(05): 977-994.
- Marshall, W., M. Grosell. 2008. Ion transport, osmoregulation and acid-base. En: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (eds). *Physiology of Fishes*. CRC Taylor & Francis. 177-224p.
- Martin, J.H., A.R. Flegal. 1975. High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium, and zinc. *Mar. Biol.* 30(1): 51-55.

- Martínez-Cayuela, M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharm.* 39(1): 5-18.
- Maz-Courrau, A., C. López-Vera. 2006. Biomagnificación Y Bioacumulación De Mercurio En Cuatro Especies De Tiburón De La Península De Baja California Sur, México. Tesis de pregrado. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C. pp. 77p.
- McCord, M.E., S.E. Campana. 2003. A quantitative assessment of the diet of the blue shark (*Prionace glauca*) off Nova Scotia, Canada. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 32: 57-63.
- McMeans, B.C., K. Borgå, W.R. Bechtol, D. Higginbotham, A.T. Fisk. 2007. Essential and non-essential element concentrations in two sleeper shark species collected in arctic waters. *Environ. Pollut.* 148(1): 281-290.
- Nakano, H. 1994. Age, reproduction and migration of blue shark in the North Pacific Ocean. *Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish.* 31: 141-144.
- Nakano, H., M.P. Seki. 2003. Synopsis of biological data on the blue shark, *Prionace glauca* Linnaeus. *Bull. Fish. Res. Agen.* 6: 18-55.
- Nakano, H., J.D. Stevens. 2008. The biology and ecology of the blue shark, *Prionace glauca*. En: Camhi, M.D., Pikitch, E.K., Babcock, E.A. (eds). *Sharks of the Open Ocean: Biology, Fisheries and Conservation*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 140-151p.
- Nam, D.H., D.H. Adams, E.A. Reyier, N. Basu. 2010. Mercury and selenium levels in lemon sharks (*Negaprion brevirostris*) in relation to a harmful red tide event. *Environ. Monit. Assess.* 176(1): 1-11.
- Newman, S., R. Handy, S. Gruber. 2012. Ontogenetic diet shifts and prey selection in nursery bound lemon sharks, *Negaprion brevirostris*, indicate a flexible foraging tactic. *Environ. Biol. Fishes.* 95(1): 115-126.
- Nigmatullin, C.M., K.N. Nesis, A.I. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish. Res.* 54(1): 9-19.
- Nordberg, M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta.* 46(2): 243-254.
- Norton, J., D. McCain, R. Brainard, D. Husby. 1985. The 1982-1983 El niño event of Baja y alta California and it ocean climate context. . En: Wooster, W. (ed). *El Niño North: Niño effects in the Eastern Subarctic Pacific Ocean*. Washington Sea Grant Program. Washington. 44-72p.
- Nott, J.A., A. Nicolaidou. 1990. Transfer of metal detoxification along marine food chains. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 70(4): 905-912.
- Núñez-Nogueira, G. 2005. Concentration of Essential and Non-Essential Metals in Two Shark Species Commonly Caught in Mexican (Gulf of México) Coastline. En: Botello, A.V., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández, C. (eds). *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Univ. Autón. de

Campeche Univ. Nal. Autón. de México Instituto Nacional de Ecología. Tlacopac, México. 451-474p.

Núñez-Nogueira, G.,J.B. Ordoñez, M.R. Rosiles. 1998. Mercury distribution and concentration in tissues of *Rhizoprionodon terraenovae* shark from the Gulf of Mexico. *Vet. Mex.* 29(1): 15-21.

Otto, D., T. Moon. 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish Physiol. Biochem.* 15(4): 349-358.

Pardo-Gandarillas, M.C., F. Duarte, J. Chong, C.M. Ibáñez. 2007. Dieta de tiburones juveniles *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)(Carcharhiniformes: Carcharhinidae) en la zona litoral centro-sur de Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 42(3): 365-369.

Parvez, S., S. Pandey, M. Ali, S. Raisuddin. 2006. Biomarkers of oxidative stress in Wallago attu (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. *Sci. Total Environ.* 368(2-3): 627-636.

Payne, E., D. Taylor. 2010. Effects of Diet Composition and Trophic Structure on Mercury Bioaccumulation in Temperate Flatfishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(2): 431-443.

Peraza, L. 2008. Catalasa. En: Konigsberg, M. (ed). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual Moderno. México D.F. 183-200p.

Persky, A.M., P.S. Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A. Brazeau, J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223(1): 59-66.

Pethybridge, H., D. Cossa, E.C.V. Butler. 2010. Mercury in 16 demersal sharks from southeast Australia: Biotic and abiotic sources of variation and consumer health implications. *Mar. Environ. Res.* 69(1): 18-26.

Piraino, M.N., D.L. Taylor. 2009. Bioaccumulation and trophic transfer of mercury in striped bass (*Morone saxatilis*) and tautog (*Tautoga onitis*) from the Narragansett Bay (Rhode Island, USA). *Mar. Environ. Res.* 67(3): 117-128.

Pratt, J.R. 1979. Reproduction in the blue shark, *Prionace glauca*. *Fish. Bull.* 2(2): 445-470.

Rodríguez-Meza, G.D., E. Shumilin,D. Sapozhnikov, L. Méndez-Rodríguez, B. Acosta-Vargas. 2009. Evaluación geoquímica de elementos mayoritarios y oligoelementos en los sedimentos de Bahía Concepción (B.C.S., México). *Bol. Soc. Geol. Mex.* 61: 57-72.

Rosas-Luis, R., C.A. Salinas-Zavala, V. Koch, P.D.M. Luna, M.V. Morales-Zárata. 2008. Importance of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) in the pelagic ecosystem of the central Gulf of California. *Ecol. Model.* 218(1-2): 149-161.

Rudneva, I.I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 118(2): 255-260.

- Ruiz-Cooley, R.I., U. Markaida, D. Gendron, S. Aguñiga. 2006. Stable isotopes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) beaks to estimate its trophic position: comparison between stomach contents and stable isotopes. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 86(02): 437-445.
- Salinas-Zavala, C.A., G. Bazzino-Ferreri, S. Camarillo-Coop, R. Rosas-Luis, A. Mejía-Rebollo, J. Ramos-Castillejos. 2010. El calamar gigante *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835). En: Gaxiola-Castro, G., Durazno, R. (eds). *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997-2007*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F. 469-486p.
- Sanz, A., M.C. Hidalgo, M. A.E., C. Cillero, A. Domezain, J. Domezain, M. Garcia-Gallego, 2001. Evolution of antioxidant defenses and lipid peroxidation with age in the sturgeon *Acipenser naccarii*. *Proceedings of the 4th International Symposium on Sturgeon*.
- Sciarrotta, T.C., D.R. Nelson. 1977. Diel behaviour of the blue shark, *Prionace glauca*, near Santa Catalina Island, California. *Fish. Bull.* 75: 519-528.
- Semedo, M., M.A. Reis-Henriques, L. Rey-Salgueiro, M. Oliveira, C. Delerue-Matos, S. Morais, M. Ferreira. 2012. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in octopus (*Octopus vulgaris*) from Northwest Atlantic. *Sci. Total Environ.* 433(0): 230-237.
- Sies, H. 1985. *Oxidative stress*. Academic Press Inc. Primera Edición. Orlando, FL. 477p.
- Sosa-Nishizaki, O., J.F. Márquez-Farías, C.J. Villavicencio-Garayzar. 2008. Case Study: Pelagic Shark Fisheries along the West Coast of Mexico. En: Camhi, M.D., Pikitch, E.K., Babcock, E.A. (eds). *Sharks of the Open Ocean: biology, fisheries and conservation*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 275-282p.
- Stevens, J.D. 1976. First results of shark tagging in the north-east Atlantic, 1972-1975. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 56(4): 929-937.
- Stevens, J.D., 2005. *Prionace glauca*. En: IUCN-2010. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org. 25 Mayo de 2011.
- Stevens, J.D., R.W. Bradford, G.J. West. 2010. Satellite tagging of blue sharks (*Prionace glauca*) and other pelagic sharks off eastern Australia: depth behaviour, temperature experience and movements. *Mar. Biol.* 157(3): 575-591.
- Storelli, M., G. Cuttone, G. Marcotrigiano. 2011. Distribution of trace elements in the tissues of smooth hound *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) from the southern-eastern waters of Mediterranean Sea (Italy). *Environ. Monit. Assess.* 174(1): 271-281.
- Storelli, M.M., V.P. Busco, G.O. Marcotrigiano. 2005. Mercury and Arsenic Speciation in the Muscle Tissue of *Scyliorhinus canicula* from the Mediterranean Sea. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75(1): 81-88.
- Storelli, M.M., E. Ceci, A. Storelli, G.O. Marcotrigiano. 2003. Polychlorinated biphenyl, heavy metal and methylmercury residues in hammerhead sharks: contaminant status and assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 46(8): 1035-1039.

- Storelli, M.M., R. Giacomini-Stuffler, G. Marcotrigiano. 2002. Mercury Accumulation and Speciation in Muscle Tissue of Different Species of Sharks from Mediterranean Sea, Italy. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68(2): 201-210.
- Storelli, M.M., G.O. Marcotrigiano. 2004. Interspecific variation in total arsenic body concentrations in elasmobranch fish from the Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 48(11-12): 1145-1149.
- Storelli, M.M., R.G. Stuffler, G.O. Marcotrigiano. 2001. Total mercury and methylmercury in tuna fish and sharks from the South Adriatic Sea. *Italian Journal of Food Science.* 13(1): 101-106.
- Strasburg, D.W. 1958. Distribution, abundance, and habits of pelagic sharks in the central Pacific Ocean. *Fish. Bull.* 138(58): 335-361.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (eds). *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species.* Oxford University Press. U.K. 91-95p.
- Suzuki, K.T., H. Tamagawa, K. Takahashi, N. Shimojo. 1990. Pregnancy-induced mobilization of copper and zinc bound to renal metallothionein in cadmium-loaded rats. *Toxicology.* 60(3): 199-210.
- Tricas, T. 1979. Relationship of the blue shark, *Prionace glauca* and its prey species near Santa Catalina Island, California. *Fish. Bull.* 77(1): 175-182.
- United States Environmental Protection Agency, 2007. Technology transfer network air toxic. En: EPA. Washington, USA. <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/cadmium.html> Febrero 2013.
- Valko, M., H. Morris, M.T.D. Cronin. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 12(10): 1161-1208.
- Van Holde, K.E., K.I. Miller, H. Decker. 2001. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *J. Biol. Chem.* 276(19): 15563-15566.
- Vas, P. 1987. Observations of trace metal concentrations in a carcharhinid shark, *Galeorhinus galeus*, from Liverpool Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 18(4): 193-194.
- Vas, P. 1991. Trace metal levels in sharks from British and Atlantic waters. *Mar. Pollut. Bull.* 22(2): 67-72.
- Velasco-Tarelo, P.M. 2005. Hábitos alimenticios e isótopos de ¹³C y ¹⁵N del tiburón mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810) en la costa occidental de BCS, México. Tesis de Maestría. CICIMAR - Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B.C.S. 103p.
- Velez, M. 2009. Indicadores de estrés oxidativo relacionados con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico) en diferentes tejidos del tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) Tesis de Maestría. CIBNOR. La Paz, B.C.S. 76p.
- Wagemann, R., E. Trebacz, G. Boila, W.L. Lockhart. 1998. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. *Sci. Total Environ.* 218(1): 19-31.

- Wang, W. 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms — Overview. *Environ. Int.* 13(6): 437-457.
- Watras, C.J., R.C. Back, S. Halvorsen, R.J.M. Hudson, K.A. Morrison, S.P. Wentz. 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Sci. Total Environ.* 219(2-3): 183-208.
- Wdzięczak, J., G. Zaleśna, E. Wujec, G. Pérès. 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 73(2): 361-365.
- Zambonino, J.-L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez, C. Cahu. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. En: Cyrino, J.E.P., Bureau, D.P., Kapoor, B.G. (eds). *Feeding and Digestive Function of Fishes*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Hampshire. 281-348p.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Cuarta Edición. Upper Saddle River, NJ. 389-394p.

11 ANEXOS

Anexo 1. Concentraciones (mg kg^{-1} peso seco, dw) de los elementos traza en tejidos del tiburón azul (*Prionace glauca*), calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y langostilla (*Pleuroncodes planipes*) capturados en Baja California Sur.

Tejido	Grupo	Cu	Fe	Zn	Cd	Pb
Músculo	HI	7.09±1.26	117.11±11.29	27.40±1.10	2.91±1.04	0.27±0.05
	HM	9.79±0.94	160.22±50.97	36.43±5.55	0.07±0.04	0.40±0.10
	MIm	3.72±0.26	109.65±30.02	23.42±1.86	<0.02 ^{MDL}	<0.07 ^{MDL}
	MIId	8.39±0.84	126.10±34.63	24.86±1.41	0.07±0.04	0.13±0.05
	Tiburón	7.54±0.6	129.23±17.34	28.39±1.77	0.95±0.61	0.23±0.04
	Calamar	32.45±6.74	18.29±3.11	98.41±4.76	11.17±2.18	0.56±0.06
	Langostilla					
Hígado	HI	7.65±1.20	163.35±14.12	38.95±2.70	22.91±2.61	0.48±0.12
	HM	5.62±v	234.68±43.20	41.84±4.02	30.77±5.25	0.30±0.09
	MIm	18.12±5.43	247.70±54.61	87.85±19.33	74.08±21.33	0.35±0.22
	MIId	9.04±3.04	161.51±13.35	46.23±3.96	26.63±5.10	0.37±0.09
	Tiburón	9.28±1.42	195.68±16.15	49.95±4.58	34.66±5.01	0.38±0.06
	Calamar	1105.89±90.77	147.37±10.92	1833.88±371.17	662.36±143.71	0.76±0.12
Riñón	HI	8.72±0.72	160.69±11.48	59.20±1.05	4.81±0.54	1.49±0.07
	HM	7.57±0.83	175.79±21.88	61.76±2.00	6.79±1.17	1.41±0.09
	MIm	8.09±1.49	201.66±41.33	69.16±11.60	13.74±6.47	0.96±0.15
	MIId	8.17±0.83	215.55±45.99	58.07±2.03	4.19±0.56	1.55±0.11
	Tiburón	8.17±0.44	185.7±15.06	61.28±2.1	6.69±1.23	1.4±0.06

MDL: Límite mínimo de Detección

HI: Hembras Inmaduras; HM: Hembras maduras; MIm: Machos Inmaduros mayo; MIId: Machos Inmaduros diciembre

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

Anexo 2. Concentraciones (mg kg^{-1} ww) de elementos traza reportados por tejido para diferentes especies de tiburones.

Músculo	T Hg	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb	Región	Referencia
<i>Prionace glauca</i>	0.16-1.84						Canarias	Branco <i>et al.</i> , 2004
<i>Prionace glauca</i>	0.16-1.2						Azores	Branco <i>et al.</i> , 2004
<i>Prionace glauca</i>	0.22-1.3						Azores	Branco <i>et al.</i> , 2007
<i>Prionace glauca</i>	0.68-2.5						Atlántico EC	Branco <i>et al.</i> , 2007
<i>Prionace glauca</i>	0.27-1.20						Tasmania	Davenport, 1995
<i>Prionace glauca</i>	0.82±0.34						Mexico	Maz y Lopez, 2006
<i>Prionace glauca</i>	0.38						Mediterraneo	Storelli <i>et al.</i> , 2001
<i>Prionace glauca</i>		0.24		6.34	0.45	<0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Carcharias arenarius</i>	0.06-1.48						Australia	Denton y Breck, 1981
<i>Carcharhinus albimarginatus</i>	1.80±0.45		3.40±0.81	3.26±1.93			Japan	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Carcharhinus dorsalis</i>	0.03-1.6						Australia	Caputi <i>et al.</i> , 1979
<i>Carcharhinus leucas</i>	3.65		4.36	3.51			Japan	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Carcharhinus leucas</i>	0.24-1.70						Florida	Adams y McMichael, 1999
<i>Carcharhinus limbatus</i>	3.33	1.06	43.97		0.35	2.51	Atlántico	Núñez-Nogueira, 2005
<i>Carcharhinus limbatus</i>	0.24	0.31	3.11		0.01	0.16	Pacífico	Powell y Powell, 2001
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	1.66		3.35	1.99			Japan	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Carcharhinus signatus</i>	1.77±0.56						Brazil	Pinho <i>et al.</i> , 2002
<i>Carcharhinus spallanzani</i>	0.49-2.14						Australia	Denton y Breck, 1981
<i>Galeocerdo cuvier</i>	0.73±0.26		4.73±2.53	3.14±1.84			Japan	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Galeocerdo cuvier</i>	0.84±0.32		4.70±4.21	3.04±0.92			Japan	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Galeorhinus galeus</i>	0.52-1.13						Argentina	Perez <i>et al.</i> , 1985
<i>Galeorhinus galeus</i>		0.5		3.55	0.01	0.14	Inglaterra	Vas, 1987
<i>Galeorhinus galeus</i>		0.44	2.12	3.14	<0.02	0.16	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeorhinus galeus</i> I		0.36	2.12	5.05	0.01	0.21	Inglaterra	Vas, 1987

Angélica Ma. Barrera-García

<i>Galeus melastomus</i>		0.22		1.99	0.08	0.16	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeus melastomus</i>		0.22					Inglaterra	Vas y Gordon, 1993
<i>Galeus melastomus</i>	0.99-8.76	0.45	3.63		0.07		Mediterráneo	Hornung <i>et al.</i> , 1993
<i>Isurus oxyrinchus</i>	0.40451				0.06	0.29	México	Velez, 2009
<i>Isurus oxyrinchus</i>	> 0.45						Tailandia	Menasveta y Siriyong, 1977
<i>Isurus oxyrinchus</i>	1.58	0.35	4				Pacífico	Vlieg <i>et al.</i> , 1993
<i>Lamna nasus</i>	0.68	0.4	4				Pacífico	Vlieg <i>et al.</i> , 1993
<i>Lamna nasus</i>			7.21	0.6	0.79		Inglaterra	Vas, 1991
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.08608						Florida	Dong-Ha <i>et al.</i> , 2010
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.1168						Florida	Dong-Ha <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphyrna blochii</i>	0.21±0.03						India	Kureishy <i>et al.</i> , 1979
<i>Sphyrna lewini</i>	0.38	0.37	3.8		0.02	0.14	Pacífico	Powell y Powell, 2001
<i>Sphyrna tiburo</i>	0.13-1.50						Florida	Adams y McMichael, 1999
<i>Sphyrna zygaena</i> JA	12.15	1.01-1.82	6.79-7.13		0.02-0.03	0.02-0.04	Mediterráneo	Storelli <i>et al.</i> , 2003
Hígado	T Hg	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb	Región	Referencia
<i>Prionace glauca</i> B	0.15-2.2						Atlántico EC	Branco <i>et al.</i> , 2007
<i>Prionace glauca</i> B	0.032-0.96						Azores	Branco <i>et al.</i> , 2007
<i>Prionace glauca</i>		0.65		4.02	0.25	1.14	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Carcharhinus leucas</i> B	28.1	2.38	5.02	69.7	2.97		Japón	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	3.62	4.07	6.16	102	0.73		Japón	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Carcharhinus albimarginatus</i>	0.70±0.42	1.470±0.43	4.28±1.07	25.3±17.3	0.26±0.46		Japón	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Galeocerdo cuvier</i> F	1.60±4.57	1.70±0.75	2.86±0.61	20.3±7.1	0.18±0.34		Japón	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Galeocerdo cuvier</i> M	0.81±1.18	1.65±0.74	2.89±1.12	20.1±6.3	0.13±0.13		Japón	Endo <i>et al.</i> , 2008
<i>Galeorhinus galeus</i>		0.45	1.44	10.15	<0.02	<0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeorhinus galeus</i> F		0.6	1.44	5.16	0.01	0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeorhinus galeus</i> M		0.31		15.134	0.01	0.02	Inglaterra	Vas, 1991

Elementos Traza y Estrés Oxidativo en el Tiburón Azul

<i>Galeus melastomus</i>	0.25		4.65	0.07	0.26		Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeus melastomus</i>	0.25						Inglaterra	Vas y Gordon, 1993
<i>Isurus oxyrinchus</i>	0.05379			1.12	0.14		México	Velez, 2009
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.134						Florida	Nam <i>et al</i> , 2010
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.069						Florida	Nam <i>et al</i> , 2010
Riñón	T Hg	Cu	Zn	Fe	Cd	Pb	Región	Referencia
<i>Galeorhinus galeusF</i>		1.03	5.63	2.42	0.01	0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeorhinus galeus M</i>		0.6		12.06	0.01	0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeorhinus galeus</i>		0.82	5.63	7.24	<0.02	<0.02	Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeus melastomus</i>		0.02		3.16	0.25		Inglaterra	Vas, 1991
<i>Galeus melastomus</i>		<0.02					Inglaterra	Vas y Gordon, 1993
<i>Isurus oxyrinchus</i>	0.04771				0.97	0.27	México	Velez, 2009
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.0348						Florida	Nam <i>et al</i> , 2010
<i>Negaprion brevirostris</i>	0.042						Florida	Nam <i>et al</i> , 2010

Anexo 3. Oxidative stress indicators and trace elements in the blue shark (*Prionace glauca*) off the east coast of the Mexican Pacific Ocean.

Barrera-García, A.M., O'Hara, T., Galván-Magaña, F., Méndez-Rodríguez, L.C., Castellini, J.M., Zenteno-Savín, T.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 156 (2012) 59-66.