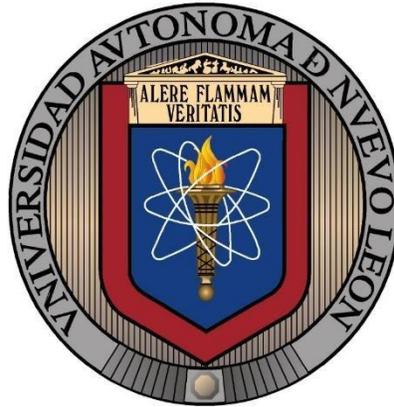


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS EN SALAMANDRAS  
(*AMBYSTOMA SP.*) EN LOCALIDADES DEL SUR DE NUEVO LEÓN**

**PRESENTADA POR**

**MVZ. LUCERO AIDE ORTIZ TELLO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**AGOSTO, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS EN SALAMANDRAS  
(*AMBYSTOMA SP.*) EN LOCALIDADES DEL SUR DE NUEVO LEÓN**

**PRESENTADA POR**

**MVZ. LUCERO AIDE ORTIZ TELLO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**AGOSTO, 2017**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS EN SALAMANDRAS  
(*AMBYSTOMA SP.*) EN LOCALIDADES DEL SUR DE NUEVO LEÓN.**

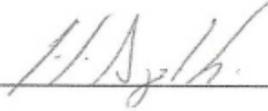
**Comité de Tesis**



---

**Dr. Julio César Cruz Valdez**

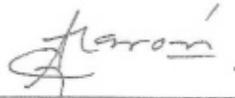
**Director**



---

**Dr. Carlos Javier Aguilera González**

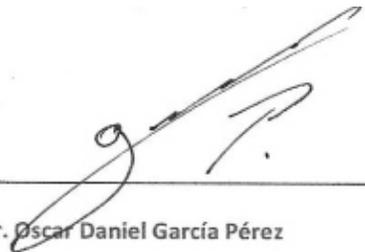
**Director Externo**



---

**Dra. Alicia Guadalupe Marroquín Cardoña**

**Co-Asesor**



---

**Dr. Oscar Daniel García Pérez**

**Co-Asesor**



---

**Dra. Aimé Garza Arredondo**

**Co-Asesor**

## **DEDICATORIAS**

A mi familia. Por estos 7 años lejos de ustedes.

A todas las personas que contribuyeron a este proyecto, porque sin ustedes no habiéramos alcanzado el ¡éxito!

En honor a los Ajolotes, las especies en peligro de extinción y aquellas que han perdido la guerra.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia por apoyarme siempre en mis decisiones y ser el mástil de mi barco hacia el éxito. Entiendo que fueron años muy duros, en los que la distancia y el trabajo, me alejaban de nuestros tiempos juntos, pero siempre estaban ahí, al pendiente de cada situación, Gracias también por soportar mis largas pláticas, desahogos y frustraciones.

Al Dr. Julio Cruz por permitirme trabajar hombro a hombro con él. Sobre todo por esos días con largas asesorías y mis constantes preguntas. Sé que no ha sido fácil. ¡Pero lo logramos! También por nunca dejarme sola y sentir siempre que estaba para apoyarme.

Al Dr. Carlos Aguilera por la oportunidad de trabajar con él. Siempre brindarnos su apoyo tanto a mi asesor como a mí. Y por supuesto a su familia que con una sonrisa nos recibieron con los brazos abiertos.

A la Dra. Alicia Marroquín por sus consejos y su tiempo, por siempre resolver todas mis preguntas, dudas e inquietudes. Avivar siempre mi sentido de la curiosidad. ¡Ahora no paro nunca! Siempre encuentro algo nuevo que leer.

A mis compañeros de maestría por estar siempre presentes y mostrarme una cara amigable cuando necesitaba una. Por esas largas tardes de estudio y esas pláticas. Y por los ánimos que nos dábamos mutuamente para seguir avanzando. Y los aplausos en cada seminario.

Y a todos mis amigos, que siempre me mostraban la luz cuando mi cabeza daba vueltas en la confusión. Especialmente aquellas personas que sin saberlo se volvieron esenciales para continuar con mi trabajo, ustedes saben quiénes son.

¡Muchas gracias a todos! Porque cada uno de ustedes contribuyo de manera especial a este trabajo, aunque desconozcan como. Sigán Adelante y Cumplan sus sueños.

La Maestría acabó pero no es un final, es el inicio de una nueva aventura llena de retos.

**“La única manera de hacer un trabajo genial es amar lo que haces. Si no lo has encontrado sigue buscando. Y como cualquier gran relación, se pondrá mejor y mejor conforme los años pasen. Así que sigue buscando hasta que lo encuentres. No te detengas”**

**-Steve Jobs-**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
ÍNDICE DE TABLA .....	4
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	5
ABSTRACT .....	7
RESUMEN .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
ANTECEDENTES .....	11
JUSTIFICACIÓN .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
RESULTADOS .....	34
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES .....	54
LITERATURA CITADA .....	55
ANEXOS .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista satelital de las localidades. La localidad (1) San José, Localidad 2 (Refugio de los Ibarra) y localidad 3 (José-Ibarra) en orden de izquierda a derecha.

Figura 2. Ubicación de las cuatro zonas de muestreo en la Localidad 2.

Figura 3. Gráfico de los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. La localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 4. Gráfico de los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 5. Gráfico de los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúscula diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 6. Gráfico de los niveles de actividad de glutatión-s-transferasa en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 7. Gráfico de los niveles de actividad de glutatión-s-transferasa en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 8. Gráfico de los niveles de actividad de glutatión-s-transferasa en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 9. Gráfico de los niveles de actividad de carboxilesterasa en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 10. Gráfica de los niveles de actividad de carboxilesterasa en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 11. Gráfico de los niveles de actividad de carboxilesterasa en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar ( $p < 0.05$ ).

Figura 12. Gráfico de los niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en las localidades de muestreo. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 13. Gráfico de los niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio  $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

Figura 14. Gráfico de los niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

## ÌNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros físicos y químicos de las localidades al momento de la colecta. La localidad 2 se dividió en cuatro zonas de muestreo.

Tabla 2. Valores de correlación entre biomarcadores y parámetros físicos y químicos.

Tabla 3. Valores de la correlación entre los biomarcadores analizados con respecto al peso y talla de los organismos.

## INDICE DE ABREVIATURAS

$\mu$ L: micro litro

ALP: Fosfatasa alcalina

Camp: adenosina 3', 5' monofosfato cíclica

CaE: Carboxilesterasa

cm: centímetros

G: gramos

GST: Glutación-s-transferasa

H: hembras

HAP. Hidrocarburos aromáticos poli cíclicos

HCL: ácido clorhídrico

M: machos

Mg: miligramo

mL: mililitro

mM: miliMolar

N.L.: Nuevo León

ORAC: capacidad de absorbanca de radicales de oxígeno

pH: potencial de hidrógeno

r: coeficiente de correlación

ROS: especies reactivas de oxigeno

rpm: revoluciones por minuto

SPSS: paquete estadístico para las ciencias sociales

$\Delta$ : delta

V: volumen

Venz: volumen de muestra analizado

Vmax: velocidad máxima

## ABSTRACT

Because of their biological characteristics, amphibians are very sensitive to environmental disturbances. The drastic reduction of amphibians in the world is a clear consequence of environmental degradation. The *Ambystoma* sp. are urodels distributed in several regions of Mexico and are an excellent bioindicator of environmental quality. Physiological parameters such as enzyme activity are known as biomarkers, and are used to monitor environments. Enzymatic activities can vary in response to stress stimulus either by xenobiotics or environmental changes. In *Ambystoma* sp. the sensitivity of biomarkers to assess their potential in habitat monitoring has not been evaluated. An assessment of activity levels of biomarker enzymes such as alkaline phosphatase (ALP), glutathione-s-transferase (GST), carboxylesterase (CaE) and non-enzymatic antioxidant levels was performed using the Radical Absorption Capacity technique of oxygen (ORAC). Biomarkers were evaluated in samples obtained from *Ambystoma* sp. Animals were collected and sexed in three different locations in the southern region of Nuevo Leon. Physical and chemical parameters corresponding to each locality were measured. The four biomarkers evaluated had different levels of activity and concentration between the localities ( $P < 0.05$ ), the levels of the biomarkers varied according to the sex of the organisms, being higher in the male ( $P < 0.05$ ). ALP and ORAC showed a significant correlation with respect to temperature, while CaE and ALP were correlated with pH, CaE and ORAC with dissolved solids. The results observed in the sensitivity of the biomarkers evaluated in the potential they have to be used in the monitoring programs in the habitat of *Ambystoma* sp. And that allow to determine environmental alterations detrimental to these ecosystems and the species of amphibians that inhabit them.

Key Words: *Ambystoma* sp.; Biomarkers; Amphibians

## RESUMEN

Los anfibios son sensibles a perturbaciones ambientales por sus características biológicas. Se ha considerado que la drástica reducción de anfibios en el mundo es resultado de una degradación ambiental. Los *Ambystoma sp.* son urodelos que se distribuyen en varias regiones de México, son considerados un excelente bioindicador de calidad ambiental. Parámetros fisiológicos como la actividad de enzimas varían en respuesta a un estímulo de estrés ya sea por xenobióticos o cambios ambientales, se conocen como biomarcadores, se usan para monitorear ambientes. En *Ambystoma sp.* no se ha evaluado la sensibilidad de biomarcadores para conocer su potencial en el monitoreo del hábitat. Se realizó una evaluación de los niveles de actividad de enzimas biomarcadoras, fosfatasa alcalina (ALP), glutatión-s-transferasa (GST), carboxilesterasa (CaE) y los niveles de antioxidantes no enzimáticos mediante el uso de la técnica de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Los biomarcadores se evaluaron en muestras branquiales obtenidas de organismos *Ambystoma sp.* los cuales fueron colectados y sexados en tres distintas localidades del sur de Nuevo León, se midieron parámetros físicos y químicos correspondientes a cada localidad. Los cuatro biomarcadores evaluados (ALP, GST, CaE y ORAC) presentaron diferentes niveles de actividad y concentración entre localidades ( $P < 0.05$ ), al comparar los niveles de los biomarcadores con respecto al sexo de los organismos, solamente la CaE presentó una diferencia significativa al ser mayor en los machos ( $P < 0.05$ ). La ALP y ORAC presentaron una correlación significativa con respecto a temperatura, CaE y ALP presentaron correlación con pH, y CaE y ORAC con sólidos disueltos. Los resultados observados en la sensibilidad de los biomarcadores evaluados muestran el potencial que tienen para ser utilizados en programas de monitoreo en el hábitat de *Ambystoma sp.* y que permitan determinar alteraciones ambientales perjudiciales para estos ecosistemas y las especies de anfibios que los habitan.

Palabras Clave: *Ambystoma sp.*; biomarcadores; Anfibios

## INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un grupo de vertebrados que poseen características biológicas que los hacen sensibles a las perturbaciones ambientales: ciclo de vida complejo, reproducción asociada a medios acuosos, estados larvarios con requerimientos de hábitat y alimentos diferentes a los de su estado adulto, capacidad de dispersión limitada, territorios pequeños y piel altamente permeable, facilitadora del intercambio directo entre el organismo y el medio ambiente. Algunos naturalistas consideran que la drástica reducción poblacional de anfibios en el mundo es resultado de una degradación ambiental global tan severa que los anfibios son ahora indicadores del declive de la calidad de vida de nuestro planeta (Suazo y Alvarado, 2004).

El Género *Ambystoma* está integrado por un grupo de anfibios urodelos pertenecientes a la familia Ambystomatidae, son llamados salamandras o ajolotes, habitan en gran parte de América del Norte desde el sur de Canadá hasta el Eje Transversal de México (Casas-Andreu *et al.*, 2004). En México, las salamandras de ésta familia presentan el mayor número de especies con al menos 80 de ellas endémicas. Los ajolotes son una especie exclusiva en los lagos y canales viviendo exclusivamente en agua aunque tienen la capacidad de vivir tanto dentro como fuera de ella. La fase larvaria de esta especie presenta cabeza ancha con penachos branquiales rosados (los cuales varía según la oxigenación del agua donde habitan), los ojos grandes y un cuerpo alargado aplanado lateralmente, poco más largo que la cola que se presenta comprimida, y tiene una cresta dorsal que nace hacia la mitad del tronco. Varias especies de esta familia se encuentran en peligro de extinción por el deterioro de su hábitat (Robinson, 2012).

Estos organismos habitan en áreas cubiertas de bosque las cuales han sido fragmentadas y alteradas con la consecuente disminución de sus poblaciones, lo que ha provocado que algunas especies de esta familia se encuentran en la categoría de protección especial según la NOM-059-ECOL-2001 (Solano-Zavaleta *et al.*, 2009). Adicionalmente la desecación de las lagunas y lagos, así como el azolvamiento, la contaminación y la introducción de depredadores exóticos y la captura comercial están jugando un papel muy importante en la

disminución de las poblaciones y esto traerá eventualmente la extinción de las especies (Casas-Andreu *et al.* 2004).

En términos generales es un grupo de interés, no solo por sus particularidades biológicas y ecológicas sino también por su marcada vulnerabilidad ante la transformación y degradación de los ecosistemas que habitan (Acosta-Galvis, 2000).

Los cambios biológicos en las especies sirven como señales de la posible alteración de un ecosistema, estas alteraciones pueden ser causadas por actividades antropogénicas. Algunos parámetros fisiológicos como la actividad de enzimas varían en respuesta a un estímulo de estrés provocado por presencia de xenobióticos o cambios ambientales, se conocen como biomarcadores, y son comúnmente utilizados para monitorear ambientes. El uso y desarrollo de biomarcadores ha cobrado un interés creciente para evaluar el riesgo de sustancias potencialmente tóxicas además de ser herramientas útiles para determinar la presencia de sustancias exógenas o cambios ambientales (Argota, 2013). Los niveles de respuesta biológica representan una expresión integrada de los niveles de alteración de un área específica indicando posibles riesgos en las poblaciones naturales expuestas (Argota, 2013).

En anfibios del género *Ambystoma sp.* no se ha evaluado la sensibilidad de biomarcadores para conocer su potencial en el monitoreo de sus hábitat. Debido a lo anterior y al conocimiento de la sensibilidad que presentan estos organismos a los cambios ambientales con la consecuente disminución drástica de sus poblaciones, se realizó una evaluación de los niveles de actividad de enzimas biomarcadoras en poblaciones de distintas localidades en municipios del sur de Nuevo León, las enzimas biomarcadoras evaluadas fueron alcalina fosfatasa (ALP), glutatión-s-transferasa (GST), carboxilesterasa (CaE) y los niveles de antioxidantes no enzimáticos mediante el uso de la técnica de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

## ANTECEDENTES

Las actividades humanas están causando alteraciones en las comunidades biológicas, transformando los ecosistemas. Los ciclos biogeoquímicos e hidrológicos así como nuestro propio clima se ha visto perturbado en gran parte por la demanda de recursos y materiales de una población humana que sigue creciendo. Algunos países realizan evaluaciones del impacto ambiental de las actividades humanas sobre áreas protegidas como el decreto 1995 del Camerún (art.21) y la ley de Guinea (art.40), esto debido a que en la actualidad las especies se ven amenazadas por una gran cantidad de factores producto de las acciones humanas, como son la contaminación, el uso de químicos en el ambiente y la urbanización que han causado la disminución acelerada de las poblaciones de muchas especies, en algunos casos hasta su extinción. Las poblaciones y especies mantienen procesos naturales de extinción este proceso es natural ya que han sido compensadas por la evolución de nuevas especies, así como la pérdida local de una población por el establecimiento de una nueva población mediante la dispersión, sin embargo, las actividades humanas han multiplicado exageradamente la tasa natural de extinción (Pisanty y Caso, 2007; Primack, 2002).

A partir del siglo XX el monitoreo para evaluar la diversidad biológica adquirió importancia conforme la población humana crecía y se requería mayor uso de recursos. Los investigadores comenzaron por aportar datos sobre diferentes aspectos biológicos en diferentes escalas de tiempo. Producto de esto se han establecido leyes que tienen normas sobre protección de las especies, mediante el uso de una clasificación de los organismos (Pisanty y Caso, 2007; Cirelli, 2002).

La problemática de la alteración de ecosistemas con la consecuente extinción de especies ha permitido el desarrollo de disciplinas como la biología de la conservación la cual trata de comprender el funcionamiento de los ecosistemas y sus interacciones con factores bióticos y abióticos. Este entendimiento permite predecir cambios en el funcionamiento de un ecosistema al alterar alguno de los factores componentes. La conservación y protección de las especies en todos los países busca preservar la diversidad biológica reduciendo al mínimo los impactos negativos y destructivos que actualmente acarrearán las actividades humanas,

impulsando programas y acciones que buscan restaurar y rehabilitar los ecosistemas así como sus comunidades. Para esto es necesario utilizar y desarrollar técnicas que nos permitan conocer las condiciones de un ecosistema, una comunidad o una población determinada y de esta forma poder detectar cualquier cambio en esas condiciones que nos indique la presencia de una alteración o perturbación y así poder realizar las medidas correctivas necesarias. Un ecosistema es un sistema natural compuesto de organismos individuales que comparten un mismo hábitat, los mismos forman cadenas que muestran la interdependencia entre ellos. Los ecosistemas están en continua exposición a diferentes componentes físicos y químicos que pueden ser naturales o artificiales (Harrison, 2003; Sornom, 2010). El cambio de estos componentes puede ocasionar una respuesta fisiológica y/o poblacional en alguno de los componentes biológicos del ecosistema, a este efecto se le denomina estrés.

Todos los niveles de la diversidad biológica son necesarios para la supervivencia de especies y comunidades naturales y todos son de importancia para los seres humanos, ya que proporcionan recursos y alternativas a éstos (Primack, 2002), sin embargo, existen algunas especies que por sus características biológicas e interacciones con su ecosistema, nos pueden permitir observar de forma rápida y con una mayor resolución las alteraciones en el mismo.

## **1. Anfibios**

La clase Amphibia se divide en tres grandes órdenes: Anura, este grupo incluye a ranas y sapos, y presenta la mayor diversidad de especies dentro de los anfibios; Apoda, del que forman parte las cecilias; y Caudata, que comprende a las salamandras (Rollins-Smith, 2016).

Los anfibios son un grupo de vertebrados adaptados a la vida semiterrestre, comparten características biológicas como la permeabilidad de su piel, reproducción en medios acuáticos y su ciclo de vida en dos fases, una fase larval y una fase adulta. Estas características como la permeabilidad de su piel y poseer una fase acuática y otra terrestre los hace especialmente

susceptibles a cambios físicos o químicos en su ambiente, lo cual los vuelve muy vulnerables a la transformación y degradación de los ecosistemas que habitan (Rollins-Smith, 2016).

El corazón de los anfibios se encuentra formado por un único ventrículo y dos aurículas y su funcionamiento es variable a lo largo de su ciclo de vida. En estado normal la sangre venosa permanece en la aurícula derecha mientras que la sangre oxigenada de las arterias pulmonares permanece en la aurícula izquierda, esta sangre es bombeada de forma que estas no se mezclen, sin embargo, en estado de hibernación esta mezcla si se produce (Cano-Martínez, 2010).

En todo el mundo las poblaciones de anfibios están disminuyendo en algunos casos de forma dramática y algunas especies se consideran en peligro de extinción. México no es una excepción, los anfibios son actualmente en este país uno de los grupos que se encuentran más amenazados y esto puede ser en gran parte a su alta sensibilidad al ambiente que les rodea, el cual continuamente es expuesto a contaminación o cambios ambientales producto de actividades antropogénicas, todo esto aunado a una continua destrucción de su hábitat los ha expuesto a condiciones no favorables llevando a muchos de ellos a la extinción (Rollins-Smith, 2016).

La pérdida de hábitat, así como la fragmentación del mismo también representa una amenaza, pues estos procesos resultan en la disminución de la cantidad total del hábitat. Las reacciones a estas alteraciones varían considerablemente entre las especies (Riemann *et al.* 2015).

En la actualidad el fenómeno de extinción de especies en anfibios es conocido y muy preocupante, lo que indica que estamos enfrentando la crisis de extinción más grande de especies observada por la humanidad. Los continuos cambios en las comunidades de anfibios tienen un impacto en la persistencia de la biodiversidad, abundancia y composición del ecosistema, sin mencionar que son éstos organismos con ciclo de vida complejo quienes

nos proporcionan una mayor información acerca de los hábitat y si estos son favorables u hostiles (Becker *et al.* 2016; Winandy *et al.* 2015; Chang and Wu, 2015).

## 2. *Ambystoma sp.* como especie bioindicadora

La calidad del aire, agua o la tierra debe evaluarse continuamente para tomar decisiones y medidas que puedan evitar algún evento que no sea favorable para la vida en el planeta. Los organismos que pertenecen a un ecosistema se utilizan para obtener información sobre la calidad ambiental y son llamados indicadores biológicos, pueden serlo las comunidades microbianas y anfibias, de esta forma se pueden monitorizar los procesos naturales (Fernández-Salegui, 2003; Garbisu, 2007).

Analizar directamente los contaminantes en las matrices ambientales solo nos informan si existe un contaminante de interés en un ecosistema más no da a conocer si este contaminante esta biodisponible, e inclusive algunos pueden encontrarse en concentraciones muy bajas por lo que no son detectables. Los marcadores biológicos dan a conocer los cambios biológicos detectables tras la exposición a contaminantes, éstos pueden medirse en diversos niveles de organización biológica. Existen especies llamadas centinelas o acumuladoras o bien bioindicadores que son capaces de concentrar ciertas sustancias en sus tejidos por su extrema relación con el ambiente mismo, de este modo proporcionan información sobre el estado químico de sus hábitats y del mismo modo ofrecen conocimiento sobre la sustancia misma dentro del organismo. (Nachev and Sures, 2016; Sanni *et al.* 2016).

Un bioindicador u organismo indicador se refiere a las especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia a varios parámetros, así mismo que sus comunidades o poblaciones reflejen la condición o calidad de un sistema ambiental tanto físico, químico, biológico y ecológico. Cada región posee especies que son fácilmente identificables que son intolerables ante las alteraciones medioambientales como las causadas por el hombre. El biomonitorio de estas comunidades proporciona índices bióticos que pueden ser comparados (Vázquez *et al.* 2006).

Los *Ambystoma sp.* son un género de anfibios urodelos que poseen en la piel numerosas glándulas pluricelulares de tipo mucoso o venenoso, carecen de uñas verdaderas, algunas especies presentan estructuras epidérmicas córneas, en la punta de los dedos de la extremidad posterior, el corazón de tipo tricavitario y cráneo aplanado. Son ectotérmicos, esto quiere decir que utilizan la temperatura ambiental para regular la temperatura de su cuerpo (Zamora, 2011).

Las salamandras del género *Ambystoma* pueden ser neoténicas, esto quiere decir que pueden alcanzar su madurez sexual y reproducirse sin la necesidad de desarrollar un estado adulto, esto como una adaptación ecológica para una mejor explotación de los recursos disponibles. Poseen una concentración insuficiente de tiroxina (T4) plasmática lo que conlleva a una baja tasa de secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) bloqueando el cambio metamórfico, sin embargo esta baja producción no influye en su madurez reproductiva. (Galton, 1991; Safi *et al.* 2004).

Se ha establecido que la piel es un órgano multifuncional que actúa como un órgano defensivo contra parásitos y abrasiones pero también facilita la respiración cutánea, está cubierta de moco compuesto de glucoproteínas y material fibroso, dicha secreción es antibacteriana, y antioxidante pero su principal función es la de mantener la piel húmeda (Geng, 2015).

Los organismos de este género comúnmente miden cerca de 15 cm de largo, poseen cuatro extremidades cortas que terminan en dedos, en los miembros anteriores poseen cuatro dedos mientras que los posteriores concluyen con cinco dedos, poseen una aleta que corre por el dorso hasta convertirse en una cola comprimida lateralmente, su cabeza posee en ambos lados tres pares de branquias largas y plumosas, sus ojos están localizados laterales en la cabeza y sin un amplio campo de visión dependen de sus otros sentidos para cazar, posee orificios nasales ya que su respiración también puede ser pulmonar. La piel del *Ambystoma mexicanum* es color verde parduzco, aunque el albinismo es común (Zamora, 2011).

Sus hábitos alimenticios son nocturnos, por lo general se les encuentra en ambientes con una gran humedad, comúnmente en zonas pantanosas o en orillas de lagos.

Entre los anfibios de la familia *Ambystomatidae*, la especie que más se ha utilizado como objeto de estudio es *Ambystoma mexicanum* con innumerables trabajos en biología del desarrollo y en evolución (Aguilar *et al.* 2009).

Las poblaciones de salamandras mexicanas han sido evaluadas de forma no sistemática en los últimos 25 años a la luz de muchos informes de la desaparición de anfibios. De las más comunes persisten aproximadamente unas 30 especies aunque las densidades son cada vez más bajas de lo que era hace 25 años. La modificación del hábitat ha contribuido a las dificultades para encontrar determinadas especies (Parra *et al.* 1998).

La familia Plethodontidae es una de las más diversas, tiene alrededor de 370 especies en el mundo, distribuyéndose principalmente en Norteamérica y Sudamérica. En México es la familia de salamandras con el mayor número de especies, más de 80 de ellas son endémicas. Esta familia incluye al Género *Ambystoma* el cual está presente en gran parte de América del Norte desde el sur de Canadá hasta el Eje Transversal de México (Casas-Andreu *et al.* 2004).

Los organismos transformados a su fase semiterrestre de este género comúnmente llamados “salamandras” habitan áreas cubiertas de bosque de pino y/o bosque de oyamel, encontrándose la mayor parte del tiempo ocultas en madrigueras, bajo troncos podridos o grandes rocas (Solano-Zavaleta *et al.* 2009). Los organismos no transformados durante su fase larval o neoténica son conocidos comúnmente en México como “ajolotes” habitan en los lagos y canales viviendo exclusivamente en agua aunque tienen la capacidad de vivir tanto dentro como fuera de ella. Durante su fase larvaria su cabeza es ancha y de gran tamaño con penachos branquiales rosados (los cuales varían según la oxigenación del agua donde habitan), los ojos son grandes y bien definidos con los que detectan el movimiento, su cuerpo es alargado aplanado lateralmente y es un poco más largo que la cola que se presenta comprimida y tiene una cresta dorsal que nace hacia la mitad del tronco (el final de la cola suele ser redondeado), algunas especies de este género han sido declaradas en peligro de extinción por el deterioro de su hábitat (Robinson, 2012).

### **3. Biomarcadores**

La presencia de un tóxico implica un riesgo pero más allá de detectar el mismo dentro del ambiente hay que conocer como éste afecta el estado de salud de los individuos, es decir conocer la alteración que ocasiona sobre los componentes celulares o bioquímicos, estructuras o funciones en un organismo vivo que pueden cuantificarse en un sistema biológico o muestra (Gil, 2008)

“Biomarcador” es el término utilizado para medir la interacción de un organismo y un agente químico, físico o biológico que se evalúa como una respuesta funcional o fisiológica, ya sea a nivel celular o molecular, en muchas ocasiones asociada al desarrollo de una enfermedad (Arango, 2011). Para la evaluación de la exposición a estos agentes, es relevante la valoración de las respuestas biológicas que den cuenta de la magnitud, intensidad y frecuencia en que los organismos, que desempeñan un papel clave en el ecosistema, son afectados. (Vanegas *et al.*, 2015). El uso de estos biomarcadores ha aumentado en la última década e incluso han sido utilizados para evaluar el riesgo frente a determinadas patologías, sobre todo en enfermedades progresivas (Gil, 2008).

Los biomarcadores son más rápidos de analizar y fáciles de interpretar esto permite tomar medidas correctivas y preventivas así como decidir a qué muestras es necesario hacerles análisis químicos para determinar los contaminantes problema, su distribución espacial, temporal y las posibles fuentes de origen. En general existen tres clases de biomarcadores reconocidos por la Organización Mundial de la Salud:

#### **a) Los biomarcadores de exposición.**

Indican que un organismo estuvo o está expuesto a un contaminante específico (Vanegas *et al.*, 2015). Miden una sustancia exógena o su metabolito, o bien la interacción entre un xenobióticos y moléculas blanco dentro de un organismo. Los análisis comúnmente se realizan en fluidos corporales (como sangre y orina). En el caso de contaminantes o tóxicos

que se acumulan la dosis interna se puede reflejar en uno o varios compartimientos corporales (Gil, 2000).

**b) Biomarcador de efecto.**

Reflejan la interacción del químico con los receptores biológicos, como estas alteraciones anteceden al daño estructural, su detección permite identificar la exposición excesiva y tomar medidas preventivas. Se mide la alteración dentro de un organismo (puede ser química, fisiología o de comportamiento) y puede estar asociado a enfermedades o deterioro de la salud (Vanegas *et al.* 2015).

**c) Biomarcador de susceptibilidad.**

Son indicadores de una capacidad adquirida o inherente de un organismo para responder a cambios de exposición a un xenobiótico específico (Gil Hernandez, 2000; Vanegas *et al.* 2015).

Depledge describe en 1994 un biomarcador adicional llamado de “efecto latente” esto indica que un organismo en condiciones normales ha logrado adaptarse o sobrevivir a la exposición de un contaminante (Gil Hernandez, 2000; Walker, 1996).

De acuerdo a su especificidad también se pueden clasificar de dos formas:

- a) Nivel I, cuando los biomarcadores responden específicamente a un contaminante y por lo general implica la inhibición de enzimas.
- b) Nivel II, cuando los biomarcadores responden a un estrés subletal que implica la activación de una enzima.

Algunos ejemplos de biomarcadores enzimáticos que pueden activarse o inhibirse son las enzimas del Citocromo P450 tales como etoxiresorufin o-desetilasa, la glutatión-s-transferasa y enzimas de sistema nervioso como la acetilcolinesterasa. Algunos estudios han

asociado a las alteraciones de la actividad de estas enzimas con diversas enfermedades algunas de tipo canceroso (Gil Hernandez, 2000).

Se espera que el uso de biomarcadores proporcione información de la relación entre la exposición a un tóxico, la respuesta biológica, los efectos adversos, así como los niveles de respuesta en una comunidad. Siendo estos utilizados para el monitoreo de la contaminación ambiental y el estado de salud de los organismos que componen un ecosistema (Jemec, 2010).

### **3.1 Enzimas biomarcadoras**

Los biomarcadores se han utilizado para proporcionar información sobre los mecanismos de toxicidad potencial de los contaminantes, así como los efectos que estos tienen sobre el organismo (Oliveira *et al.* 2016). Algunos de ellos pertenecen a los mecanismos de defensa de los organismos contra el daño oxidativo causado por la formación de las especies reactivas de oxígeno. Entre las actividades enzimáticas más estudiadas como biomarcadores sensitivos se encuentran la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión-s-transferasa, la fosfatasa alcalina, la acetil colinesterasa y la carboxilesterasa (Gismondi *et al.* 2012; Aguilera *et al.* 2012).

#### **3.1.1 Glutatión-s-transferasa**

La glutatión-s-transferasa (GST) son una familia multigénica de enzimas presentes en todas las especies animales, plantas y bacterias, que son clasificadas por sus secuencias de aminoácidos, su cinética y propiedades inmunológicas, juntas contribuyen a formar una red defensiva contra contaminantes, fármacos y productos reactivos a estrés (Bastos *et al.* 2013).

La actividad GST es importante para la prevención de daños por estrés oxidativo, esta enzima es la más abundante intracelularmente y se puede encontrar en el citosol y membrana celular (Bastos *et al.* 2013); junto con glutatión cataliza la conjugación con los xenobióticos,

ambas enzimas pertenecen a una familia que participa en la detoxificación de células ante diversos xenobióticos (Jemec, 2010). El incremento de la actividad GST corresponde al aumento en la capacidad de detoxificación en el hígado, según estudios con exposición al Cadmio, esta enzima puede ser oxidada por componentes tóxicos (Mohamed, 2008). Las enzimas GST miden el estrés oxidativo que se presenta por causa de un metal o contaminantes orgánicos, protegiendo a las células al neutralizar los componentes tóxicos antes de llegar a ellas volviéndolos solubles al agua para que puedan ser fácilmente eliminados (Ezemonye y Tongo, 2010).

La vía cAMP es una vía para la regulación de procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación y las rutas metabólicas que utiliza a la adenosina 3', 5' monofosfato cíclica (cAMP) como un mensajero intracelular, recientemente se ha postulado que esta tiene importancia toxicológica porque media la regulación y la actividad de GST en células intestinales (Arana *et al.* 2015).

Algunas clases de GST son capaces de reducir los peróxidos orgánicos brindando protección contra el estrés oxidativo. Los cambios significativos en los niveles de actividad los hace considerarlos como buenos biomarcadores ambientales (Bastos *et al.* 2013).

Para la medición de esta enzima se determina los cambios en los niveles de ésta mediante la absorbancia en espectrofotometría de la reacción de la GST con 1-cloro-1-cloro-2,4-dinitrobenceno. (Wang *et al.* 2016).

### **3.1.2 Fosfatasa Alcalina**

Las fosfatasas alcalinas son una clase de enzimas hidrolíticas diméricas que inducen la hidrolisis de un grupo fosfato a partir de moléculas como nucleótidos, proteínas o moléculas más pequeñas. Estas enzimas se encuentran en una variedad de organismos, en tejidos como placenta, riñón, intestino y hueso, además participan en procesos bioquímicos y fisiológicos incluyendo la mineralización ósea, desarrollo embrionario y transporte de lípidos y fosfato (Zhang *et al.* 2016).

Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis de fosfomonoésteres. El proceso de eliminar los grupos de fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides recibe el nombre de desfosforilación. Una porción de estas enzimas se secreta en el torrente sanguíneo lo que hace que sus niveles en plasma se utilicen como biomarcadores para diversas enfermedades. Su acción es más efectiva en entornos alcalinos. Su reacción catalítica consta de dos pasos, primero se genera un intermediario covalente de fosfoserina y en el segundo se da un ataque nucleofílico para liberar un fosfato inorgánico y un nuevo fosfoéster o especie libre. La activación de la fosfatasa alcalina requiere de cofactores como el  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . El aumento en la actividad de ALP depende de la disponibilidad de estos iones. En el caso del  $Zn^{2+}$  se observa una acción inversa. En seres humanos y mamíferos existen cuatro isoenzimas que se encuentran en varios tejidos con diferentes funciones fisiológicas (Mercado-Mercado *et al.* 2012; Hernández-Mosqueira *et al.* 2015).

### 3.1.3 Carboxilesterasa

Las carboxilesterasas son miembros de la familia  $\alpha$ ,  $\beta$ -hidrolasa, muestran los perfiles de expresión tisular ubicua con las actividades máximas carboxilesterasas en microsomas de hígado en muchos mamíferos. En humanos existen dos isoformas principales CES1A y CES2. El CES1A se expresa en hígado y pulmón, mientras CES2 se expresa en el tracto gastrointestinal e hígado. En humanos CES1 Y CES2 se encargan de la farmacocinética de los éster (Zhang *et al.* 2015).

Una de las principales funciones de la enzima es proteger a la célula de xenobióticos exógenos que contienen éster químico tipo. Este último se presenta en cientos de moléculas tanto naturales como sintéticas para mejorar la solubilidad en agua del compuesto original, por lo tanto la hidrólisis efectuada por esta enzima es parte de un proceso de detoxificación, ésta hidrólisis del enlace éster es llevada a cabo por una serina hacia el átomo de carbono del carbonilo. El enlace éster es generado por un relé de enlaces de protones, el intermedio tetraédrico que se forma se contrae para liberar el alcohol y se genera un residuo de serina

esterificado, es entonces cuando una molécula de agua actúa como nucleófilo intermedia para eliminar el ácido carboxílico. (Hatfield *et al.* 2016).

Las carboxilesterasas también se ven afectadas por los xenobióticos sobre todo los organofosforados. Estas esterasas tienen una función de protección para una gran variedad de sustratos externos, comprenden un grupo de enzimas con baja especificidad de sustrato pero que en gasterópodos acuáticos son más sensible en tejido blando (Bulgaroni *et al.* 2012).

Las carboxilesterasas se expresan principalmente en tejidos susceptibles a la exposición de agentes externos incluyendo los epitelios del pulmón y el intestino, el hígado, los riñones y la piel. En las diferentes especies la expresión de las carboxilesterasas en sangre puede variar. En los seres humanos la actividad es mayor que en roedores. Cualquier molécula esterificada será probable que se hidrolice por estas enzimas (Hatfield *et al.* 2016).

### **3.2 Biomarcadores no Enzimáticos**

Los organismos no solo poseen mecanismos de defensa enzimáticos. La mayoría de los vertebrados y algunos invertebrados poseen un sistema de detoxificación constituido por la familia del citocromo P450, que son hemoproteínas involucradas en el metabolismo oxidativo de compuestos lipofílicos exógenos. En organismos acuáticos la inducción del gen CYP1A1 se destaca por su inducibilidad a hidrocarburos. (Nach *et al.* 2014). Por otro lado el uso de microRNAs en diversos estudios ha demostrado que sus perfiles de expresión alterados están estrechamente asociados con enfermedades, especialmente cáncer (Wei *et al.* 2016). Existen de la misma manera proteínas que actúan como biomarcadores para evaluar el proceso biológico normal, los procesos patógenos y las respuestas farmacológicas ante un factor externo o fisiológico como son la troponina, mioglobina, alfafetoproteína, bilirrubina, urea, el sodio y el potasio (Awofadeju, 2016).

La capacidad antioxidante de los organismos se midió mediante la técnica de Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).

### 3.2.1 Antioxidantes no enzimáticos

Los seres vivos producen radicales libres producto de algunas reacciones metabólicas tales como la oxidación, respiración mitocondrial o las acciones enzimáticas entre otros funcionamientos endógenos, estos también son llamados especies reactivas de oxígeno (ROS), son utilizadas posteriormente para la señalización celular o por el sistema inmunitario, es decir, son beneficiosas. El problema radica cuando existe un desequilibrio de los mismos y el organismo no posee un sistema defensivo, en este caso un sistema antioxidante eficiente, que pueda controlarlos. La cantidad excesiva de estos radicales llegan a dañar a la célula y esto se le conoce como “estrés oxidativo”. Una condición de estrés oxidativo ocurre cuando una célula está expuesta a más ROS de los que puede degradar causando daños en ella, ya sea a nivel de bases de ácidos nucleicos, lípidos o proteínas, conduciendo ya sea a la generación de especies reactivas secundarias o bien la muerte celular, finalmente dando origen a la enfermedad. Los organismos se encuentran expuestos a un sin número de factores ambientales externos como enfermedades o la contaminación que pone a prueba los mecanismos de defensa. El estrés oxidativo está relacionado con la salud deficiente en humanos, así como en los organismos terrestres y acuáticos, y el desarrollo de cáncer y toxicidad embrional. Las enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa protegen las células del estrés oxidativo, para llevar a cabo esta función son necesarios micronutrientes como selenio, hierro, cobre, zinc y manganeso para su actividad, dando una mayor importancia a la dieta del organismo (Reutgard y Furuhaugen, 2016; Prior, 2015), sin embargo, existen mecanismos antioxidantes no enzimáticos tales como vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), ácido lipoico, ácido úrico, carotenos y ubiquinol (coenzima Q).( Teichert J. 1992; Sowell *et al.* 1994; Khaw, 1995; El-Sohemy *et al.* 2002; Zita *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005; Glantzounis *et al.* 2005).

Existen métodos para medir la actividad antioxidante no enzimática por ejemplo el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) es un procedimiento utilizado para medir la capacidad antioxidante total que existe en una muestra biológica, suplementos y muestras alimenticias (Tijerina *et al.* 2009).

Medir la capacidad oxidativa provee información de la resistencia a la oxidación, la contribución cuantitativa de sustancias antioxidantes o la actividad antioxidante que se presenta dentro de un organismo cuando se ingiere un alimento rico en antioxidantes. (Zulueta *et al.* 2009).

Factores como la biodisponibilidad, el potencial de oxidación, la reactividad, la estabilidad y la velocidad de reacción afecta la actividad de los antioxidantes. El ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno estima el potencial antioxidante trazando una curva de fluorescencia frente al tiempo, es uno de los ensayos mayormente usados para determinar el contenido antioxidante en alimentos. La pérdida de indicador de fluorescencia muestra una fase de latencia, similar a la observada para la absorción de oxígeno durante la inhibición de las reacciones de auto oxidación (Bisby *et al.* 2008). El valor ORAC se expresa como micromoles de Trolox equivalente por gramo de muestra utilizando como base la curva de calibración de Trolox (Du and Xu, 2014).

El ensayo determina el grado de inhibición de la peroxidación inducida por radicales de una sonda fluorescente por los compuestos de interés en un medio químico. Incluye tanto tiempo de inhibición y el grado de inhibición de la oxidación. La curva de caída, que es a la que se considera la intensidad de fluorescencia con relación en función de tiempo, se registran y la diferencia de la zona bajo las dos curvas de caída se calcula, posteriormente el grado de protección antioxidante se cuantifica en relación al Trolox estándar (Bodera *et al.* 2013).

Diversos factores pueden disminuir la capacidad antioxidante tales como la exposición a algunos xenobióticos o campos electromagnéticos, teniendo como consecuencia la predisposición a enfermedades neurodegenerativas así como leucemia (Acuña, 2006; Vitale *et al.* 2010; Ormazábal, 2014).

#### 4. Zona de Estudio

Nuevo León se encuentra entre dos regiones biogeográficas, la neártica y la neotropical, haciéndolo una zona de alta biodiversidad. Se localiza en el noreste de México con una superficie de 64,081.94 km<sup>2</sup>, predominan climas muy áridos, áridos y semiáridos distribuidos mayormente en la región noreste. En la zona centro hay un clima semicálido subhúmedo por influencia de humedad del Golfo de México. Áreas menores de la región de la sierra, zona centro y sureste de la entidad se registran climas templados y semifríos con una precipitación media anual que oscila entre 300 y 600 mm (Contreras-Balderas *et al.* 2008).

El estado comprende tres provincias fisiográficas: Llanura costera del Golfo Norte, Sierra Madre Oriental y Gran Llanura de Norteamérica. Presenta cinco eco regiones: Matorral espinoso tamaulipeco, Matorrales xerófilos del Desierto Chihuahuense, Matorrales xerófilos del Norte de la Meseta Central, Matorral submontano del piedemonte Tamaulipas y Nuevo León y Bosques de coníferas y encinos de la Sierra Madre Oriental (Contreras-Balderas *et al.* 2008).

La hidrología del Estado se compone de regiones como: Río Bravo en la parte norte del estado, el río Potosí en la parte sureste y El Salado en la porción suroeste del estado. En general éstas corrientes superficiales del estado nacen en la Sierra Madre Oriental y corren comúnmente al este y descargando sus aguas en el Golfo de México.

Galeana está ubicado en la parte central de Nuevo León, en las coordenadas 24°50' latitud norte y 100°04' longitud oeste, a una altura de 1,655 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Rayones y con el estado de Coahuila; al sur con Aramberri y Doctor Arroyo; al este con Rayones, Montemorelos, Linares e Iturbide, y al oeste con el estado de Coahuila y San Luis Potosí. Su extensión es de 7,010.79 kilómetros cuadrados. Cuenta con un clima de seco estepario frío y el templado con lluvias de verano, su temperatura media anual es de 19°C y su precipitación media es de 393 mm. Los vientos dominantes son del norte. Sus principales ecosistemas se componen de pino, encino, oyamel, cedro, mezquite, palma,

lechuguilla, maguey, nopal, carrizo y nogal. Su principal fauna está conformada por conejos, leoncillo, armadillo, venado, coyote, oso, lobo, zorro, águila, cenizote, gorrión, perro de la pradera, etc.(INEGI, 2000).

## **JUSTIFICACIÓN**

Las poblaciones de *Ambystoma sp.* han ido en declive durante los últimos años hasta ponerlos en peligro de extinción en todo el territorio nacional (NOM-059-SEMANART-2010), por lo cual se evaluará el nivel de sensibilidad de esta especie mediante el uso de biomarcadores fisiológicos de estrés en poblaciones de Galeana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los niveles de actividad basal de enzimas biomarcadoras (ALP, CaE, GST), así como contenido de antioxidantes no enzimáticos (ORAC) en poblaciones de *Ambystoma sp.* de Galeana, Nuevo León.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Realizar un muestreo de tejido branquial en poblaciones de *Ambystoma sp.* en diferentes localidades del municipio de Galeana, Nuevo León.
2. Evaluar la actividad de enzimas biomarcadoras (ALP, GST, CaE) y contenido de antioxidantes no enzimáticos (ORAC) en las muestras de tejido branquial.
3. Analizar la variación de los biomarcadores con respecto a los factores abióticos de las localidades donde fueron capturados los organismos.
4. Realizar una comparación de los niveles de biomarcadores analizados entre localidades y sexo de los individuos.

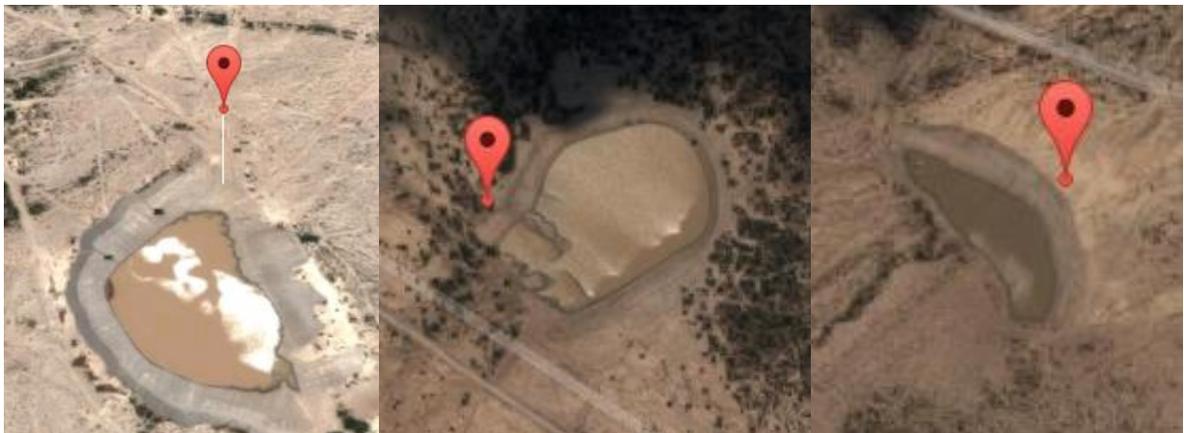
## MATERIALES Y METODOS

### 1. Prospección y Selección de las Localidades de Muestreo

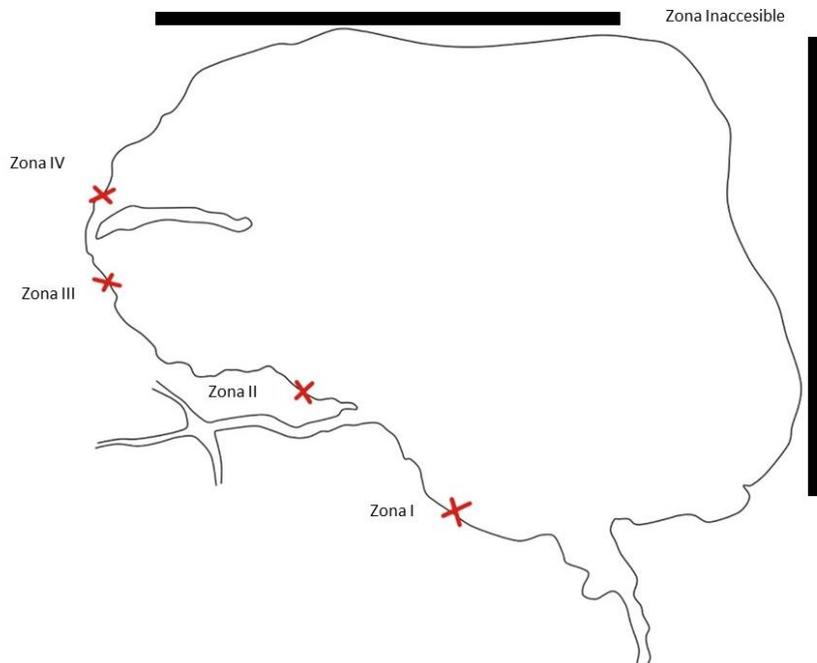
En diversas comunidades y localidades, de municipios como Dr. Arroyo y Galeana, fueron realizadas visitas para poder determinar la presencia de *Ambystoma sp.* Posteriormente en estos sitios fueron muestreados los cuerpos de agua mediante el uso de atarraya. Las localidades fueron seleccionadas dependiendo del estado de las poblaciones, su facilidad de muestreo y la aceptación de las comunidades.

### 2. Localidades

Las localidades seleccionadas fueron tres: La primera cercana a la localidad de San José (24°28'44.1"N 100°29'15.3"W) (**Localidad 1**), la segunda cercana al Refugio de Los Ibarra (24°28'12.0"N 100°24'11.6"W) (**Localidad 2**) y la tercera de ellas entre ambas localidades (24°28'32.3"N 100°25'06.2"W) (**Localidad 3**), en la figura 1 se muestra la vista satelital. La localidad 2 debido a su área fue dividida en cuatro zonas de muestreo diferentes como se muestra en la figura 2. Todas las localidades pertenecientes al municipio de Galeana Nuevo León.



**Figura 1.** Vista satelital de las localidades. La localidad (1) San José, Localidad 2 (Refugio de los Ibarra) y localidad 3 (José-Ibarra) en orden de izquierda a derecha.



**Figura 2.** Ubicación de las cuatro zonas de muestreo en la Localidad 2.

### 3. *Parámetros Físicos y Químicos*

Los parámetros físicos y químicos se obtuvieron mediante el uso de equipo especializado para cada una de las variables a medir, se realizó un registro de cada una de las lecturas obtenidas de pH, oxígeno, temperatura, sólidos disueltos y altitud en cada una de las localidades.

### 4. *Material Biológico*

El estudio fue realizado en organismos del género *Ambystoma sp. en su fase neoténica*, sus capturas fueron limitadas a 15 individuos por zona. Los animales fueron procesados para conocer su peso, su longitud y su sexo, así como el registro de la zona donde fueron capturados. La muestra fue tomada de tejido de la tercera branquia, tomando en cuenta la capacidad de regeneración que poseen estos organismos.

Las muestras obtenidas de tejido fueron transportadas en una hielera a 4° C y transportadas al Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde fueron almacenadas en un ultra congelador a -70 ° C.

##### 5. *Elaboración de extractos enzimáticos*

Las muestras, de forma individual, fueron pesadas usando una balanza digital, y posteriormente homogenizadas durante un minuto en buffer tris-HCl 50 mM (pH 7.1) en una proporción de 1:15 (peso / volumen) a 4°C. El sobrenadante se colocó en micro tubos etiquetados que fueron centrifugados a 4°C durante 15 minutos a 10,621 g,. Las alícuotas que se utilizaron como extractos se obtuvieron del sobrenadante tras la centrifugación, congeladas a -70° C hasta su análisis.

##### 6. *Determinación de la concentración de proteína en los extractos*

La concentración de proteínas ha sido determinada por el método Bradford (1976) adaptado a micro placas haciendo uso de una curva estándar de BSA (A-9647 Sigma) 0.05 a 0.5 mg de BSA por mL de agua destilada. Las diluciones de la curva estándar pueden verse en la sección de Anexos. Los puntos de la curva y las muestras fueron colocadas en cada pocillo con sus respectivas tres repeticiones a un volumen de 10 µL, posteriormente se agregaron 200 µL de solución de trabajo. La lectura mediante espectrofotometría se realizó a 595 nm. La concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante la ecuación de regresión lineal obtenida a partir de la curva estándar.

### 7. Evaluación de la actividad de glutatión- s- transferasa (GST)

La actividad de GST fue analizada en un lector de micro placa de 96 pocillos de acuerdo a las técnicas de Braver *et al.* 2016. La GST cataliza la conjugación de L-glutatión con 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CNDB) a través del grupo tiol del glutatión hasta lograr un cambio de actividades en unidades de absorbancia por minuto. El conjugado GS-DNB es proporcional a la actividad GST en la muestra y presenta absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

La mezcla de reacción por pozo consistió en agregar 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 300  $\mu\text{L}$  de sustrato (anexo 6) para inmediatamente iniciar las lecturas de absorbancia por espectrofotometría cada 30 segundos durante un periodo de 5 minutos. La actividad específica fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína mediante la siguiente ecuación.

$$\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{enz}} (\text{mL}) = \frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V (\text{mL}) \times \text{dil}}{\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}/\text{mg de proteína}}$$

dil = factor de dilución de los extractos enzimáticos

$\epsilon_{\text{mM}}$  = coeficiente de extinción de CDNB conjugado a 340 nm ( $9.6 \text{ mM}^{-1}$ )

V = Volumen de reacción (310  $\mu\text{L}$ )

$V_{\text{enz}}$  = Volumen de muestra analizado (10  $\mu\text{L}$ )

### 8. Evaluación de la Actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP)

La actividad de ALP fue determinada utilizando el sustrato 4-nitrofenil fosfato según el método de Moyano *et al* 1996. En los pozos de la micro placa se colocó 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 200  $\mu\text{L}$  de buffer dietanolamina 1.0 mM con un pH de 9.8 con 50 mM  $\text{MgCl}_2$ . El inicio de la reacción se inició agregando el sustrato a una concentración final de 0.4 mM. La absorbancia fue registrada cada 120 segundos durante 10 minutos y la actividad

enzimática fue expresada como el incremento de absorbancia por minuto por miligramo de proteína en los extractos.

#### 9. *Evaluación de la Actividad de Carboxilesterasa (CaE)*

La actividad de carboxil esterasa se determinó, utilizando el método descrito por Ellman *et al.* 1961, pero modificado a micro placas por Huang *et al.* 1997, utilizando el sustrato p-nitrofenil acetato. En los pozos de la micro placa se colocó 10  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 200  $\mu\text{L}$  de buffer tris-HCL 50 mM pH 7.1 agregando 100  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil acetato 2mM como sustrato para el inicio de la reacción. La lectura para la absorbancia se realizó a 405 nm durante 10 minutos expresándola como el incremento de absorbancia por minuto por miligramo de proteína.

#### 10. *Evaluación de antioxidantes no enzimáticos*

La cantidad total de antioxidantes no enzimáticos fue determinada utilizando el método de Capacidad de absorción de Radicales Oxígeno (ORAC). Las muestras mantuvieron la dilución utilizada para realizar los extractos enzimáticos. Se realizó una curva estándar de Trolox se realizó con buffer fosfato (anexo 7). Los pozos exteriores de la micro placa se llenaron con 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada para mantener una temperatura adecuada. El volumen usado para la curva, muestras y blancos fueron de 25  $\mu\text{L}$  por pozo con tres repeticiones. La fluoresceína previamente diluida en buffer fosfato (anexo 8) será agregada en los pozos con muestras y curva (150  $\mu\text{L}$ ). La placa fue incubada por 30 minutos a una temperatura de 37° centígrados. Al término de la incubación se agregó 25  $\mu\text{L}$  de AAPH (anexo 9) a cada pozo con muestra y curva para iniciar lectura cada minuto durante 1 hora.

## *11. Análisis Estadístico*

El análisis estadístico fue realizado con el software IBM SPSS versión 23 (SPSS, Inc. Chicago Illinois, EE. UU.). Los promedios y desviaciones estándar de las actividades registradas fueron utilizados para determinar las diferencias significativas de las actividades enzimáticas del tejido de Branquia. La determinación de las diferencias entre zonas y localidades fueron valoradas utilizando la prueba paramétrica de ANOVA junto con la prueba de comparación mediante análisis de varianza Tukey. La comparación entre sexos ha sido determinada utilizando una prueba t – student. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### 1. Parámetros Físicos y Químicos

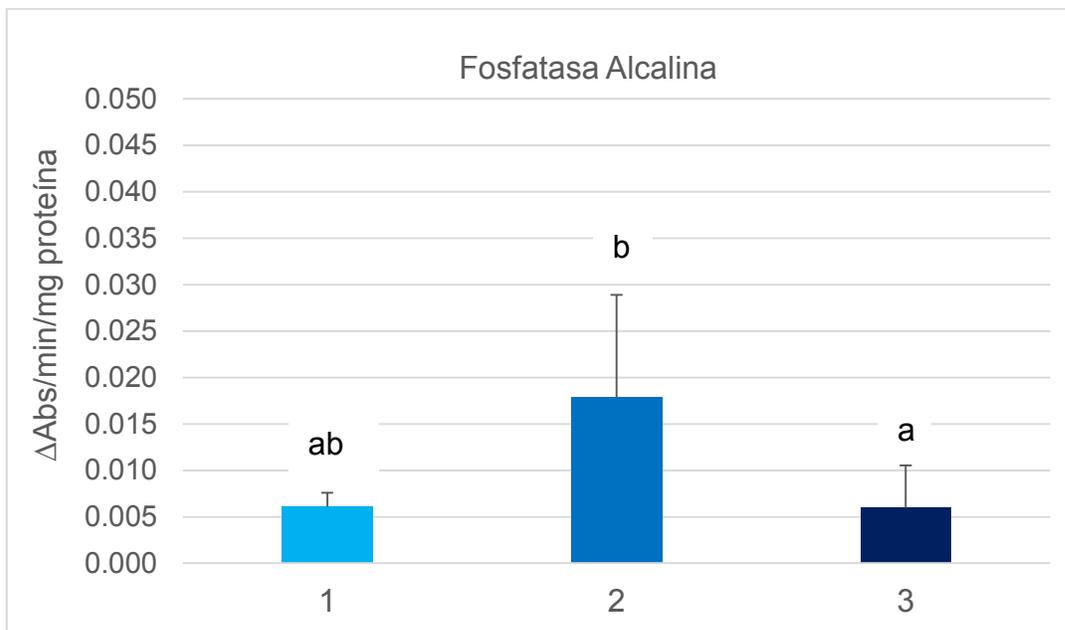
Los parámetros físicos del agua que fueron medidos en cada una de las localidades en las que se realizó la colecta de individuos, (temperatura, pH, sólidos disueltos, oxígeno y altitud) se presentan en la Tabla 1. La temperatura más baja fue de 25.6 ° C y se registró en la zona 1 de la localidad 2, mientras que la temperatura más alta (34.4 °C) se registró en la zona 3 de la localidad 2. El valor más bajo de pH fue de 8.3 en la localidad 3 y el más alto (9.13) en localidad 1. La mayor cantidad de sólidos disueltos se detectó en la zona 2 de la localidad 2 con 0.24 gr/L, mientras que la menor cantidad se registró en la localidad 1 con 0.05 gr/L. La localidad 3 presentó la mayor altitud con 1835 m s. n. m., mientras que la menor altitud fue en localidad 1 con 1800 m s. n. m. La mayor concentración de oxígeno disuelto se registró en la zona 2 de la localidad 2 con 15.59 ppm y en la localidad 3 se registró la menor concentración con 4.93 ppm.

**Tabla 1. Parámetros físicos y químicos de las localidades al momento de la colecta. La localidad 2 se dividió en cuatro zonas de muestreo.**

Parámetros	Localidad 1	Localidad 2				Localidad 3
		Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
<b>Temperatura</b>	28.5 °C	25.6 °C	29.1 °C	34.4 °C	32.9 °C	27.4 °C
T. más Alta	32.8 °C	27.3 °C	33 °C	34.5 °C	33.4 °C	27.8 °C
T. más Baja	28.1 °C	25.6 °C	28.3 °C	33.1 °C	32 °C	27.4 °C
<b>pH</b>	9.13	8.66	8.64	8.71	8.73	8.3
<b>Disueltos</b>	0.05 gr/L	0.21 gr/L	0.24 gr/L	0.23 gr/L	0.20 gr/L	0.10 gr/L
<b>Altitud</b>	1,800 mts	1,811 m	1,811 mts	1,811 mts	1,811 mts	1,835 mts
<b>Oxígeno</b>	12.958 ppm	13.84 ppm	15.59 ppm	11.62 ppm	11.66 ppm	4.93 ppm

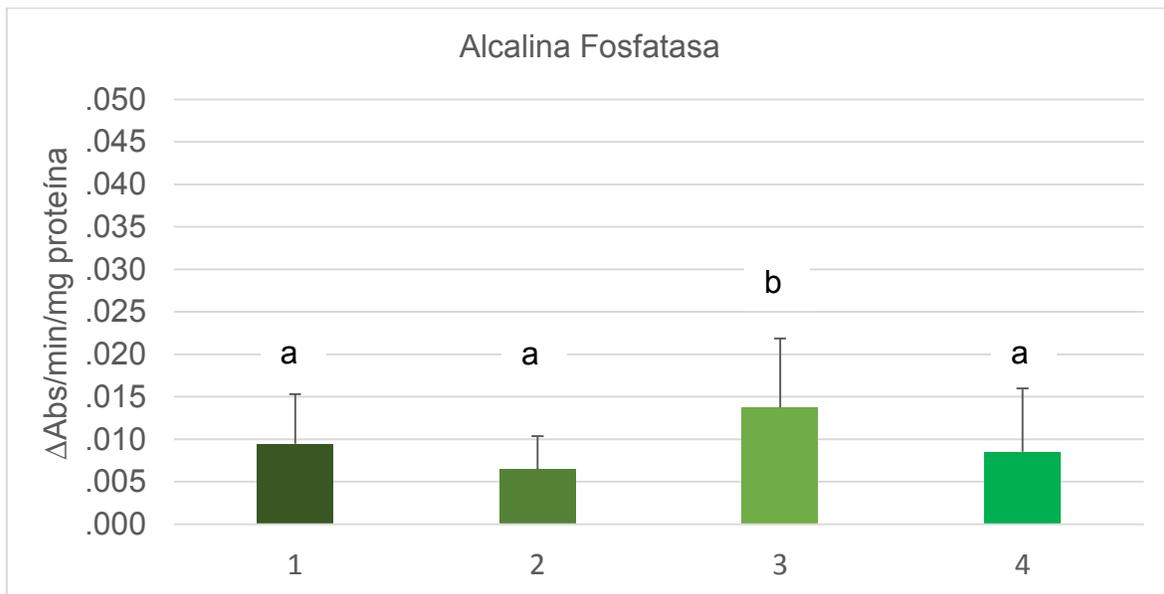
## 2. Biomarcador Fosfatasa Alcalina (ALP)

Al comparar la actividad promedio de ALP registrada en las poblaciones de *Ambystoma sp.* pertenecientes a cada una de las localidades de colecta, se observó una mayor actividad de ALP en los organismos de la localidad 2, inclusive esta diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la actividad registrada en los organismos de la localidad 3 (figura 3).



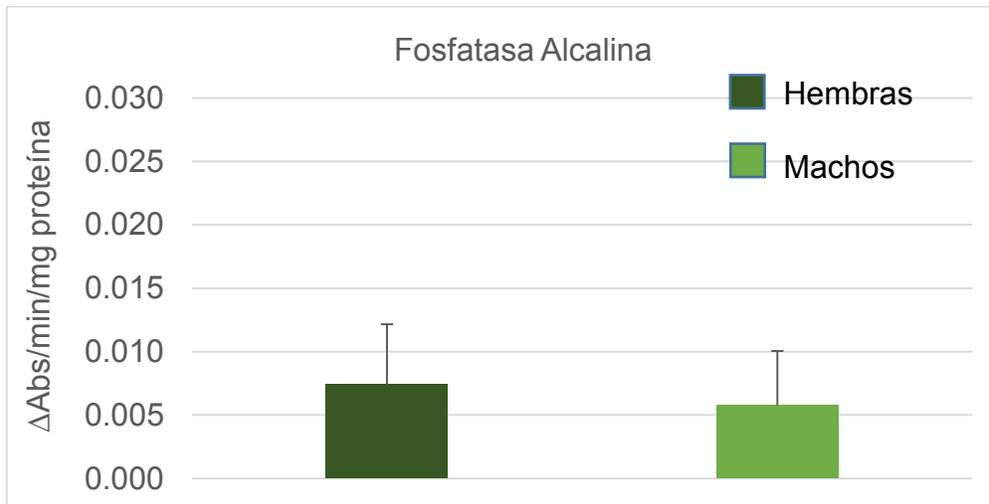
**Figura 3. Niveles de actividad de fosfatasa alcalina en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. La localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

Al realizar la comparación entre las zonas de la localidad 2, se observó una actividad promedio de ALP en los organismos colectados en la zona 3, esta diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las actividades de los organismos de las zonas 1, 2 y 4, las cuales no presentaron diferencias significativas (figura 4).



**Figura 4. Niveles de actividad de fosfatasa alcalina en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

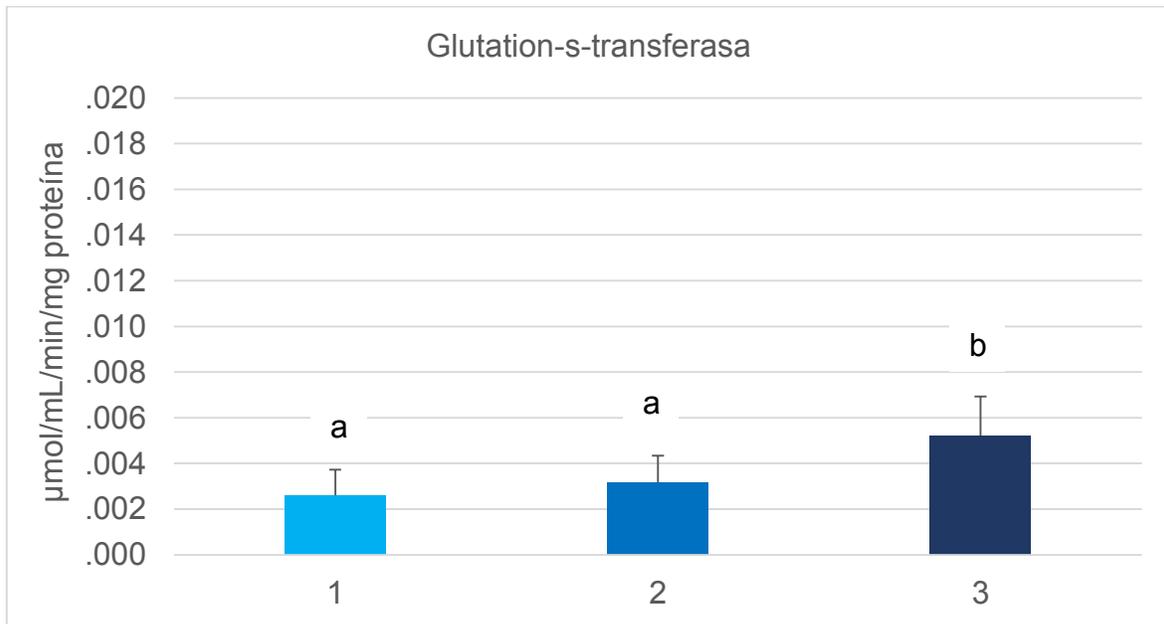
Al comparar la actividad promedio de ALP entre machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo, se observó una mayor actividad promedio ALP en las hembras con respecto a los machos, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (figura 5).



**Figura 5. Niveles de actividad de fosfatasa alcalina en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúscula diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

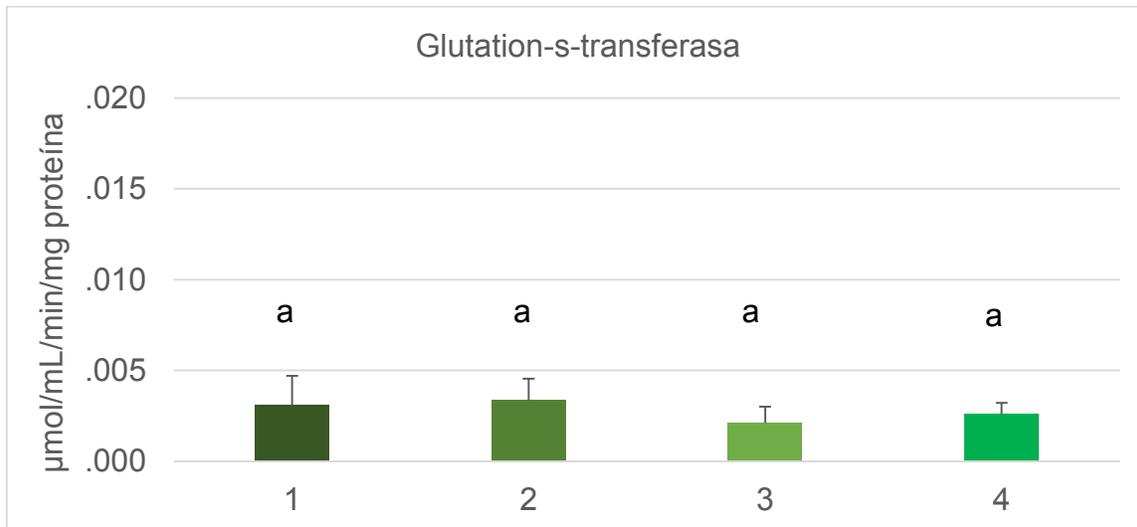
### 3. Biomarcador Glutación-s-transferasa (GST)

La actividad promedio de GST. Fue significativamente mayor en los organismos de la localidad 3 ( $p < 0.05$ ), mientras que los organismos de las localidades 1 y 2 no presentaron diferencias significativas en los valores de actividad de GST por localidad (figura 6).



**Figura 6. Niveles de actividad de glutatión-s-transferasa en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

Al comparar la actividad promedio de GST de los organismos por zona en la localidad 2, no se observaron diferencias significativas. El valor más alto de actividad GST se presentó en la zona 2, mientras que el menor valor de actividad fue en la zona 3 (figura 7).



**Figura 7. Niveles de actividad de glutati3n-s-transferasa en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviaci3n estandar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

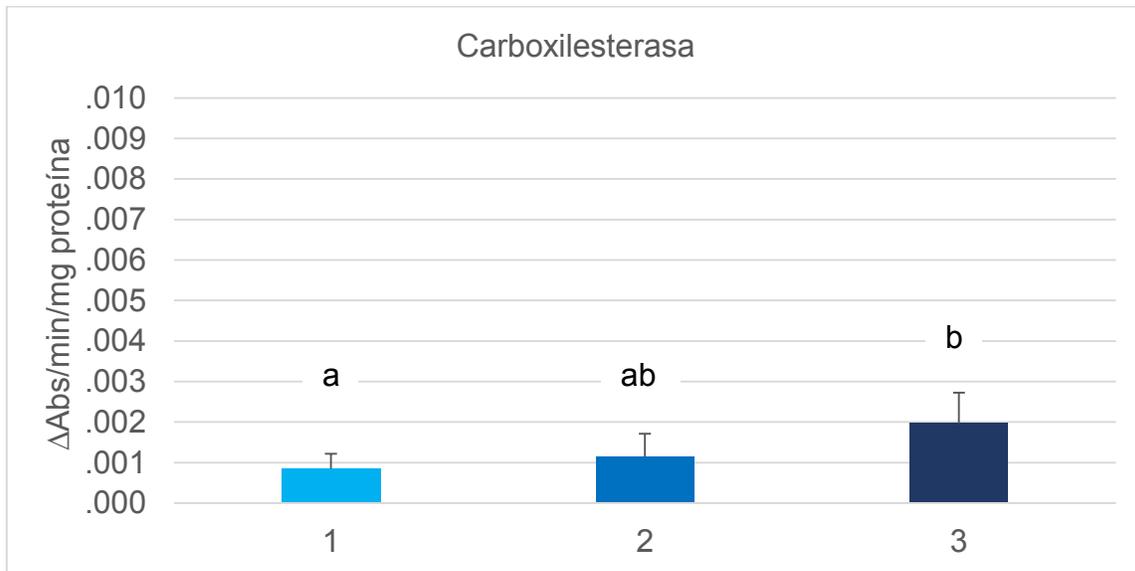
Al comparar la actividad promedio de GST entre organismos machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo, se observó una ligera mayor actividad en los machos, sin embargo, esta diferencia en actividad GST entre machos y hembras no fue estadísticamente significativa (figura 8).



**Figura 8. Niveles de actividad de glutatión-s-transferasa en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

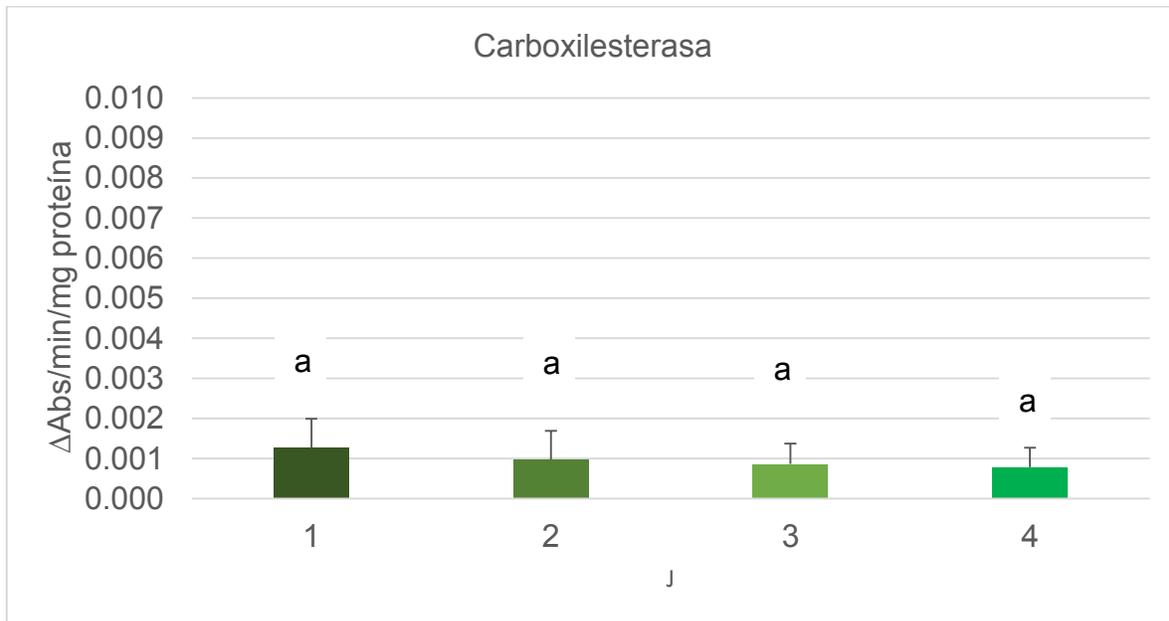
#### 4. Biomarcador Carboxilesterasa (CaE)

La mayor actividad promedio de CaE se observó en los organismos de la localidad 3 y fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) con respecto a la actividad CaE observada en los organismos de la localidad 1 los cuales presentaron la menor actividad CaE de las tres localidades evaluadas (figura 9).



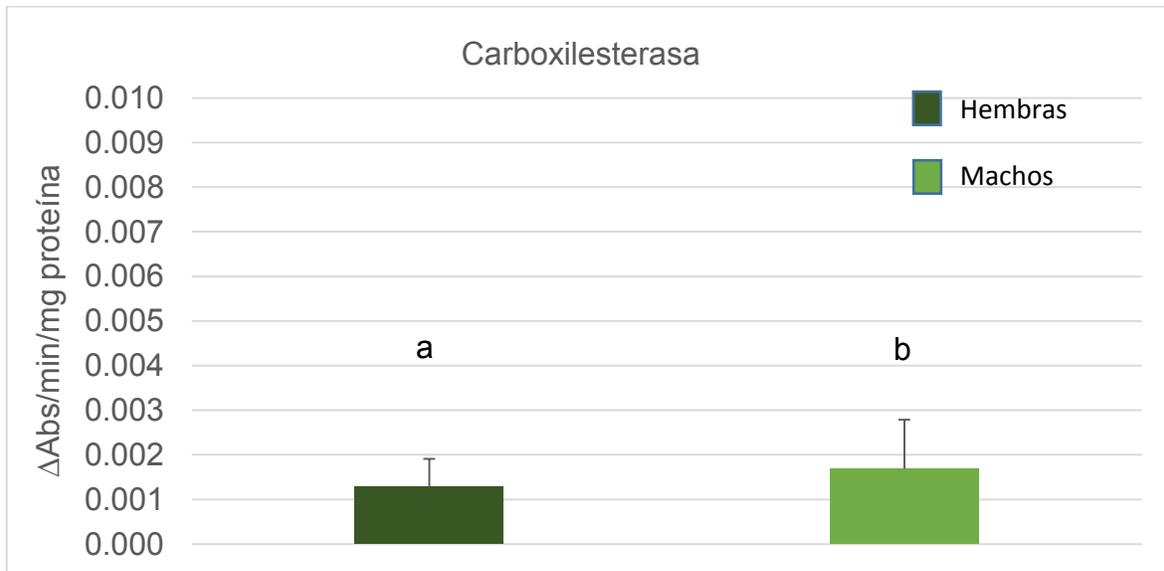
**Figura 9. Niveles de actividad de carboxilesterasa en las localidades de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

No se observaron diferencias significativas en la actividad promedio de CaE entre los organismos correspondientes a las cuatro zonas de muestreo de la localidad 2 (figura 10). La mayor actividad promedio CaE se presentó en los organismos de la zona 1, mientras que la menor actividad CaE fue en los organismos de la zona 4.



**Figura 10. Niveles de actividad de carboxilesterasa en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

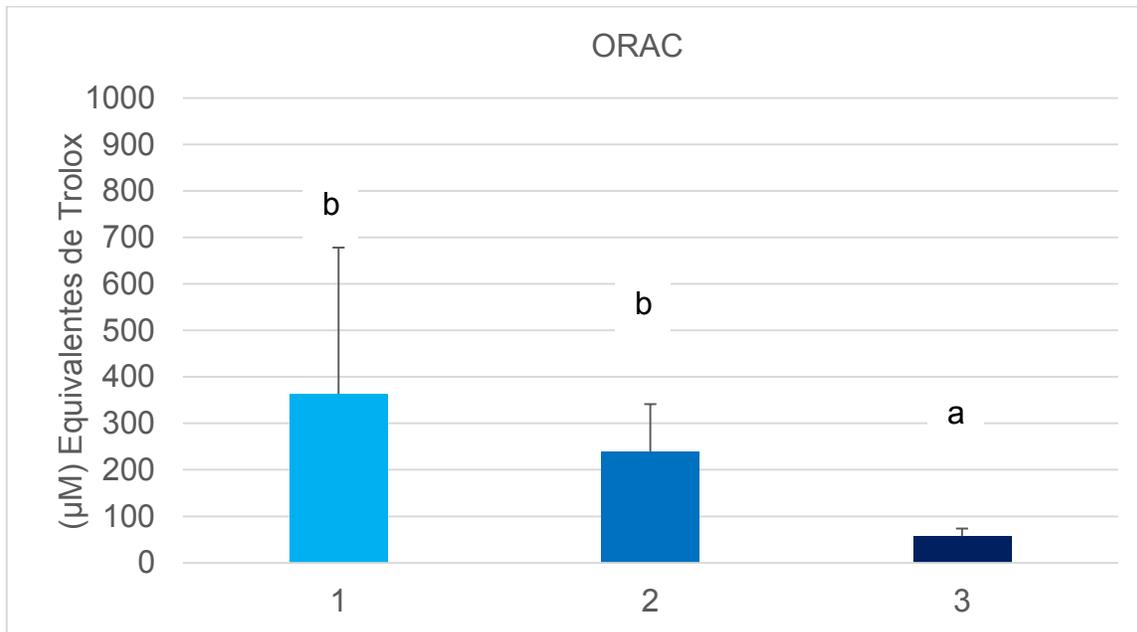
Al comparar la actividad promedio de CaE entre los machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo, los machos presentaron una mayor actividad CaE (figura 11), esta diferencia de actividad entre machos y hembras fue significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11. Niveles de actividad de carboxilesterasa en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la media de actividad enzimática con su respectiva desviación estándar ( $p < 0.05$ ).**

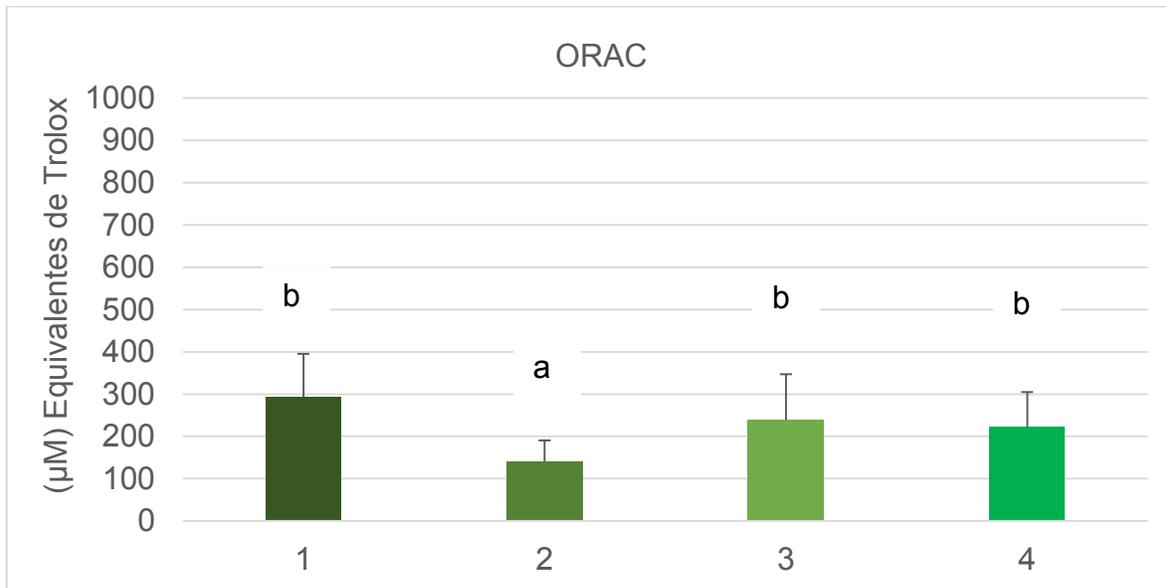
5. Biomarcador Capacidad antioxidante no enzimática mediante la técnica de Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC).

Los organismos de la localidad 1 presentaron una mayor capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) con respecto a los organismos de la localidad 2 y localidad 3, mientras que la menor ORAC se observó en los organismos de la localidad 3. La diferencia entre los organismos de la localidad 1 y la localidad 2 no fue significativa, sin embargo, al comparar los organismos de la localidad 1 con respecto a los organismos de la localidad 3 si se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a su capacidad antioxidante no enzimática (figura 12).



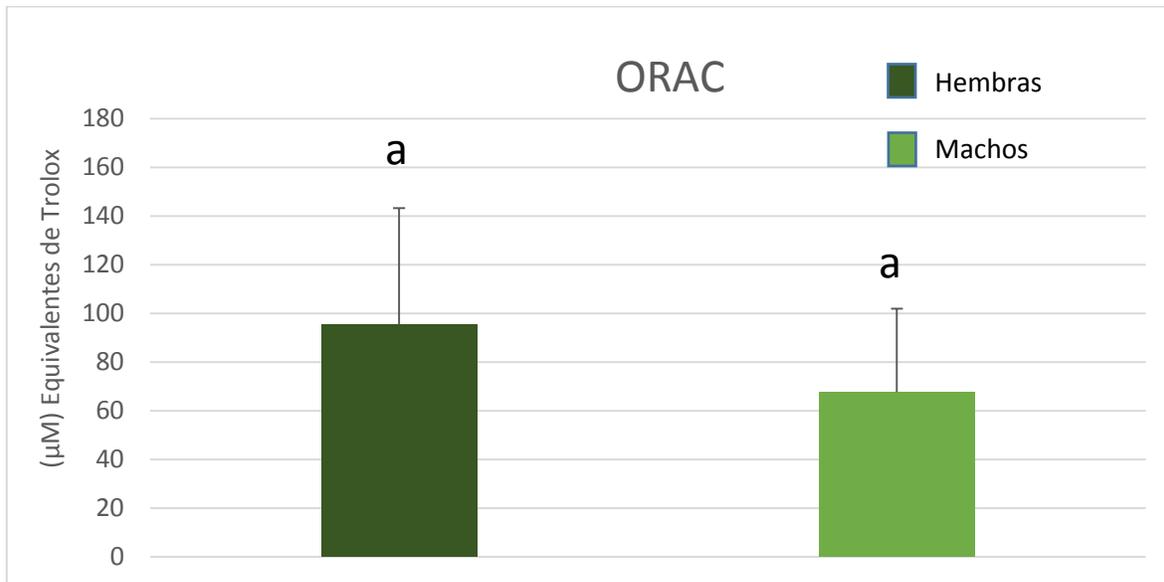
**Figura 12. Niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en las localidades de muestreo. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox con su respectiva desviación estándar. Localidad 1 (San José), localidad 2 (Refugio de los Ibarra), localidad 3 (José-Ibarra). Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

En la localidad 2 la ORAC promedio fue similar en los organismos de las zonas 1, 3 y 4, sin diferencias significativas entre estas zonas (figura 13); mientras que los organismos de la zona 2 tuvieron una menor ORAC en comparación con los organismos de zonas 1, 3 y 4, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13. Niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en las diferentes zonas de muestreo de la localidad 2. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio  $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

Al comparar la capacidad antioxidante no enzimática promedio (ORAC) entre los machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo, las hembras presentaron una mayor ORAC con respecto a los machos, sin embargo esta diferencia no fue significativa (figura 14).



**Figura 14. Niveles de capacidad antioxidante no enzimática mediante ORAC en machos y hembras de todas las localidades y zonas de muestreo. Cada columna representa la capacidad antioxidante no enzimática promedio en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox con su respectiva desviación estándar. Literales minúsculas diferentes indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).**

#### 6. Asociación de biomarcadores con respecto a parámetros físicos y químicos

Los análisis de correlación mostraron una asociación significativa de la actividad ALP con respecto a la temperatura ( $p < 0.05$ ), igualmente se presentó una asociación significativa entre la capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) y la temperatura ( $p < 0.01$ ). La actividad de CaE y ALP presentaron una asociación significativa con respecto al pH ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente). La actividad de CaE y la ORAC tuvieron una asociación significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los sólidos disueltos. La capacidad antioxidante no enzimática tuvo una asociación con respecto a la altitud ( $p < 0.05$ ), mientras que la actividad GST y CaE tuvieron una asociación altamente significativa con respecto al mismo parámetro ( $p < 0.01$ ). Ninguno de los biomarcadores evaluados presentó asociación significativa con respecto a la concentración de oxígeno (tabla 2).

**Tabla 2. Valores de correlación entre biomarcadores y parámetros físicos y químicos.**

<b>Biomarcador</b> ----- <b>- Parámetro Físico o Químico</b>	<b>GST</b>	<b>CaE</b>	<b>ALP</b>	<b>ORAC</b>
Temperatura	- 0.4287	- .013	0.170*	0.261**
pH	-0.587	-0.202*	0.295**	0.201
Disueltos	-0.466	-0.205*	-0.082	0.176*
Altitud	0.630**	0.250**	-0.213	-0.206*
Oxígeno	- 0.532	-0.284	0.078	0.130

\*Significancia a un valor de ( $p < 0.05$ ).

\*\*Significancia a un valor de ( $p < 0.01$ )

#### 7. Asociación de biomarcadores con respecto a talla de organismos

La actividad CaE tuvo una asociación significativa con respecto al peso y longitud de los de los organismos ( $p < 0.05$ ), mientras que la actividad GST tuvo una asociación altamente significativa con respecto a estos mismos parámetros ( $p < 0.01$ ). Los resultados de correlación se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Valores de la correlación entre los biomarcadores analizados con respecto al peso y talla de los organismos.**

<b>Biomarcador</b> ----- <b>Talla</b>	<b>GST</b>	<b>CaE</b>	<b>ALP</b>	<b>ORAC</b>
Peso	0.727**	0.171*	- 0.214	-0.263
Longitud	0.713**	0.175*	-0.212	-0.290

\*Significancia a un valor de ( $p < 0.05$ ).

\*\*Significancia a un valor de ( $p < 0.01$ ).

## Discusión

El declive de las poblaciones de anfibios en el mundo han sido asociadas a múltiples factores tales como la pérdida de sus hábitats, la exposición a xenobióticos, las enfermedades y el cambio climático, estos factores generan un estrés fisiológico en los anfibios provocando pérdida de la homeostasis y enfermedad con la consecuente pérdida de individuos y poblaciones. Sin embargo, La limitada base de datos sobre estas especies en el ámbito de conservación no provee suficiente información sobre cómo estas especies son afectadas (Snyder et al. 2017).

Los anfibios son organismos que mantienen fases de vida tanto acuáticas como terrestres, esta característica los vuelve especialmente sensibles a los cambios o perturbaciones ambientales que pudieran ocurrir en ambos tipos de ecosistema. Las salamandras o ajolotes del género *Ambystoma*. poseen una fase acuática en su ciclo de vida en la cual son conocidos comúnmente como ajolotes, durante esta fase pueden alcanzar la madurez sexual y tienen capacidad de reproducción, característica que es conocida en los anfibios como neotenia, por lo cual algunos individuos pueden permanecer durante todo su ciclo de vida en su fase acuática. Como todos los organismos acuáticos su ambiente está continuamente expuesto a condiciones desfavorables, así que poseen mecanismos defensivos para su supervivencia, sin embargo, la información de cómo estas especies son afectadas es limitada (Batos et al. 2013). Los biomarcadores son herramientas que pueden proveer información respecto al estado fisiológico de los organismos pues estos normalmente mantienen niveles de homeostasis que pueden ser medibles y cuando los organismos son sometidos a un estrés ambiental natural o artificial hay una alteración de estos niveles que puede ser cuantificable, sin embargo estos cambios pueden no corresponder a un efecto común. Cada especie tienen diferente sensibilidad a perturbaciones ambientales y la expresión de un biomarcador por tanto no es la misma. En un estudio realizado con colinesterasas en peces y crustáceo fue posible determinar neurotoxicidad en peces evaluando la actividad de acetilcolinesterasa, sin embargo, en crustáceo para determinar efectos de neurotoxicidad fue necesario medir la actividad acetilcolinesterasa y carboxilesterasa (Solé et al. 2006). Inclusive esta diferencia en la expresión de biomarcadores puede observarse a nivel de género como se observó en el presente estudio donde la actividad CaE en hembras de *Ambystoma sp.* fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) con respecto a la actividad CaE de los machos de la misma especie.

La obtención de tejidos para la medición de biomarcadores puede ocasionar la muerte en algunos organismos o bien el proceso podría afectar al individuo. Incluso la toma sanguínea llega a ser un problema en caso de organismos juveniles pequeños e inquietos y difíciles de manejar (Polleta et al. 2016). En las especies de *Ambystoma* la regeneración de tejidos en estos individuos es de las más eficaces que se conocen hasta ahora, estos organismos tienen

la capacidad de regenerar miembros completos tales como patas o branquias en solo 30 a 39 días (Lévesque *et al.* 2007).

En el presente estudio se pudo determinar que el corte de una branquia en individuos *Ambystoma sp.* es una alternativa para medir biomarcadores, este proceso demostró ser rápido y viable, sin necesidad del sacrificio del animal y fue posible determinar actividad de ALP, GST, CaE y capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) y aunque estos biomarcadores normalmente son determinados en hígado (Aguilera *et al.* 2015; Prokic *et al.* 2017).

Las fosfatasa alcalinas (ALP) son enzimas hidrolíticas que inducen la hidrólisis de un grupo fosfato, se encuentran en una variedad de organismos, en tejidos como placenta, riñón, intestino y hueso. (Zhang *et al.* 2016). Igualmente, existen reportes de actividad ALP en tejido branquial de peces (Cruz, 2011). En el presente estudio fue posible determinar actividad ALP en branquias de organismos neoténicos de *Ambystoma sp.*

La actividad puede variar como respuesta a la exposición a diferentes tipos de xenobióticos. En ratas se ha observado una relación entre la disminución de la actividad ALP y la exposición a niveles altos en plomo (Jarrar y Taib, 2012). Por otro lado, se han obtenido lecturas altas de esta enzima en ratones expuestas al aceite de rana toro (Silva *et al.* 2004), esto quiere decir que la relación que tienen los contaminantes sobre la enzima aún no es muy clara y se requieren más estudios. La actividad de ALP también está relacionada con la exposición a metales, toxinas de vegetales y con alteraciones fisiológicas resultado de la reproducción o bien daño renal (Trivedi *et al.* 2001; Trof *et al.* 2006). Igualmente existen estudios que relacionan la actividad ALP con el aumento en resistencia a plaguicidas organofosforados en insectos (Scott, 1999; Srinivas *et al.* 2006). Aguilera *et al.* (2015) observaron un incremento en la actividad de ALP en peces *Atractosteus spatula* expuestos a un compuesto organofosforado (diazinon) y a un disruptor endócrino (17 $\beta$ -estradiol) este último provocó un incremento en los niveles de proteína fosforada (vitelogenina), por lo cual se infiere que el incremento de actividad de esta enzima se relaciona con la hidrólisis de compuestos fosforados los cuales pueden ser de origen exógeno o su síntesis endógena provocada por un estresor. Rangel (2014) observó mayor actividad ALP en peces *Pecilia reticulata* al ser expuestos en agua de un río de zona urbana, mientras que Aguilera *et al.* (2012) observaron menor actividad ALP en poblaciones de lagartijas en zonas protegidas. Independientemente las alteraciones en los niveles de actividad enzimática ALP trae consigo fallas fisiológicas (Trivedi *et al.* 2001). En el presente estudio también se observó diferencia en la actividad ALP entre las tres poblaciones de *Ambystoma sp.* evaluadas, las poblaciones de la localidad 1 y 3 presentaron valores de actividad ALP similares, mientras que la población de la localidad 2 presentó una mayor actividad ALP, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la localidad 3. Adicionalmente en las zonas de

muestreo de la localidad 2 también hubo diferencias, los organismos muestreados en las zonas 1, 2 y 4 presentaron actividades ALP similares, mientras que los muestreados en la zona 3 tuvieron una actividad ALP significativamente más alta ( $p < 0.05$ ).

Se han reportado diferencias de actividad ALP entre fetos masculinos y fetos femeninos humanos (Gol *et al.* 2006). Igualmente se ha reportado en lagarto espinoso del género *Sceloporus sp.* (González *et al.* 2012). En los organismos muestreados de *Ambystoma sp.* la actividad ALP no presentó diferencias entre machos y hembras, y no estuvo asociada a peso o longitud, sin embargo, se observó una asociación significativa de la actividad ALP con respecto a pH y temperatura, lo anterior sugiere que las diferencias significativas observadas de actividad ALP entre algunas localidades pueden estar relacionadas a factores ambientales como el pH y la temperatura o factores exógenos como la presencia de xenobióticos.

La GST es un grupo de isoenzimas de biotransformación de fase II que protegen a la célula mediante la conjugación de glutatión a sustratos electrofílicos que permite la descontaminación de metales y la metabolización de hidroperóxidos orgánicos (Gavric *et al.* 2017). En el presente estudio se observó una mayor actividad GST en los organismos *Ambystoma sp.* de la localidad 3 siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la actividad GST observada en los organismos de las localidades 1 y 2. Resultados similares son reportados en un estudio donde se comparó una población de lagarto espinoso *Sceloporus serrifer* habitando una zona con actividad industrial con respecto a una población *S. serrifer* habitando una zona ecológica protegida y la población de la zona industrial registró una actividad GST significativa mayor con respecto a la población de la zona protegida (González *et al.* 2012). Igualmente se ha observado mayor actividad GST en tortugas y sapos de zonas contaminadas en comparación con poblaciones de zonas control (Rie *et al.* 2000; Attademo *et al.* 2007; Richardson *et al.* 2009). La expresión de GST es considerada de mucho valor cuando se considera una toxicidad química ambiental, ya que el incremento de ésta se relaciona con el incremento de estrés oxidativo (Rodríguez *et al.* 2013). También se ha observado inhibición de actividad GST en tortugas *Chrysemys picta* y peces *Mugil sp.* en localidades contaminadas con metales e hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP) (Rie *et al.* 2000). Otro estudio en peces teleósteos también sugiere que la reducción de la actividad de la GST es una falla en el proceso de desintoxicación a pesar que la inducción en los tejidos de los peces se considera un beneficio para el manejo de condiciones de estrés (Samanta *et al.* 2014). La mayoría de los estudios realizados con GST son estudios para evaluar el efecto de la contaminación en ambientes acuáticos, así como la tendencia de contaminación en los cuerpos de agua.

No se observaron diferencias significativas de actividad GST entre machos y hembras de *Ambystoma sp.* La actividad GST estuvo altamente asociada ( $p < 0.01$ ) a la altitud de muestreo y a la talla de los organismos (peso y longitud). Lo anterior sugiere que las

variaciones de actividad GST observadas entre localidades pueden estar relacionadas a factores exógenos o ambientales como la presencia de xenobióticos o altitud de muestreo o factores como la talla de los organismos.

La carboxilesterasas (CaE) son miembros de la familia  $\beta$ -hidrolasa, se encargan de la hidrólisis de los éster (Zhang *et al.* 2015). La actividad CaE ha sido detectada en diversos tejidos en animales, plantas y microorganismos (Vilanova et al. 2006; Bianco et al. 2013), en el presente estudio fue posible determinar actividad CaE en tejido branquial de organismos *Ambystoma sp.* Los organismos *Ambystoma sp.* de la localidad 3 registraron una actividad significativa mayor de CaE en comparación con los organismos de la localidad 1 y 2 ( $p < 0.05$ ). Este resultado es similar al reportado por González (2009) quien observó una actividad significativa mayor de CaE en una población *S. serrifer* habitando una zona industrial en comparación con una población *S. serrifer* de una zona ecológica protegida. Igualmente, Rangel *et al.* (2014) observaron una actividad significativa mayor de CaE al exponer en aguas de un río de zona rural con bajo impacto antropogénico y aguas de un río de zona rural con bajo impacto antropogénico grupos de *Poecilia reticulata*. Ochoa *et al.* (2013) observaron diferencias en la actividad de CaE entre localidades, utilizando branquias y músculo abductor de ostras. La actividad CaE ha sido utilizada por décadas como un biomarcador sensible a compuestos organofosforados en diferentes organismos acuáticos. Se ha observado inhibición de esta enzima por compuestos organofosforados (Cruz, 2011). Igualmente, estudios con *Rinella arenanum*, un anfibio del grupo anuro, han demostrado que la inhibición de esta enzima demuestra la presencia de compuestos organofosforados. (Attademo *et al.* 2016). Por lo anterior y debido a que los organismos *Ambystoma sp.* poseen una alta capacidad de regeneración de tejido branquial, la actividad CaE en branquias de *Ambystoma sp.* puede ser una buena herramienta para evaluar condiciones de estrés por exposición a xenobióticos.

Los machos de *Ambystoma sp.* registraron una actividad significativa mayor CaE en comparación con las hembras. Además de acuerdo al análisis de correlación la actividad CaE estuvo asociada con parámetros ambientales como la altitud ( $p < 0.01$ ), el pH ( $p < 0.05$ ) y sólidos disueltos ( $p < 0.05$ ). Además, la actividad CaE se encontró asociada ( $p < 0.05$ ) a la talla de los organismos (peso y longitud). Por lo cual las variaciones de actividad CaE observadas entre localidades pudieran estar relacionadas con factores exógenos como presencia de xenobióticos o factores ambientales como altitud, pH y sólidos disueltos, además de la talla.

En cuanto a la capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) registrada en los organismos *Ambystoma sp.* en las distintas localidades evaluadas. Se observó que los organismos de la localidad 3 presentaron capacidad antioxidante significativa menor ( $p < 0.05$ ) con respecto a los organismos de las localidades 1 y 2 los cuales mostraron una capacidad antioxidante similar. En anfibios no se han realizado estudios para evaluar ORAC. Es de notar que los

organismos de la localidad 3 presentaron los valores de actividad GST y CaE más altos y al mismo tiempo presentaron la menor actividad ALP de todas las localidades siendo todas estas diferencias significativas con respecto a las demás localidades ( $p < 0.05$ ).

La capacidad antioxidante no enzimática en este estudio presentó una media similar tanto en machos como en hembras sin diferencias significativas. Otros estudios han reportado que las diferencias de género influyen en la adaptación a los cambios en la capacidad antioxidante, machos y hembras poseen una producción de especies reactivas a oxígeno diferente (Ginsburg *et al.* 2001; Andriichuk *et al.* 2014). En este caso esta distinción no parece afectar la capacidad no enzimática por género. Los análisis de correlación mostraron una alta asociación entre la capacidad antioxidante no enzimática y la temperatura ( $p < 0.01$ ) lo que concuerda con estudios en peces donde la fluctuación de la temperatura puede inducir estrés oxidativo (Vergauwen *et al.* 2013). Por otra parte, existen estudios que muestran que el incremento de la temperatura está ligado al incremento de la acumulación de metales en peces; níquel en zebrafish y mercurio en trucha arcoíris causando toxicidad (Macleod and Pessah, 1973; Scheil and Köhler, 2009; Vergauwen *et al.* 2013). La temperatura de los cuerpos de agua incluyendo sistemas de ríos, lagos y lagunas se ha visto incrementada debido al calentamiento global (Huang *et al.* 2011). También se observó una asociación entre la capacidad antioxidante no enzimática, la altitud y sólidos disueltos ( $p < 0.05$ ); mientras que no se observó asociación significativa entre la capacidad antioxidante no enzimática y la talla (peso y longitud) de los organismos *Ambystoma sp.*

El uso conjunto de enzimas como biomarcadores puede ayudar a discernir el comportamiento de una enzima por otras constantes o factores externos fuera de la contaminación, de la misma manera conocer sus asociaciones con los demás factores permitirá realizar un diagnóstico preciso sobre la calidad ambiental actual de un lugar. Estudios anteriores sugieren que los resultados son más completos cuando estas enzimas trabajan juntas. (Samanta *et al.* 2014; Milinkovitch *et al.* 2015; Aguilera *et al.* 2015; Sotomayor *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2016; Valerio-García *et al.* 2017).

En el presente estudio es de notar que los niveles de los biomarcadores evaluados en los organismos *Ambystoma sp.* de las localidades 1 y 2 fueron similares estadísticamente, mientras que los organismos de la localidad 3 tuvieron diferencias significativas en los niveles de todos los biomarcadores evaluados, además al observar la variación en los niveles de los biomarcadores en los organismos de la localidad 3 se observa una variación similar a la reportada por González (2009) quien al comparar una población de lagarto espinoso *Sceloporus serrifer* de una zona industrial con otra población de *S. serrifer* de una zona ecológica protegida, observó que la población que habitaba la zona industrial presentó valores de actividad significativamente más altos de GST y CaE en comparación con la

población de la zona protegida, mientras que la actividad de ALP fue significativamente menor en la población de la zona industrial en comparación con la población de la zona protegida. Al comparar los resultados de González (2009) con los resultados observados en el presente estudio en los niveles de biomarcadores en las poblaciones de *Ambystoma sp.*, es de notar que los organismos de la localidad 3 presentaron un comportamiento similar al observado en una población de *S. serrifer* de una zona industrial, en este caso los organismos *Ambystoma sp.* de la localidad 3 presentaron una actividad significativa mayor GST y CaE en comparación con las demás localidades evaluadas, además también presentaron una significativa menor actividad ALP con respecto a las demás localidades, por lo que se puede observar que estos resultados coinciden con los observados en una población de *S. serrifer* de una zona industrial con alto impacto antropogénico. Además, los organismos de la localidad 3 presentaron la menor capacidad antioxidante no enzimática de todas las localidades evaluadas.

El análisis del comportamiento, el crecimiento corporal y la biotransformación son también bioindicadores de una situación de estrés ya que los animales acuáticos por ejemplo los peces tienen una depresión de apetito con un claro impacto en el crecimiento y su reproducción, esto demuestra como el estrés ambiental tiene importantes implicaciones para la supervivencia (Schmidt *et al.* 2005). Durante la colecta de los organismos utilizados de las locaciones en comparación a los que encontramos en la última de ellas donde los organismos casi alcanzaban los 30 cm. Del mismo modo las dos primeras locaciones presentaron mayor abundancia de organismos juveniles a diferencia de la tercera locación donde los animales ya habían alcanzado su madurez sexual.

## CONCLUSIONES

Las poblaciones de ajolotes del género *Ambystoma sp.* en el sur de Nuevo León son organismos sensibles que pueden ser utilizados como especie centinela para medir la calidad ambiental

El tejido branquial de *Ambystoma sp.* presenta actividad enzimática de ALP, GST, CaE y capacidad antioxidante no enzimática (ORAC).

Las poblaciones de *Ambystoma sp.* en Nuevo León ofrecen una ventaja que pocas especies centinelas pueden brindar, el tejido branquial es suficiente para la detección de biomarcadores como la ALP, GST, CaE y ORAC, los cuales se pueden medir sin afectar la calidad de vida del organismo o su sacrificio, gracias a su capacidad de regeneración.

El uso de biomarcadores como la actividad enzimática de GST y CaE debe considerar la talla de los organismos por la asociación que presentan estos parámetros en *Ambystoma sp.*

El uso de biomarcadores como la actividad enzimática de ALP, GST, CaE y la capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) debe considerar parámetros ambientales como la temperatura, el pH, los sólidos disueltos y la altitud por la asociación que presentan estos parámetros en *Ambystoma sp.*

La medición de biomarcadores como la actividad enzimática de ALP, GST, CaE y la capacidad antioxidante no enzimática (ORAC) en poblaciones de *Ambystoma sp.* en el sur de Nuevo León son una herramienta útil para evaluar cambios ambientales, estados fisiológicos o situaciones de estrés.

## LITERATURA CITADA

Acosta-Galvis A. R. 2000. Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana* 1 (3): 289-319.

Acuña D. 2006. Informe científico sobre el efecto de los campos electromagnéticos en el sistema endocrino humano y patologías asociadas. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada. España.

Aguilar-Miguel, Legorreta B. y Casas-Adreu, 2009, Reproducción EX situ en *Ambystoma granulosum* y *ambystoma lermaense* (amphibia ambystomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s), 25(3): 443-454.

Aguilera C., Gonzalez P., Mendoza R., Lazcano D., Cruz J. 2012. Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Scelopirus spp.*) from two suburban populations of Monterrey, Mexico. *Exotoxicology*. Vol. 21 (8): 2103-2112.

Andriichuk A., Tkachenko H., Kurhaluk N. 2014. Gender difference of oxidative stress biomarkers and erythrocyte damage in well- trained horses during exercise. *Journal Equine Veterinary. Sci.* 34: 978–985.

Arana, M.R., G.N. Tocchetti, P. Domizi, A. Arias, J.P. Rigalli, M.L. Ruiz, M.G. Luquita, C. Banchio, A.D. Mottino, and S.S.M. Villanueva. 2015. Coordinated induction of GST and MRP2 by cAMP in Caco-2 cells: Role of protein kinase A signaling pathway and toxicological relevance. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 287:178-190.

Arango, S. 2011. Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *In* Biomarkers for the evaluation of human health risks. Vol. 30. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 75-82.

Argota G. y Gonzalez Y. 2013. Determinacion enzimatica y metales pesados en cerebro e hígado del modelo ecotoxicologico *Gambusia punctata* (Poeciliidae). MEDISAN Vol. 17 (2) : 221.

Attademo, A.M. Peltzer, P. M., Lajamanovich R.C, Cabagna M. and Fiorenza G. 2007. Plasma  $\beta$ -esterase and glutathione S- transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*. Vol. 16: 533-539.

Awofadeju S. O. 2016. Enzymatic and Non-enzymatic biomarkers levels in pregnancy trimesters in Ilesa South Western Nigeria. *International Blood research & reviews*. Vol. 6 (4): 1-11.

Bastos, F.F., R.A. Hauser-Davis, S.A.L. Tobar, R.C. Campos, R.L. Zioli, V.L.F.C. Bastos, and J.C. 2013. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. *Aquatic Toxicology*. 126:414-423.

Becker C. G., Rodriguez D., Longo A. V., Toledo L. F., Lambertini C., Leite D. S., Haddad C.F.B., Zamudio K. R. 2016. Deforestation, host community structure and amphibian disease risk. *Basci and applied Ecology* Vol. 17. 72-80.

Bianco K., Yusseppone M. S., Otero S., Luquet C., Del Carmen Ríos de Molina M., Kristoff G. 2013. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. *Aquatic Toxicology*. Vol. 144-145: 26-35.

Bisby, R.H., R. Brooke, and S. Navaratnam. 2008. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*. 108:1002-1007.

Bodera, P., W. Stankiewicz, K. Zawada, B. Antkowiak, M. Paluch, J. Kieliszek, B. Kalicki, A. Bartosiński, and I. Wawer. 2013. Changes in antioxidant capacity of blood due to mutual

action of electromagnetic field (1800 MHz) and opioid drug (tramadol) in animal model of persistent inflammatory state. *Pharmacological Reports*. 65:421-428.

Bulgaroni V., Rovedatti M. G., Sabino G., Magnarelli G. 2012. Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxylesterase activities in preschool children and their mothers. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol, 184. 3307-3314.

Casas Andreu G., Cruz Aviña R., Aguilar Miguel X. 2004. Un regalo poco conocido de México al Mundo: El Ajolote o Axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la critica situacion de sus poblaciones. *Ciencia Ergo Sum*. Vol. 10 (3): 304-308.

Cano-Martínez A., Vargas-González A., Guarner-Lans V., Prado-Zayago E., León-Olea M., Nieto-Lima B. 2010. *Archivos de Cardiología de México*. Vol. 80 (2). 79-86.

Cárcamo J. G., Aguilar M. N., Barrientos C. A., Carreño C. F., Yañez A. J. 2014. Emamectin benzoate treatment alters the expresssió n and actividad of CYP1A, FMO, and GST in different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. Octubre. Vol. 434, 188-200.

Cecilia, V., Z. Sebastian, R. Irma, H. Manuel, P.d.L. Claudia, and C. Silke. 2015. Procedimientos para la evaluación bioquímica del efecto tóxico de contaminantes. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias,, México, D.F. 160.

Chang Yuan-Hsiou, Wu Bing-Yu. 2015. Designation of amphibian corridor referring to the frog's climbing ability. *Ecological Engineering* Vol. 83. 152-158.

Chen C., Qu L., Li B., Xing L., Jia G., Wang T., Gao Y., Zhang P., Li M., Chen W., Chai Z. 2005. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clinical Chemistry*. Vol. 51 (4): 759 - 67. PMID 15695327.

Contreras-Balderas et al 2008, freshwater fishes and water status in Mexico: a country-wide appraisal *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 11 (3): 246-256.

Cirelli M. T. 2002. Tendencias legislativas en la ordenacion de la Fauna. Servicio para el desarrollo. Oficina Juridica de FAO. Organización de las naciones unidas para la alimentacion y la agricultura. Roma. Estudio Legislativo 74. ISBN 92.5.304785-2.

Davis, A.K., and J.C. Maerz. 2008. Comparison of Hematological Stress Indicators in Recently Captured and Captive Paedomorphic Mole Salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*. 2008:613-617.

Del Pliego P., Aguilera C., Mendoza R., Lazcano D., Cruz J. 2012. Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus* spp.) from two suburban populations of Monterrey, México. *Ecotoxicology*. DOI 10.1007/s10646-012-0978-0

Desrosiers, C., J. Leflaive, A. Eulin, and L. Ten-Hage. 2013. Bioindicators in marine waters: Benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems. *Ecological Indicators*. 32:25-34.

Du, B., and B. Xu. 2014. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of  $\beta$ -glucans from different sources with various molecular weight. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 3:11-16.

El-Sohemy A., Baylin A., Kabagambe E., Ascherio A., Spiegelman D., Campos H. 2002. Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plasma as biomarkers of dietary intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 76 (1): 172 - 9. PMID 12081831

Ezemonye, L., and I. Tongo. 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*. 81:214-217.

Falso, P.G., C.A. Noble, J.M. Diaz, and T.B. Hayes. 2015. The effect of long-term corticosterone treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught amphibian models. *General and Comparative Endocrinology*. 212:73-83.

Fernández-Salegui, A.B. y Terrón Alfonso, A. 2003. Biomonitorización de la calidad del aire en los alrededores de La Robla (León). *Revista Ecosistemas* 16 (2)

Galton V. A. (1991). Thyroid Hormone Receptors and Iodothyronine deiodinases in the developing Mexican Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *General and Comparative Endocrinology* 85, 62-70.

Garbisu, C.; Becerril, J.M.; Epelde, L. y Alkorta, I. 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Revista Ecosistemas* 16 (2): 44-49

Gavric J., Anelkovic M., Tomovic Ljiljana, Prokic M., Despotović S., Gravrilovic B., Radovanovic T., Borkovic.Mitic S., Pavlovic S., Saicic. 2017. Oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*natrix tessellata* Laurenti) during prehibernation and post. hibernation: A possible correlation with heavy metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 138, 154 - 162.

Geng Xiaofang et al. (2015). Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Journal of proteomics* 119, 196-208.

Gheddouchi, S., N. Mokhtari-Soulimane, H. Merzouk, F. Bekhti, F. Soulimane, B. Guermouche, A. Meziane Tani, and M. Narce. 2015. Low SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome. *Nitric Oxide*. 49:40-46.

Gil Hernandez, F. 2000. The role of biomarkers in human toxicology. Vol. 17. Revista de Toxicología, España. 19-26.

Gil F. 2008. The role of biomarkers in human toxicology. Revista Salud Pública Vol. 30 (1). 75-82.

Ginsburg G. S., O'Toole M., Rimm E., Douglas P. S., Rifai N. 2001. Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. Clinical Chimica Acta. Vol 305(1-2):131-9.

Gismondi E., Beisel J., Cossu-Leguille C. 2012. Influence of gender and season on reduced glutathiones concentration and energy reserves of gammarus roeseli. Environmental research. Vol. 118: 47-52.

Glantzounis G, Tsimoyiannis E., Kappas A., Galaris D. 2005. Uric acid and oxidative stress. Current Pharmaceutical Design. Vol. 11 (32): 4145 - 51. PMID 16375736.

Godwin, J.W., and N. Rosenthal. 2014. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. *Differentiation*. 87:66-75.

Gol M., Sisman A., Guclu S., Altunyurt S., Onvural B., Demir N. 2006. Fetal gender affects maternal serum total and placental alkaline phosphatase levels during pregnancy. European Journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology. Vol. 128: 253-256.

González C. A., Cruz J., Mendoza R. 2015. Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. Fish Physiology Biochemical. Vol. 41:1015-1027.

Hatfiel M. J., Umans R. A., Hyatt J. L., Yu X., Edwards C. C., Wierdl M., Tsurkan L., Taylor M. R., Potter P. M. 2016. Carboxylesterases: General detoxifying enzymes.

Chemico-Biological Interactions. November. Vol. 259. Part B. 327-331. doi: 10.1016/j.cbi.2016.02.011.

Harrison, R.M. 2003. El Medio Ambiente: Introducción a la química medioambiental y a la contaminación. Editorial Acirbia, S.A.

Hernández-Mosqueira C., Velez-delValle C., Kuri-Harcuch W. 2015. Tissue alkaline phosphatase is involved in lipid metabolism and gene expression and secretion of adipokines in adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*. Vol. 1850 Issue 12. 2485-2496.

Huang L., Liu J., Shao Q., Liu R. 2011. Changing inland lakes responding to climate warming in Northeastern Tibetan Plateau. *Climatic Change*. Vol 109. 479-502.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, Gobierno del Estado de Nuevo León, *Anuario Estadístico del Estado de Nuevo León año 2000*, Aguascalientes, Ags., 2000.

Jarrar B. and Taib N. 2012. Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 19 (2): 203-210.

Jemec, A. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies- lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. Vol. 17. D. Drobne, editor. *Environment Science Pollution*, Ljubljana, Slovenia. 571-581.

Jin, Y., L. Liu, S. Zhang, R. He, Y. Wu, G. Chen, and Z. Fu. 2016. Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress. *Chemosphere*. 144:168-175.

Khaw K., Woodhouse P. 1995. Interrelation of vitamin C, infection, haemostatic factors, and cardiovascular disease. *British Medical Journal*. Vol. 310 (6994): 1559 - 63. PMID 7787643.

Lévesque M., Gatién S., Finnson K., Desmeutes S., Villiard E., Pilote A., Roy S. (2007). Transforming Growth Factor Beta Signaling Is Essential for Limb Regeneration in Axolotls. *PLoS ONE* Vol. 2 (11): e1227. DOI 10.1371/journal.pone.0001227.

López, B.J., 2000, Bio marcadores moleculares de estrés oxidativo y contaminación ambiental, *Revista toxicología*, 17, 12-18

Macleod J. C., Pessah E. 1973. Temperature effects on mercury accumulation, toxicity and metabolic rate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences*. Vol. 30, 485-492.

Mercado-Mercado G., Duarte-Muñoz N. L., Álvarez-Parrilla E., De la Rosa L. A., Wall-Medrano A. 2012. Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1.): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas ecológicas y alimentarias. *Tecnociencia Chihuahua*. Mayo-Agosto. Vol. 6 (2): 112-122.

Milinkovitch T., Bustamante P., Huet V., Reigner A., Churlaud C., Thomas-Guyon H. 2015. In situ evaluation of oxidative stress and immunological parameters as ecotoxicological biomarkers in a novel sentinel species (*Mimachlamys varia*). *Aquatic Toxicology*. Vol. 161: 170-175.

Mohamed, S. 2008. Proportioning of biomarkers (GSH, GST, Ache, Catalase) indicator of pollution at *Gambusia affinis* (Teleostei Fish) exposed to Cadmium. Vol. 2. Q. Kheireddine, editor. *Environmental Research Journal*, Annaba, Algeria. 177-181.

Nachev M., Sures B. 2016. Environmental parasitology: Parasites as accumulation bioindicators in the marine environment. *Journal of sea research*. vol. 113. 45-50.

Nash S. B., Dawson A., Burkhard M., Waugh C., Huston W. 2014. Detoxification enzyme activities (CYP1A1 and GST) in the skin of humpback whales as a function of organochlorine burdens and migration status. *Aquatic Toxicology*. Vol. 155 : 2017-212.

Ochoa V., Riva C., Faria M., Barata C. 2013. Responses of B-esterase enzymes in oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted to pesticide contaminated bays from the Ebro Delta (NE, Spain). *Marine Pollution Bulletin*. January. Vol 66 (1-2) 135-142.

Oliva, M., C. Gravato, L. Guilhermino, M.D. Galindo-Riaño, and J.A. Perales. 2014. EROD activity and cytochrome P4501A induction in liver and gills of Senegal sole

Oliveira L., Cabral M. , Delfino C., Antoniazzi M., Risso W., Reis C. 2016. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. *Science of the Total environment*. Vol. 571: 983-991.

Parra- Olea, García-París, Wake B. 1998. Status of some populations of Mexican salamanders (Amphibian. Plethodontidae).

Pisanty, I; Caso, M. 2006. *Especies, espacios y riesgos. Monitoreo para la conservación de la biodiversidad*. Instituto Nacional de Ecología, Unidos por la Conservación y Comisión para la Cooperación Ambiental, México, D.F. [ISBN: 968-817-792-X] [[www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/507.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/507.pdf)]

Poletta G. L., Simoniello M. F., Mudry M. D. 2016. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comparative Biochemistry and physiology, part c*. Vol. 179, 29-36. Buenos Aires, Argentina.

Primack R. B. Joandomènec Ros. *Introducción a la biología de la conservación*. 2002. 384 páginas. Editorial Ariel. 2da Edición. España.

Prior, R.L. 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*. 18, Part B:797-810.

Prokic M., Borkovic-Mitic S., Krizmanic I., Gavric J., Despotovic S., Gavrilovic B., Radovanovic T., Pavlovic S., Saicic Z. 2017. Comparative study of oxidative stress

parameters and acetylcholinesterase activity in the liver of *Pelophylax esculentus* complex frogs. Saudi Journal of biological sciences. Vol. 24: 51-58.

Rangel Martínez C. A. 2014. Evaluacion de los niveles de actividad enzimatica de esterasas y fosfatasas en peces (*Poecilia reticulata*) expuestos a diferentes ecosistemas acuáticos del estado de Nuevo León. Tesis licenciatura. Universidad Autonoma de Nuevo León.

Ramírez, A.V. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. Vol. 67. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Lima, Perú. 49-58.

Reutgard M. Furuhaugen S. 2016. Linking sub-cellular biomarkers to embryo aberrations in the benthic amphipod *Monoporeia affinis*. Aquatic Toxicology Vol. 173, 36-42.

Richardson K. L., López-Castro M., Gardner S. C. and Schelenk. 2009. Polychlorinated biphenyl's and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from Baja California Peninsula of Mexico. Archives Environment Contamination. Toxicology. DOI 10.1007/SOO244-009-9360-5.

Rie M. T. Lendas K. A., Woodin B. R., Stegeman J. J., and Callardl. P. 2000. Hepatic biotransformation enzymes in the sentinel species, the painted turtle (*Chrysemys picta*), from Cape Cod, Massachusetts: seasonal-, sex- and location related differences. Biomarkers Vol. 5 (5): 382-394.

Riemann J. C., Ndriantsoa S. H., Raminosoa N. R., Rödel Mark-Oliver. 2015. The value of forest fragments for maintaining amphibian diversity in Madagascar. Biological Conservation Vol. 191. 707-715.

Robinson Brian. 2012. The Axolotl: A unique option for the aquarium. Tropical Fish Magazine. Octubre.

Rodrigues Venancio L. P., Afonso Silva M.I., da Silva T.L, Gibbe Moschetta V. A., Pires de Campos Zuccari D. A., Almeida E. A., Bonini-Domingos C. R. Pollution-induced metabolic

responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. *Ecotoxicology and environmental safety*. Vol. 97, 1-9.

Rollins-Smith L. A. 2016. Amphibian immunity-stress, disease and climate change. *Developmental and comparative immunology* xxx. 1-9.

Safi R., Bertrand S., Marchand O., Duffraisse M, De Luze A., Vanacker J., Maraninchi M., Margotat A., Demeneix B., Laudet V. 2004. The axolotl (*Ambystoma mexicanum*) a neotenic amphibian, expresses functional thyroid hormone receptors. *Endocrinology*. Vol. 145 (2): 760-772.

Samanta P., Pal S., Mukherjee A. K., Ghosh A. R. 2014. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. September. Vol. 107, 120-125.

Sanni S., Lyng E., Pampanin D. M., Smit M. G. D. 2016. II Species sensitivity distributions based on biomarkers and whole organism responses for integrated impact and risk assessment criteria. *Marine Environmental research*. December. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.12.003>.

Scheil V., Kohler R. 2009. Influence of nickel chloride, chlorpyrifos, and imidacloprid in combination with different temperatures on the embryogenesis of the zebrafish *Danio rerio*. *Archives of environment contamination and toxicology*. Vol 56. 238-243.

Schmidt K., Staaks G., Steinberg E. 2005. Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*. Vol 71: 49-59.

Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (1999): 757-777.

Shi, J., L. Wang, H. Zhang, Q. Jie, X. Li, Q. Shi, Q. Huang, B. Gao, Y. Han, K. Guo, J. Liu, L. Yang, and Z. Luo. 2015. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. *Bone*. 79:222-232.

Silva L. P., Miyasaka C. K., Martins E. F., Leite J.R.S.A., Lacava Z. G. M., Curi R., Azevedo R. B. 2004. Effect of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil administered by gavage on the fatty acid composition and oxidative stress of mouse liver. *Brazilian Journal of medical and biological research*. Vol. 37: 1491-1496.

Snyder M., Henderson W., Glinski D., Purucker S. 2017. Biomarker analysis of American toad (*Anaxyrus americanus*) and grey tree frog (*Hyla versicolor*) tadpoles following exposure to atrazine. *Aquatic Toxicology*. Vol. 182: 184-193.

Solé M., Garcia de la Parra L. M., Alejandre-Grimaldo S., Sarda F. 2006. Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshote commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 52 (12) 1708-1716.

*Solea senegalensis* from a polluted Huelva Estuary (SW Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 166:134-144.

Sornom P., Felten V., Médoc V., Sroda S., Rousselle P., Beisel Jean-Nicolas. 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution*. May. Vol. 158 (5). 1288-1295.

Sotomayor V., Chiriotto T. S., Pechen A. M., Venturino A. 2015. Biochemical biomarkers of sublethal effects in *Rhinella arenarum* late gastrula exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. 119: 48-53.

Sowell A., Huff D., Yeager P., Caudill S., Gunter E. 1994 .Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene, and

four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clinical Chemistry*. Vol. **40** (3): 411 - 6. PMID 8131277.

Srinivas, R., Jayalakshmi, S. K., Sreeramulu, K., Sherman, N. E. y Jayasimha, R. 2006. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Volume 1760 (3): 310-317.

Suazo Ortuño I. y Alvarado Díaz J. 2004. Anfibios: Centinelas de la Biodiversidad. *Ciencia y Desarrollo*. Septiembre - Octubre. Vol. 30. Num.178. Mexico. 6-13.

Teichert J., Preiss R. 1992. HPLC-methods for determination of lipoic acid and its reduced form in human plasma. *International Journal of clinical pharmacology*. Vol. 30 (11): 511 - 2. PMID 1490813.

Terrazzano, G., V. Rubino, S. Damiano, A. Sasso, T. Petrozziello, V. Ucci, A.T. Palatucci, A. Giovazzino, M. Santillo, B. De Felice, C. Garbi, P. Mondola, and G. Ruggiero. 2014. T cell activation induces CuZn superoxide dismutase (SOD)-1 intracellular re-localization, production and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1843:265-274.

Tijerina Sáenz, A., I. Elisia, S.M. Innis, J.K. Friel, and D.D. Kitts. 2009. Use of ORAC to assess antioxidant capacity of human milk. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22:694-698.

Trivedi S. P., Kumar M., Mishra A., Banerjee I., Soni A. 2001. Impact of linear alkyl benzene sulphonate (LAS) on phosphatase activity in testis of teleostean fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal Environment Biol*. Vol. 22 (4): 263-266.

Trof R. J., Di Maggio F., Leemreis J., Groeneveld A. B. 2006. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* Vol. 26 (3): 245- 253.

Valentine, J.S., S. Doucette Pa Fau - Zittin Potter, and S. Zittin Potter. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis.

Valerio-Garcia R. Carbajal-Hernandez A., Martínez-Ruíz E., Jarquín-Díaz V., Haro-Pérez C., Jerónimo F. 2017. Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. Vol. 583: 308-318.

Vanegas, C., S. Zuñiga, I. Rosas, M. Hernández, C.P.d. León, and S. Cram. 2015. Procedimientos para la evaluación bioquímica del efecto tóxico de contaminantes. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias,, México, D.F. 160.

Vázquez G., Castro I., Pérez R. y Castro T. 2006. Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. Contactos Vol. 60, 41-48.

Walker, C.H. 1996. The role of biomarkers in environmental assessment. Vol. 3. D.B. Peakall, editor. Ecotoxicology, London. 173-179.

Vergauwen L., Hagenars A., Blust R., Knapen D. 2013. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression physiology.

Vitale A. A., Bernatene E. A., Pomilio A. B. 2010. Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. Acta Bioquímica Clínica latinoamericana. Vol. 44 (2): 195-238.

Vilanova E., Soler F., Ganga R., Sogorb M. A. 2006. Preliminary characterization of carboxylesterase activities found in plasma of wild birds. Toxicology Letters. Vol. 164: S157.

Wang, L., Y. Peng, X. Nie, B. Pan, P. Ku, and S. Bao. 2016. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Vol.179:49-56.

Wei Y., Zhou W., Chai Y., Yuan R., Xiang Y. 2016. Coupling hybridization chain reaction with catalytic hairpin assembly enables non-enzymatic and sensitive fluorescent detection of microRNA cancer biomarkers. *Biosensors and bioelectronics*. Vol. 77 :416-420.

Winandy L., Darnet E., Denoel M. 2015. Amphibians forgo aquatic life in response to alien fish introduction. *Animal Behaviour* Vol. 109:209-216.

Wunderlich, A.C., R.J. Silva, É.O.P. Zica, M.F. Rebelo, T.E.M. Parente, and V.M. Vidal-Martínez. 2015. The influence of seasonality, fish size and reproductive status on EROD activity in *Plagioscion squamosissimus*: Implications for biomonitoring of tropical/subtropical reservoirs. *Ecological Indicators*. 58:267-276.

Zamora E. S. 2011. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis para obtener el título de médico veterinario zootecnista. Universidad Autónoma de México. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.

Zhan C., Xu Y., Gao P., Lu J., Li X., Liu D. 2015. Down-regulation of carboxylesterases 1 and 2 plays an important role in profrug metabolism in immunological liver injury rats. *International Immunopharmacology*. Vol. 24, Issue 2, February. 153-158.

Zhan Q., Zhang C., Anjum Shahzad S., Yu C. 2016. A fluorescence turn on assay for alkaline phosphatase bases on the Cu<sup>2+</sup> catalyzed fenton-like reaction. *Talanta*. Vol. 158. 342-350.

Zita C., Overvad K., Mortensen S., Sindberg C., Moesgaard S., Hunter D. 2003. Serum coenzyme Q10 concentrations in healthy men supplemented with 30 mg or 100 mg

coenzyme Q10 for two months in a randomised controlled study. *Biofactors*. Vol. 18 (1 – 4): 185 - 93. PMID 14695934.

Zulueta, A., M.J. Esteve, and A. Frígola. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 114:310-316.

## ANEXOS



**Anexo 1. Captura y toma de datos físicos de los organismos de *Ambystoma* sp.**



**Anexo 2. *Ambystoma sp.* Capturado en la localidad 3. Este organismo representa una de las mayores tallas encontradas en la colecta.**



**Anexo 3. *Ambystoma sp.* Capturado en la localidad 3. Presentación de un individuo tras metamorfosis. El único capturado durante la colecta que no participo en las evaluaciones de biomarcadores.**

#### **Anexo 4. Solución de Trabajo para Técnica de Bradford**

Utilizar 425 ml agua destilada, 15 ml 95% etanol, 30 ml 88% ácido fosfórico, 30 ml Bradford stock solution. Utilizar un frasco oscuro.

#### **Anexo 5. Curva de Lineamiento para Bradford.**

BSA mg/ml	Vol. $\mu$ L BSA	Vol. $\mu$ L Buffer (Agua Destilada)
0.5	500	500
0.40	400	600
0.30	300	700
0.25	250	750
0.20	200	800
0.10	100	900
0.05	50	950

#### **Anexo 6. Preparación del Sustrato para determinación de Glutación-s-transferasa**

1. Preparación Glutación reducido. 30 mg Glutación reducido en 500  $\mu$ L de Buffer DBPS
2. CDNB: 10 mg de CDNB en 500  $\mu$ L de DMSO

Mezclar: 29.4 ml de buffer DPBS, 300  $\mu$ L de glutación reducido y 300  $\mu$ L de CDNB.

**Anexo 7. Preparación de la curva estándar de Trolox para el uso de la técnica de ORAC.**

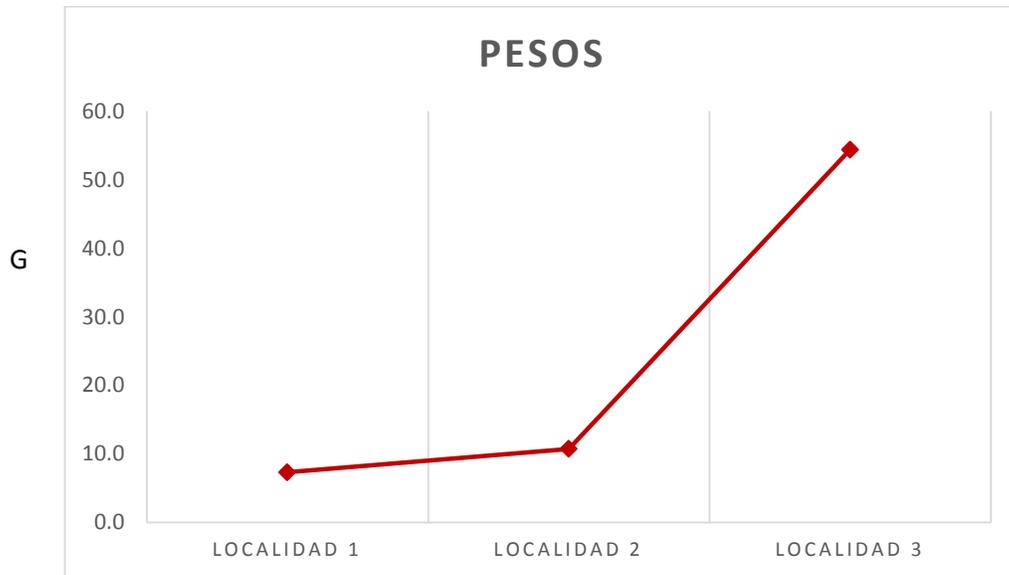
<b>Estándar (STD) 100</b>	40 $\mu$ L de alícuota Trolox	560 $\mu$ L de buffer fosfato (BF)
<b>STD 50</b>	300 $\mu$ L STD 100	300 $\mu$ L de BF
<b>STD 25</b>	300 $\mu$ L STD 50	300 $\mu$ L de BF
<b>STD 12.5</b>	300 $\mu$ L STD 25	300 $\mu$ L de BF
<b>STD 6.25</b>	300 $\mu$ L STD 12.5	300 $\mu$ L de BF
<b>STD 0</b>	---	300 $\mu$ L de BF

**Anexo 8. Preparación de fluoresceína diluida**

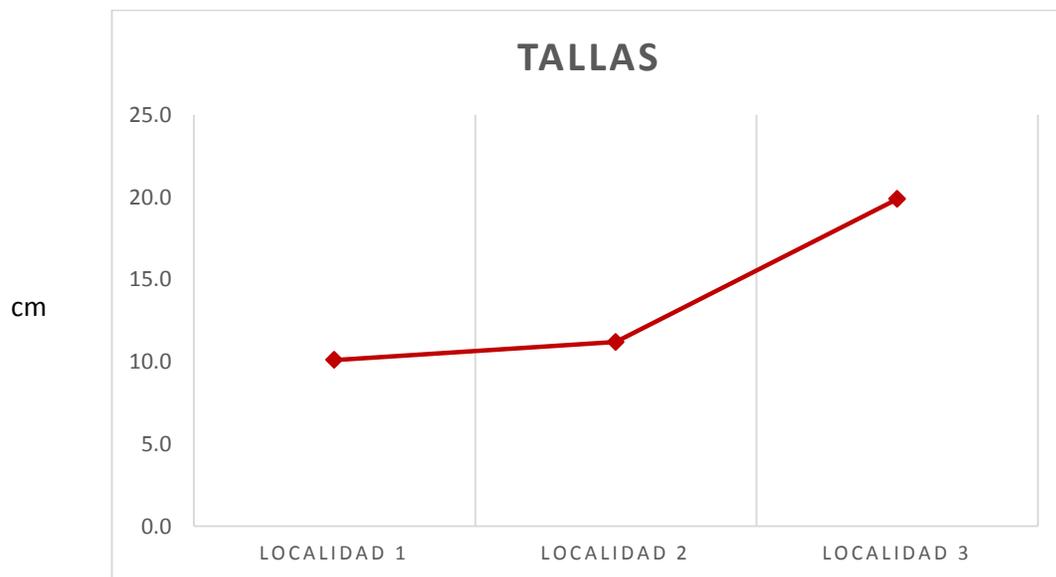
50 $\mu$ L Fluoresceína	Aforar a 10 mL BF
-------------------------	-------------------

**Anexo 9. Preparación de AAPH**

0.2070 g (exacto)	Aforar 5 mL de BF
-------------------	-------------------



**Peso promedio de cada una de las localidades donde fue realizado el muestreo.**



**Talla promedio de cada una de las localidades donde fue realizado el muestreo.**