

DETERMINACIÓN DE TIOLES TOTALES Y TIOLES SOLUBLES EN ÁCIDO EN EL PEZ *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) EXPUESTO A CADMIO

Total and Soluble Thiols in Acid Determination on the Freshwater Fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Exposed to Cadmium

Raquel Salazar-Lugo ^{1*}, Roylda Pérez ², Alida León ¹, Mairin Lemus ³ y Luisa Rojas de Astudillo ⁴

¹ Lab. de proteínas e inmunotoxicidad, Postgrado de Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.

² Dpto. de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente. ³ Laboratorio de Ecofisiología, Instituto Oceanográfico de Venezuela. ⁴ Dpto. de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente. *Correspondencia: Dra. Raquel Salazar Lugo, Laboratorio de Proteínas e inmunotoxicidad, Postgrado de Biología aplicada, Cerro del Medio, Universidad de Oriente.

Tel. 0293 4002270. E-mail: raquelugove@yahoo.com

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la distribución de tioles totales y de tioles solubles en ácido en diferentes tejidos del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum* en condiciones de cultivo, y aclimatados en el laboratorio durante 15 y 30 días, y el efecto del cadmio sobre estos parámetros en organismos expuestos durante 21 días y depurados 15 días después de la exposición al metal. La distribución de tioles totales (TT) y de tioles solubles en ácido (TSA) varió con las condiciones ambientales en las cuales se encontraban los organismos, observándose que en peces en cultivo, los mayores valores de TT se presentan en el plasma>músculo>branquias, en peces aclimatados a condiciones de laboratorio (15 días), se observó la siguiente distribución: branquias>músculo>hígado>plasma>riñón y en peces aclimatados 30 días fue branquias>riñón>hígado>músculo>plasma. Para los TSA, la distribución fue la siguiente: organismos provenientes de condiciones de cultivo: músculo>plasma>hígado>branquias. En los peces con 15 días de aclimatación: hígado>branquias>músculo; el riñón y el plasma presentaron valores cercano a cero. En peces con 30 días de aclimatación fue branquias>músculo>hígado>riñón>plasma. La exposición crónica a cadmio produjo un aumento significativo de la concentración de TT y de TSA en el plasma. Los organismos depurados 15 días disminuyeron la concentración de TSA en plasma no así la de TT. La determinación de tioles, podría considerarse un importante parámetro auxiliar, en el diagnóstico y monitoreo de peces expuestos a ambientes contaminados por cadmio.

Palabras clave: Tioles, *Colossoma*, cadmio.

ABSTRACT

In this study was evaluated the distribution of total thiols (TT) and acid soluble thiols (AST) in tissues of the freshwater fish *Colossoma macropomum* providing of cultivation and acclimated in laboratory by 15 and 30 days, as well, was evaluated the effect of cadmium on these parameters in Cd-exposure fishes during 21 days and in Cd-depuration fishes (15 days). TT and AST showed variations with environmental conditions; In Farmer fishes were, TT: plasm>muscle>gills; acclimated fishes (15 days): gills>muscle>liver>plasm>kidney and acclimated fishes (30 days): gills>kidney>liver>muscle>plasm. The distribution of AST was: farmer fishes: muscle>plasm>liver>gills. Acclimated fishes (15 days): liver>gills>muscle; the kidney and the plasm presented near values to zero, and acclimated fishes (30 days) was gills>muscle>liver>kidney>plasm. Cadmium exposition produced a significant increase in the TT and TSA concentration of plasm. Cd-depured fishes showed a decrease in plasm TSA concentration but not in plasm TT concentration. Thiol assays could be considered an important parameter in the diagnosis and monitor of fishes environmental Cd exposed.

Key words: Thiols, *Colossoma*, cadmium.

INTRODUCCIÓN

Para adecuarse a la dinámica de elementos, como los metales pesados, los organismos han desarrollado mecanismos efectivos de tolerancia para enfrentar el exceso de metal en sus células. La literatura reporta que los metales pesados, aumentan la expresión de pequeñas proteínas conocidas como tioredoxinas, metalotioninas y de péptidos como el glutatión; estas moléculas tienen alto contenido de cistei-

nas [20, 23, 25]. La importancia de las moléculas ricas en grupos tioles en los procesos de contaminación en los organismos, expuestos a metales pesados está bastante documentada en la literatura [16, 18]. Al respecto, se han desarrollado pruebas sencillas y rápidas que permiten la identificación y cuantificación de estas moléculas en diferentes tejidos de los organismos. Dentro de estas pruebas están la estimación del contenido de tioles totales (proteínas, péptidos, cisteína y otras moléculas ricas en tioles) y de tioles solubles en ácido (pequeñas moléculas ricas en tioles), que se ha empleado mayormente como un indicador de la contaminación con metales pesados en las plantas [11, 24, 26, 29], aunque también se utiliza en la evaluación de las concentraciones de glutatión, homocisteína y cisteína en niños autistas [17]. Esta prueba tiene la ventaja de poder ser realizada en sangre. De tal forma que es posible seguir, a través de las mismas, la capacidad que tiene el organismo de desintoxicarse.

El cadmio es un metal no bioesencial que tiene la capacidad de competir con metales tales como el zinc y el calcio por los sitios de unión que tienen estos elementos en las biomoléculas; debido a esto, resulta sumamente tóxico para los organismos [8, 9, 28]. A nivel molecular, su efecto está relacionado con la inhibición parcial de la cadena transportadora de electrones, específicamente a nivel del complejo III en el sitio de unión de la semiubiquinona; esta molécula transfiere un electrón al oxígeno molecular para formar el anión superóxido, esto explica el efecto oxidativo inducido por este metal en las células [36]. Moléculas tales como el glutatión, metalotioninas y fitoquelatinas son inducidas en organismos expuestos a cadmio [1, 6, 10, 11, 13-15].

Entre los efectos tóxicos del cadmio observados, tanto en animales experimentales como en el hombre, se encuentran daño tubular renal, necrosis placentaria y testicular, daño en el hígado a nivel funcional y estructural, osteomalacia, tumor testicular, malformaciones teratogénicas, anemia, hipertensión, edema pulmonar, enfisema pulmonar crónico y además, induce deficiencia de hierro, cobre y zinc [8, 9, 22, 25].

La biodisponibilidad en el ambiente de este metal es el resultado de procesos antropogénicos. El registro de cadmio en sedimento o agua de algunos ríos venezolanos excede los límites establecidos como normales por los comités internacionales y nacionales, casos de éstos, son los del río Manzanares en el estado Sucre; la cuenca sur del río Orinoco (principal río de Venezuela), el río Tuy, entre otros, en donde los valores de cadmio no deberán exceder de los siguientes límites: 0,01 mg/L y 0,0005 mg/L para aguas de los subtipos I y II, respectivamente, según los valores establecidos por el Ministerio de Ambiente en el Decreto Nº 883 [27, 34]. Los límites de permisibilidad establecidos por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) para el cadmio, en agua, no debe exceder de 0,1 µg/g ni de 5 µg/g, de acuerdo a lo establecido por la Administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos (FDA) [6, 12]. Sin embargo, aunque los registros de la concentración de cadmio en agua estén por debajo de los límites permisibles, como en el

caso del río Guasare, estado Zulia, los organismos tienden a bioacumularlo, lo cual fue demostrado cuando se hicieron evaluaciones preliminares de 11 especies de peces provenientes de esa localidad en los cuales se encontraron concentraciones de cadmio que excedían estos límites [33].

Concentraciones subletales de cadmio producen leucopenia y anemia en el pez *C. macropomum* (Cuvier, 1818) afectando así su sistema inmunológico y haciéndolo susceptible a contraer enfermedades producidas por microorganismos oportunistas [5]. Este pez típico de ríos de Venezuela y del Amazonas, es actualmente utilizado en piscicultura por su apetecible carne [2]. La resistencia de la especie a la manipulación y a las enfermedades [4], lo hace un organismo adecuado para el desarrollo de pruebas en el laboratorio que sirvan para evaluaciones toxicológicas efectivas. En este trabajo se estandariza la determinación de tioles en diferentes tejidos y se evalúa la utilidad de esta prueba para evaluar el efecto crónico del cadmio, en el pez *C. macropomun*, como indicador de toxicidad por este metal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra poblacional

Se utilizaron ejemplares juveniles de *C. macropomum*, cuyos índices biométricos oscilaron entre $13,2 \pm 2,5$ cm de longitud y $40,3 \pm 9,1$ g de peso; los peces fueron donados por Piscicultura Alma C.A. (ALMACA), ubicada en la carretera nacional Cantaura – Aguasay, Campo Mata, Distrito Freites del estado Anzoátegui. Allí fueron capturados en las lagunas de crías, utilizando como arte de pesca chinchorros de mallas de 0,5 cm de diámetro aproximadamente y fueron transportados hasta el laboratorio de Inmunotoxicidad de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela. Debido a la dependencia que pudiera tener los parámetros a determinar con las condiciones ambientales, inmediatamente de ser capturados, a un grupo de peces (peces en condiciones de cultivo) se les realizaron las determinaciones de tioles en los tejidos, el resto se trasladó al laboratorio para aclimatarlos a las condiciones de laboratorio. Los organismos fueron colocados en acuarios, de medidas $60 \times 30 \times 40$ cm³, aproximadamente, y con capacidad para 60 L de agua, preparados 24 horas antes con agua aireada y declorada.

Aclimatación de los organismos a las condiciones de laboratorio

Los peces se aclimataron hasta por 30 días antes de realizar los ensayos de toxicidad. A los quince días de aclimatación se sacrificaron un grupo de peces (8) y se les cuantificaron el contenido de tioles en los tejidos. Diariamente se realizó el recambio del 60% del agua. Toda la aclimatación se realizó con fotoperíodo de 12/12 horas; la temperatura del laboratorio se controló a $22 \pm 5^\circ\text{C}$, el pH del agua se mantuvo en $24 \pm 5^\circ\text{C}$: Los peces se alimentaron *ad libitum*, todas las mañanas,

antes de efectuar el recambio de agua, agregándole en el agua alimento comercial granulado (cachamarina, PURINA). Después de la aclimatación, los peces se consideraron aptos para el bioensayo, el cual se realizó con una dosis subletal tomada a partir de la LC_{50} para la especie (considerando la talla y peso del organismo) [5].

Ensayo crónico a cadmio

Se procedió a exponer a los peces a la concentración subletal de 1 mg/L de cadmio. La concentración requerida del metal se preparó a partir de una solución madre de cloruro de cadmio de 50 mg/l ($CdCl_2 \cdot 5H_2O$, Riedel-Häen). Se tomaron 18 peces en total, con tallas y pesos similares; de estos 18 peces, 6, con su respectiva réplica, fueron expuestos por 21 días a la concentración antes mencionada y 6 peces se dejaron como controles. Se les suministró alimento *ad libitum*, cada 24 horas alternando con los cambios de agua y luego se le agregó al agua la dosis correspondiente del metal. Transcurrido el tiempo de exposición, los peces fueron debidamente pesados y tallados, posteriormente se procedió a la toma de muestras sanguíneas, las cuales se obtuvieron por punción de la vena caudal, utilizando para ello jeringas desechables de 3 mL con agujas de 21 G x 38 mm previamente heparinizadas. Seguidamente, se tomaron al azar seis (6) ejemplares expuestos a Cd y seis (6) ejemplares controles y se disectaron para obtener los tejidos hígado, branquias, riñón y músculo esquelético, los cuales fueron congelados a $-40^{\circ}C$ hasta su posterior procesamiento. Los otros seis ejemplares, se colocaron en acuarios limpios con agua de clorada y aireada para que se desintoxicaran, esto por un tiempo de quince (15) días, este tiempo fue escogido de manera arbitraria.

Determinación de tioles totales [29]

La determinación de tioles totales en sangre se realizó centrifugando la muestra, y tomando 40 μL del plasma y a éste se le adicionaron 150 μL de solución amortiguadora, 25 μL del reactivo DTNB (ácido-55'-dithiobis-2-nitrobenzoico) y 800 μL de metanol, esta mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para luego proceder a realizar la lectura del sobrenadante obtenido en un espectrofotómetro marca Jenway, modelo 6300, (Jenway Ltd, Reino Unido) a una longitud de onda de 412 nm. Se tomó 0,5 g del tejido y se le agregaron 2 ml de buffer dilución ($30 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Tris HCl, $3 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ EDTA pH 8,2) y se procedió a homogenizarlos con un triturador eléctrico marca Tissue Terror, modelo U-04750-50, (BioSpec Products Cole Palmer Internacional, EUA). El homogenizado se centrifugó en una centrífuga IEC, modelo B21M, (Tennessee, EUA) a 3000 rpm por 5 minutos a $4^{\circ}C$, se tomó el sobrenadante y a éste se le añadieron 150 μL de buffer, 25 μL del reactivo DTNB y 800 μL de metanol, la mezcla resultante se centrifugó a 3 000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se tomó para realizar la lectura en un espectrofotómetro a 412 nm.

Determinación de tioles solubles en ácido [29].

Para la determinación de los tioles solubles en ácido en el plasma, se procedió a tomar 200 μL del plasma y se le agregaron 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 100%, esta mezcla fue llevada al congelador por 15 minutos para acelerar la precipitación de las proteínas y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de los tioles solubles en ácido, agregándole 800 μL de Tris HCl pH 8,9; 80 μL de DTNB y 200 μL y se leyó en el espectrofotómetro a 412 nm.

Para la determinación de los tioles solubles en ácido en los tejidos, se tomaron 0.5 g del tejido, se homogenizaron con 0.5 ml del buffer Tris EDTA pH 8,9; el homogenizado se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, del sobrenadante obtenido, se tomaron 200 μL a los cuales se le adicionaron 200 μL de TCA; se colocaron en el congelador por 15 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm; se tomaron 200 μL del sobrenadante y a continuación se le agregaron 800 μL de Tris HCl pH 8,9 y 80 μL de DTNB, que fueron leídos inmediatamente en el espectrofotómetro a 412 nm.

Preparación de la curva estándar: Se prepararon dos estándares de glutation reducido (GSH) uno a la concentración de $10 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ para la elaboración de la curva de calibración de tioles totales y otro a una concentración de $100 \mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ para la curva de calibración correspondiente a los tioles solubles en ácido. Los resultados obtenidos de la lectura en absorbancia fueron expresados en $\mu\text{mol} \cdot L^{-1} \text{SH}$ por mL.

Análisis estadístico

El contenido de tioles totales y tioles solubles en ácido, en los diferentes tejidos evaluados (plasma, branquias, hígado, músculo y riñón), del pez *C. macropomum* controles, expuestos a cadmio y depurados, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA), a aquellos grupos que dieron diferencias significativas se les realizó un análisis a posteriori SNK [30].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la FIG. 1A se presenta la distribución de tioles totales (TT) en *C. macropomum* provenientes de las lagunas de cultivo, y mantenidos en el laboratorio (15 y 30 días); los mayores valores de TT se observan en el plasma seguido del músculo y las branquias. Las condiciones de laboratorio modifican la distribución de este parámetro; los peces aclimatados 15 y 30 días presentaron los mayores valores de tioles totales en las branquias; el riñón aparece como órgano sintetizador de estas moléculas a los 30 días de encontrarse los peces aclimatados en el laboratorio.

Para los tioles solubles en ácido (TSA), en los organismos provenientes de condiciones de cultivo, se observó que el

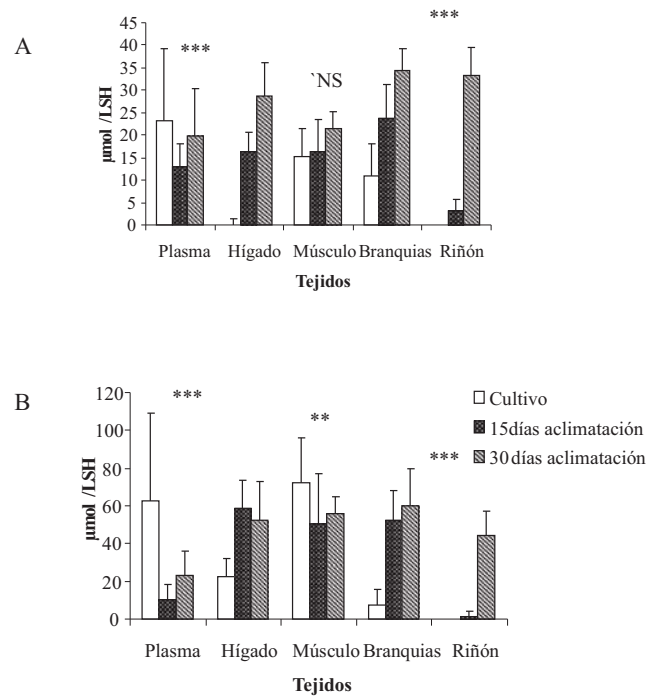
músculo presenta los valores más altos, seguido del plasma, hígado y branquias y riñón (FIG. 1B). Esta distribución fue modificada en los organismos al aclimatarlos a las condiciones de laboratorio, en donde se observa que, tanto para los 15 días como para los 30 días de mantener los peces aclimatados al laboratorio, el hígado, los músculos, las branquias y los riñones presentan una concentración semejante de TSA la cual resultó estadísticamente no significativa. Lo que sugiere que bajo ciertas condiciones ambientales, los tejidos evaluados (branquias, hígado músculo y riñón) contribuyen equitativamente en la formación de tioles solubles en ácido.

Estos resultados indican que la distribución de tioles en *C. macropomum* va a ser afectada por las condiciones de medio externo, la distribución de TT y TSA va a estar relacionada con la dinámica de estas moléculas en los diferentes tejidos y con las condiciones del organismo y del medio; observándose un papel importante del músculo en la síntesis de las mismas. Este tejido no ha sido considerado como sintetizador de moléculas ricas en grupos tioles, a diferencia de otros tejidos como hígado, riñón y las branquias [32]; El análisis de los valores basales de moléculas ricas en grupos tioles en organismos provenientes de cultivo y aclimatados al laboratorio permite determinar cuándo los cambios de la concentración de las mismas están asociados al efecto de algún tipo de xenobiótico o a valores fisiológicamente normales.

La exposición crónica a cadmio produjo un aumento significativo de la concentración de tioles totales en el plasma (FIG. 2A) seguido de una disminución estadísticamente significativa de este parámetro en el hígado y en las branquias. Una vez depurados los organismos, se observó que la concentración de los tioles totales en hígado tiende a regresar a los valores observados en los controles, al igual que en el plasma; no así la concentración de TT observada en branquias y músculo que permanecen elevadas. El aumento de TT en el plasma de organismos expuestos crónicamente a cadmio, indica que este metal induce la síntesis de moléculas ricas en grupos SH desde los órganos blancos y que estas son rápidamente transportadas a la sangre [3, 18, 32].

En cuanto a los TSA, los organismos expuestos a cadmio presentaron un aumento altamente significativo de este parámetro en el plasma y en el músculo ($P < 0,001$, FIG. 2B); en experimentos previos con peces expuestos a 1 mg/L de cadmio durante cuatro días, se observó este mismo comportamiento, encontrándose además que la concentración de TSA en riñón se mantuvo en valores semejantes a los de los peces controles; es decir, la exposición de los peces a cadmio no modificó la concentración de TSA en este tejido (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que en *C. macropomum*, la dinámica de formación de tioles de muy baja masa molecular, durante la exposición a cadmio, es manejada por el músculo y el hígado y que la determinación de TSA en el pez expuesto a cadmio pudiese ser cuantificada tanto en el plasma como en el músculo, y no así en órganos como riñón, branquias o hígado.

El incremento de los TSA en el plasma y en el músculo sugiere que inicialmente, se induce la síntesis de moléculas ricas en grupos tioles de baja masa molecular, probablemente cisteína y glutatión como una primera alternativa para capturar el exceso de metal en el organismo; demostrado por la drástica disminución de las mismas, una vez que los organismos son desintoxicados (FIG. 2B). La rápida recuperación de la respuesta de producción de tioles observado en plasma y músculo de organismos depurados sugiere que las moléculas de baja masa molecular (glutatión, cisteína, y otros péptidos ricos en grupo tioles) pasan rápidamente al torrente sanguíneo y allí forman complejos con el cadmio, estos complejos son fácilmente filtrados por los riñones, debido a que pueden atravesar la barrera de filtración glomerular [35] y demuestra que en *C. macropomum*, la captura y desintoxicación del organismo para el cadmio es manejada inicialmente por moléculas de muy baja masa molecular ricas en grupos sulfhidrilos., en donde es posible que el glutatión juegue el principal rol, tal y como ha sido demostrado en la trucha *Oncorhynchus mykiss* [19]. En la tilapia *Oreochromis mossambicus* expuesta a una con-



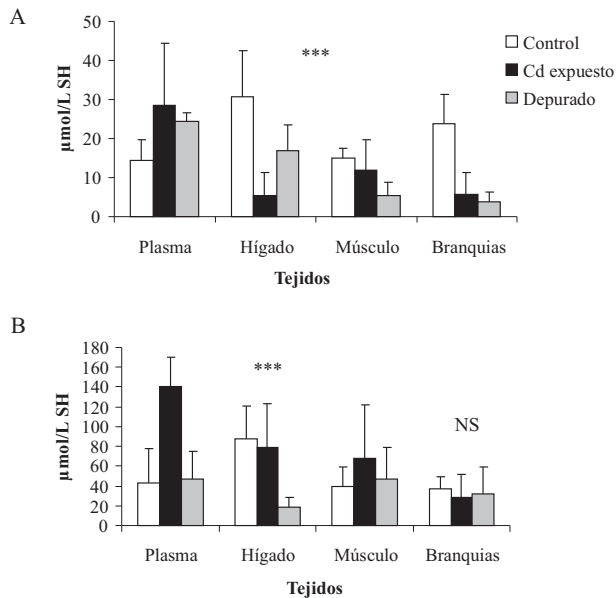


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE TIOLES TOTALES (A), TIOLES SOLUBLES EN ÁCIDO (B) EN DIFERENTES TEJIDOS PROVENIENTES DEL PEZ *C. macropomum* EXPUESTOS A CADMIO DURANTE 21 DÍAS Y DEPURADOS POR 15 DÍAS * (P<0,001); NS: NO SIGNIFICATIVO/ DISTRIBUTION OF TOTAL THIOLS (A) ACID SOLUBLE THIOLS (B) IN TISSUES OF FRESH-WATER FISH *C. macropomum* CD-EXPOSED DURING 21 DAYS AND CD-DEPURATED FOR 15 DAYS.**

centración subletal de cloruro de cadmio durante 30 días, se observó una elevación de la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión, así como de otras enzimas antioxidantes en el hígado y el riñón; los autores sugieren que estos antioxidantes son la primera línea de defensa hacia el cadmio en el pez antes de que se produzca la inducción de la síntesis de metalotioninas [3].

Las metalotioninas son las proteínas de baja masa molecular, ricas en cisteína y responsables del transporte de metales ya sean esenciales o no. Un aumento en la concentración de metalotioninas, es debido a un incremento en los niveles de contaminantes, como se ha demostrado en condiciones de laboratorio [21] y en ambientes naturales [16]. Se ha reportado que el cadmio induce la expresión de estas proteínas; también otros metales tales como el zinc y el mercurio aumentan su expresión [7, 19, 31]. Estas moléculas pueden ser separadas de las de alta masa molecular y cuantificadas como tioles solubles en ácido junto a otras como el glutatión y la cisteína por lo

que la determinación de tioles solubles en ácido en el plasma o músculo de *C. macropomum* es un parámetro sensible a la toxicidad por cadmio; de fácil medición y seguimiento.

CONCLUSIONES

Los TT y TSA varían dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas del pez *C. macropomum*.

El cadmio induce el aumento, en plasma de TT y TSA en *C. macropomum*.

El proceso de desintoxicación disminuye la concentración de TSA, lo que determina que la síntesis de estas moléculas sea modulada por la exposición al cadmio.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto FONACIT-UDO G2005000775.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ-LEGORRETA, T.; MENDOZA-COZATL, D.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; GOLD-BOUCHOT, G. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex König) in response to cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 86(1):12-9. 2008.
- [2] AZÓCAR, B. Actividad antimicrobiana de la grasa de cachama *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) sobre cepas patógenas. Universidad de Oriente. Cumaná. Trabajo de Pregrado. 86 pp. 1996.
- [3] BASHA, PS.; RANI, AU. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56(2):218-21. 2003.
- [4] BERMÚDEZ, D.; MADRID, F. Observaciones sobre el control de enfermedades en actividades piscícolas en Venezuela. *Memoria Simp. Latin Acu.* 4:18-27. 1982.
- [5] BLANCO, Y.; SALAZAR, R.; LEMUS, M.; GARCÍA, N.; HERNÁNDEZ, M.; CENTENO, L.; MATUTE, C.; PÉREZ, J. Parámetros hematológicos e inmunológicos del pez *Colossoma macropomum* expuesto a cadmio. *Act. Cient. Ven.* 55:(Supl. 1):80. 2004.
- [6] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Agua potable envasada. Requisito N° 1431 Norma. Caracas Venezuela. 1982.
- [7] CHOI, CY.; AN, KW.; NELSON, ER.; HABIBI, HR. Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Caras-*

- sius auratus*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 145(4):595-600. 2007.
- [8] DANIELSSON, B.; DENGIER, L. Effects of cadmium on the placental uptake and transport to the fetus of nutrients. **Biol. Res. Pregnan.** 5:93-98. 1984.
- [9] DANIELSSON, BR.; DENCKER, L.; LINDGREN, A.; TJÄLVE, H. Accumulation of toxic metals in male reproduction organs. **Arch. Toxicol.** 7:177-80. 1984.
- [10] DEMUYNCK, S.; GRUMIAUX, F.; MOTTIER, V.; SCHIKORSKI, D.; LEMIÈRE, S.; LEPRÊTRE, A. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. **Comp Biochem Physiol C. Toxicol Pharmacol.** 144(1):34-46. 2006.
- [11] GARCÍA, E.; SALAZAR, R. A peptide is a major binding of cadmium in *Acetabularia. Calyculus*. **Environ. Cont. Bull.** 7:98-105. 2003.
- [12] CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION. Guidance document for cadmium in shellfish. United States Food and Drug Administration 200C St., SW. Washington DC. 20204. January. 1993.
- [13] GUIMARÃES-SOARES, L.; FELÍCIA, H.; JOÃO B. M.; CÁSSIO, F. Metal-binding proteins and peptides in the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta* exposed to severe metal stress. **Sci. Total Environ.** 15 (1):148-56. 2006.
- [14] GUIMARÃES-SOARES, L.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Effects of heavy metals on the production of thiol compounds by the aquatic fungi *Fontanospora fusiramosa* and *Flagellospora curta*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 66(1):36-43. 2007.
- [15] HANSEN, BH.; RØMMA, S.; GARMO, ØA.; OLSVIK, PA.; ANDERSEN, RA. Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. **Comp. Biochem Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 143(3):263-74. 2006.
- [16] HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; GARBISU, C.; BECERRIL, JM.; BARRUTIA, O.; GARCÍA-PLAZAOLA, JI.; ZHAO, FJ.; MCGRATH, SP. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. **Plant. Cell. Environ.** 29(7):1422-9. 2006.
- [17] JAMES, SJ.; CUTLER, P.; MELNYK, S.; JERNIGAN, S.; JANAK, L.; GAYLORD, DW.; NEUBRANDER, JA. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. **Am. J. Clin. Nutr.** 80:1611-1617. 2004.
- [18] JURCZUK, M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; BRZÓSKA, MM. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. **Toxicol.** 219(1-3):11-21. 2006.
- [19] LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 131(3):231-43. 2002.
- [20] LERNAIRE, S.; KEYER, M.; STEIN, I.; SCHEPENS, E.; ISSAKIDIS-BOURGUET, C.; GERAD-HIRNE.; M. MIGINIAE, M.; JACQOUT, J. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant. Physiol.** 120:773-778. 1999.
- [21] LEMUS, M. Inducción de proteínas en *Emerita portoricensis* por contaminación mercurial. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Tesis de Doctorado. 98 pp. 2003.
- [22] NORDBERG, G.; KJELLSTRÖM, T.; NORDBERG, M. Cadmium and health. In: Exposure, Dose and Metabolism. FRIBERG, L; ELINDER, C; KJELLSTRÖM, T. and NORDBERG, G.F. (Eds). Volumen 1. CRC Press, Boca Raton, Florida. 103-178 pp. 1985.
- [23] PANDEY, S.; ASTHANA, R.; KAVASTHA, A.; SINGH, N. SINGH, S. Metal Uptake and thiol production in *Spirodela polirrizza* (L). **J. Plant. Physiol.** 154:634-640. 1999.
- [24] PAWLIK-SKOWRNSKA, B. Relationships between acid-soluble thiol peptides and accumulated Pb in the green alga *Stichococcus bacillaris*. **Aquat. Toxicol.** 50(3):221-230. 2000.
- [25] REYES, R. Las metalotioninas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. **Intercien.** 24:366-371. 1999.
- [26] RIJSTENBIL, J.; HARITONIDIS, S.; MALEA, P.; SEFERLIS, M.; WIJNHOLDS, J. Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. From the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece, N Aegean Sea). **Hidrobiol.** 385:171-181. 1998.
- [27] RODRÍGUEZ, L. Comportamiento y fraccionamiento de metales pesados en núcleos de sedimentos de la laguna de Unare, Edo. Anzoátegui, Venezuela. Instituto Oceanográfico de Venezuela - Universidad de Oriente. Cumaná. Trabajo de Postgrado. 77 pp. 2004.
- [28] SALAZAR, R.; REYES, R. Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. Universidad, **Cien. y Tecnol.** 4:17-22. 2000.
- [29] SEDLAK, J.; LINDSAY, R. Estimation of total protein bound non-protein sulfidryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** 25:192-205. 1968.
- [30] SOKAL, R.; ROHLF, F. Analysis of Variance I: The One Way Classification. En: **Biometry**. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 832pp. 1980.

- [31] THOMAS, P.; WOFFORD, HW. Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.). **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 76(1):172-82. 1984.
- [32] VAN CAMPENHOUT, K; BERVOETS, L; BLUST, R. *Methallothionein-like protein levels in natural populations of gudgeon (Gobio gobio): relationship with metal levels in tissues and environment.* En: **Environmental toxicology and chemistry**, 1548-1555 pp. 2003.
- [33] VANEGAS, V. Determinación de los metales pesados: plomo, vanadio, zinc y cadmio en algunas especies de peces presentes en el río Guasare, Estado Zulia. La Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias, Trabajo Especial de Pregrado. Maracaibo. 195 pp. 2003.
- [34] VAQUERO, J.; QUILARTE, L.; LÓPEZ, J.; WILLIAMS, V.; ROJAS, L.; BONILLA, J.; RAMÍREZ, A. Evaluación de la concentración por metales de la cuenca del río Tigre. **Act. Cient. Venez.** 55(suppl. 1):81. 2004.
- [35] ZALUPS, R.; AHMAD, S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 186:163-88. 2003.
- [36] WANG, YF.; FANG, I.; LEONARD, SS.; RAO, KMK. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. **Free Radic. Biol. Med.** 36:1434-1443. 2004.