



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Impacto de la exposición al plomo sobre la bioacumulación, el estrés oxidativo y la inmunotoxicología en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

AUTOR/A

D. HENRY JAVIER PEREZ MESA

DIRECTOR

Dr. FRANCISCO ANTONIO GUARDIOLA ABELLAN

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Impacto de la exposición al plomo sobre la bioacumulación, el estrés oxidativo y la inmunotoxicología en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

AUTOR/A D. HENRY JAVIER PEREZ MESA

DIRECTOR Dr. FRANCISCO ANTONIO GUARDIOLA ABELLAN

2025



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL TÍTULO DE DOCTOR/A**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Henry Javier Pérez Mesa, habiendo cursado el Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Impacto de la exposición al plomo sobre la bioacumulación, el estrés oxidativo y la inmunotoxicología en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

y dirigida por:

D.: Dr. FRANCISCO GUARDIOLA ABELLAN

D.:

D.:

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 12 de mayo de 2025

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor (PhD) en el Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología por la Universidad de Murcia (España).

"Concéntrate en mejorarte, No en pensar que eres el mejor" – Aaron Korsh

AGRADECIMIENTOS

A mi director y tutor de esta Tesis, **D. Francisco Guardiola**, excelente profesional, pero sobretodo gran ser humano por haberme acogido bajo su línea de investigación, y haberme guiado en este arduo camino siempre tus explicaciones acertadas y con una gran enseñanza. Siempre agradecido Fran !!! Por tu alto don de gentes.

A **Ricardo Gálvez**, un caballero!!!! Por tu disposición, tu paciencia y colaboración.

A mi bella esposa **Mari**, amor gracias por todo lo que Ud. significa no solo en la presente tesis sino en mi vida, por su apoyo incondicional que siempre lo sentí en el corazón, por estar ahí constante con mis hijos **Pedro, Sofía y Dieguito**, acompañándome en este camino de varios años de estudio llenando el mismo con comprensión para hacerlo más liviano. Hoy recojo los frutos del esfuerzo, disciplina, dedicación y le agradezco mi compañera de vida por estar presente siempre es mejor junto a Usted. Este trabajo también es de ustedes mis amores, les amo con toda mi alma y corazón.

¡Al Andy!!!! **Andrés Ordoñez Ugalde**, dentro del laboratorio y fuera de él me llevo un gran amigo gracias por el apoyo y por un mundo sin celos profesionales en donde mejor podemos sumar y no restar.

Al Dr. **Juan Diego Gallegos Merchán**, por sus consejos y apoyo constante en la rama.

A mis hermanos **Boris, Lula, Juan José y Paúl**, gracias por ser parte de mi evolución.

Por último, pero no menos importante a mis dos ángeles que me acompañan siempre mi padre **Manuel María Pérez Montalván †** y mi madre **Ana Piedad Mesa Ordoñez †**.

ÍNDICE

Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce.	10
1.1. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce (vías de captación en el agua).....	12
1.2. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce (vías de absorción dieta).	18
2. Estrés oxidativo en especies de peces de agua dulce inducido por la exposición al plomo.	20
3. Inmunotoxicidad en especies de peces de agua dulce inducida por la exposición al plomo.	29
4. Estudios de casos de sensibilidad a la exposición al plomo en peces de agua dulce en distintas etapas de la vida.	36
4.1. Etapa embrionaria.	36
4.2. Etapa juvenil.	37
4.3. Etapa adulta.	37
4.4. Etapa reproductiva.	37
2. OBJETIVOS.....	40
3. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES.....	44
CAPÍTULO 1:	47
Evaluación de parámetros hematológicos, metabolitos bioquímicos y expresión de genes en trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) alimentadas con una dieta con plomo.	47
1. Resumen.	49
2. Resumen gráfico.	51
3. Introducción.....	53
4. Materiales y Métodos.....	55
4.1. Cuidado y mantenimiento de los peces.....	55
4.2. Preparación del pienso y exposición al plomo.	55
4.3. Toma de muestras.	56
4.4. Determinación de índices organosomáticos.	56

4.5. Ensayo hematológico.....	56
4.6. Ensayo bioquímico.	57
4.7. Lisis tisular y aislamiento de ARN.....	58
4.8. Retrotranscripción de ARN total a ADNc.	58
4.9. Diseño y eficiencia de los cebadores.....	59
4.10. Análisis cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).	59
4.11. Análisis estadístico.....	60
5. Resultados.....	61
5.1. Índices organosomáticos.	61
5.2. Parámetros sanguíneos.	61
5.2.1. Ensayo hematológico.....	61
5.2.2 Ensayo bioquímico.	63
5.3. Expresión genética.....	65
5.4. Correlación genética.....	70
CAPÍTULO 2: Efecto a nivel molecular de una dieta con plomo sobre tejidos linfoides asociados a mucosas en trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	74
1. Resumen gráfico.	77
2. Introducción.....	78
3. Materiales y Métodos.....	80
3.1. Cuidado y mantenimiento de los peces.....	80
3.2. Preparación del pienso y exposición al plomo.	81
3.3. Toma de muestras.	81
3.4. Lisis tisular y aislamiento de ARN.....	81
3.5. Retrotranscripción del ARN total a ADNc.	82
3.6. Diseño y Eficiencia de Primers.....	82
3.7. Análisis cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).	83
3.8. Análisis estadístico.....	83
4. Resultados.....	84
4.1. Expresión de genes.	84
4.1.1. Expresión de genes evaluados en intestino.	84

4.1.2. Expresión de genes evaluados en la piel.	86
4.1.3. Expresión de genes evaluados en las branquias.	88
4.2. Correlación genética.....	89
4.2.1 Correlación de la expresión de genes evaluados en el intestino.	89
4.2.2. Correlación de la expresión de genes evaluados en la piel.	91
4.2.3. Correlación de la expresión de genes evaluados en las branquias.	92
4. DISCUSIÓN.	94
4.1. Hematología.	96
4.2. Bioquímica.	97
4.3. Expresión de genes.	98
4.4. Citoquinas.	99
4.5. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).	100
4.6. Intestino.....	100
4.7. Piel.	101
4.8. Branquias.	103
5. CONCLUSIONES.....	106
6. REFERENCIAS.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT:	Transportador de ATPasa activa.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN Complementario
ANOVA:	Análisis de varianza
β -actin:	Beta - actina
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ARNasa:	Ribonucleasa
ALAD:	Ácido δ -aminolevulínico deshidratasa
BILD:	Bilirrubina directa
BILT:	Bilirrubina total
CAT:	Catalasa
CLC:	Receptores de lectina tipo C
COL:	Colesterol
CD4:	Linfocitos T CD4
cyp1a:	Citocromo P450 1A
cyp2k1:	Citocromo P450 2K1
cyp2m1:	Citocromo P450 2M1
cyp3a27:	Citocromo P450 3A27
ctsD:	Catepsina D
dNTPs:	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT:	Ditiotreitol
DMT1:	Transportador de metal divalente 1
ef1- α :	Factor de elongación 1 - alfa
ER:	Retículo endoplasmático
F:	Cebador directo
GSH:	Glutación
GST:	Glutación S - transferasa
GB:	Glóbulos blancos
GR:	Glóbulos rojos
GLU:	Glucosa
GPx:	Glutación peroxidasa
GPCR:	Receptor acoplado a proteína G

GSSG:	Glutación oxidado
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogeno
Hb:	Hemoglobina
Hct:	Hematocrito
Hsp60:	Proteína de choque térmico 60
Hsp70:	Proteína d choque térmico 70
il – 21:	Interleucina 21
inf 1:	Interferón 1
iga:	Inmunoglobulina A
igm:	Inmunoglobulina M
igt:	Inmunoglobulina T
IL-1:	Interleucina - 1
IL-6:	Interleucina - 6
IL-8:	Interleucina – 8
Jak:	Janus quinasa
LPO:	Peroxidación lipídica
LPS:	Lipopolisacarido
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NLR:	Receptor tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NF – kB:	Potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas
NOD:	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NLR:	Receptor tipo NOD
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos
MALT:	Tejido linfoide asociado a mucosas
MyD88:	Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88
MCV:	Volumen celular medio
MCH:	Hemoglobina celular media
MCHC:	Concentración media de hemoglobina corpuscular
MP:	Metales pesados
MR:	Receptor de unión a metales
MDA:	Malondialdehido
MT:	Metalotioneína
mt-a:	Metalotioneína A

mt-b:	Metalotioneína B
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PC:	Canal Pasivo
Pb:	Plomo
POD:	Peroxidasa
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones
PI3K:	Fosfoinosítido 3 - quinasa
R:	Cebador inverso
RLR:	Receptores tipo RIG - I
RC:	Riñón cefálico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa
RIG-I:	Gen inducible por ácido retinoico I
SOD:	Superóxido dismutasa
SEM:	Error estándar de la media
STAT:	Traductor de señales y activador de la transcripción
TIR-1:	Receptor Toll/Interleucina-1
tlr3:	Receptor tipo toll 3
tlr9:	Receptor tipo toll 3
TGO:	Aspartato aminotransferasa
TGP:	Alanina aminotransferasa
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
Vit C:	Vitamina C
Vit E:	Vitamina E
3 β -HSD:	3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa

RESUMEN

El Plomo (Pb) es un metal con gran toxicidad, que representa una amenaza crítica para sistemas acuáticos pudiendo bioacumularse, causar estrés oxidativo y provocar alteraciones biológicas en peces teleósteos. Es de vital importancia conocer sus efectos negativos y el impacto que puede producir para la salud tanto de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), como la de los seres humanos. Por otro lado, la trucha arcoíris, es una de las especies más pescadas con fines comerciales, que se encuentra en la mayoría de los lagos de países como Ecuador, Perú, Argentina y Colombia. Sin embargo, es considerada en España como una especie invasora por la amenaza que representa al alterar la pureza genética de especies silvestres autóctonas de este país.

En el **Capítulo 1** de este estudio se expuso a la trucha arcoíris frente al Pb mediante la dieta, para los experimentos se utilizaron 72 ejemplares de trucha arcoíris con un peso promedio de 160 g, los peces fueron mantenidos en tanques de 750 L, con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a temperatura de 4°C. La exposición al Pb se llevó a cabo durante 21 días, el animal fue alimentado a diferentes concentraciones en tres grupos experimentales como sigue: grupo control: (no expuesto, 0 mg Pb kg dieta⁻¹), grupo Pb-120: (120 mg Pb kg dieta⁻¹) y grupo Pb-240: (240 mg Pb kg dieta⁻¹). Las muestras de los tejidos fueron tomadas a los 15 y 21 días del experimento. Posteriormente se examinó los efectos del Pb provocado en trucha arcoíris, analizando índices organosomáticos en hígado y bazo. Además, se analizó el impacto del Pb a nivel sanguíneo donde se valoró parámetros hematológicos y metabolitos bioquímicos. También se analizó expresión de genes claves de desintoxicación e inflamación en hígado, bazo, y riñón cefálico.

Para los índices organosomáticos de trucha arcoíris se pesaron el cuerpo, el hígado y el bazo de cada espécimen. Los glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito y glóbulos blancos fueron medidos por técnica automática (analizador hematológico) y confirmados por técnica manual. Los ensayos bioquímicos la glucosa, colesterol, bilirrubina total, bilirrubina directa, transaminasas como la aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa se determinaron por técnicas enzimáticas y colorimétricas. Por otro lado, la expresión de genes en hígado (*mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27*), en bazo y riñón cefálico (*il-21*, *tnf-α*, *ifn-1* e *il-6*) se las realizó por RT-qPCR. Una disminución de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito fue observada en el transcurso del experimento. Simultáneamente, se produjo el incremento de glóbulos blancos y de biomarcadores químicos como la glucosa, colesterol, bilirrubinas y transaminasas. Sobreexpresión de genes

relacionados con la desintoxicación en el hígado (*mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2m1*, and *cyp3a27*) y sobreexpresión de genes de inflamación (*il-21*, *tnf- α* , *inf-1*, e *il-6*) en el bazo y el riñón cefálico fue observado. Los análisis de correlación genética mostraron correlaciones positivas entre la dieta con Pb y *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1* y *cyp2m1* en hígado. Mientras que, la dieta con Pb se correlaciono en el bazo con la expresión de los genes *il-21*, *tnf- α* , *inf-1* e *il-6* positivamente. En el riñón cefálico la expresión de los genes *il-21*, *tnf- α* e *inf-1* se correlacionó con el factor tiempo.

Los datos obtenidos revelan una intrincada interacción que podría sugerir una respuesta inmunitaria orquestada a la toxicidad del plomo. Esto podría indicar que el impacto del Pb en las correlaciones genéticas es complejo y no se puede comprender por completo examinando genes individuales. Se destaca que el factor tiempo se correlacionó positivamente con varios genes, así se sugiere que a corto y a largo plazo contribuyen a los cambios en la expresión genética.

El **Capítulo 2** de esta tesis se centra en evaluar la respuesta inmunitaria innata mediada por tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, en inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*) en trucha arcoíris tratadas con una dieta con diferentes concentraciones de Pb, se evaluaron cambios en la expresión de varios genes (*igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9*) relacionados con las vías de defensa de este animal en órganos importantes como el intestino, la piel y las branquias. Las dietas utilizadas y suplementadas con plomo fueron: dieta 0 (no expuesta, grupo control), dieta 120 (120 mg kg dieta⁻¹) y dieta 240 (240 mg kg dieta⁻¹) durante 15 y 21 días.

Cambios en la expresión génica fueron encontrados en algunos en los genes testeados que interactúan en vías metabólicas de inmunidad y que destacan una interacción compleja con la dieta con Pb. En intestino se observó una sobreexpresión de *igm*, *igt*, y *ctsD*. Por el contrario, en la piel se mostró disminución de la expresión de *igt*, mientras que, en branquias la expresión de *igt* con la expresión de *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* se correlacionaron positivamente. Estos hallazgos destacan la importancia de comprender tanto los mecanismos moleculares de toxicidad del Pb así, como las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas influenciadas por los efectos del este metal. En general, nuestros hallazgos revelaron que el MALT de la trucha arcoíris muestra una función protectora e interacción compleja contra este tipo de metal. La dieta proporciona información inmunológica temprana sobre el comportamiento activo de los genes probados en este estudio contra el estrés celular. Además, podría ser útil comprender el

comportamiento del MALT como parte de la defensa del sistema inmunológico innato contra los metales pesados.

1. INTRODUCCIÓN

Ante los crecientes desafíos ambientales, la infiltración de metales pesados (MP) en los ecosistemas marinos ha generado una preocupación de aspecto crítico y el Pb desempeña un papel central debido a su amplia distribución e impacto multifacético en la salud ecológica y salud humana. Existen fuentes de contaminación por Pb las cuáles son diversas, incluidas las actividades mineras e industriales y la combustión de fósiles, todas ellas contribuyendo a su presencia generalizada en los entornos marinos [1,2]. En el contexto de los peces de agua dulce, la bioacumulación de metales también es específica de la especie y depende del estilo de vida y hábitos alimentarios de los peces; así los peces depredadores y carnívoros muestran mayor acumulación. En algunas especies, la bioacumulación puede ser específica del género y estar correlacionada con la edad y el tamaño (es decir, el peso o la longitud), aunque estas relaciones no siempre son obvias [3]. Aquí, las concentraciones de Pb que van de más altas a más bajas se encuentran en las branquias, los intestinos, el hígado, los riñones el bazo y los músculos [4]. Por otro lado, se ha encontrado una correlación positiva significativa entre las concentraciones de MP en peces bentónicos y sedimentos [5].

El consumo de pescado a nivel mundial crece rápidamente. Se sabe que el pescado es fuente rica de proteínas y ácidos grasos omega-3, minerales esenciales y vitaminas para los humanos [6]. La absorción de metales como el Pb en los peces se produce principalmente a través de las siguientes tres vías: las branquias, la piel y el tracto digestivo [7,8]. Por otra parte, la complejidad del impacto del Pb se ve agravada por su papel como metal no esencial, que compite con metales vitales y potencialmente obstaculiza procesos fisiológicos en la vida marina [9,10]. El Pb perjudica la función neurológica y alterar los sistemas reproductivos e induce una serie de efectos subletales en los organismos del ecosistema acuático, incluso en concentraciones bajas [11,12]. En este sentido, el Pb causa insuficiencia renal, daño hepático, coma, retraso mental e incluso la muerte [13]. Sin embargo, los efectos hematológicos suelen ser los principales mecanismos de acción en la exposición crónica [14].

Los estudios sobre los efectos tóxicos del Pb en poblaciones de peces, específicamente especies de agua dulce han demostrado una bioacumulación significativa, estrés oxidativo y respuestas inmunitarias comprometidas, que ilustra el amplio espectro del impacto ambiental que el Pb puede generar sobre la trucha arcoíris [15,16]. Un estudio en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) muestra un buen organismo tolerante con un sistema inmunológico fuerte y un bioindicador sensible basado en los estudios que sugieren que la toxicidad y los efectos fisiológicos de varios metales, incluido el Pb, no son tan fuertes en esta especie [17].

En general, se ha demostrado que el Pb no solo puede inducir efectos perturbadores en los componentes hematológicos, sino que también acumula grandes cantidades de plomo en los órganos internos de los peces expuestos a la dieta expuesta a ese metal [18]. Los efectos tóxicos del Pb pueden comenzar después de que los mecanismos excretores, metabólicos, de almacenamiento y de desintoxicación ya no puedan igualar la absorción [19]. Por otro lado, la intoxicación por este metal y el estrés oxidativo pueden ser causados por el desequilibrio de antioxidantes y prooxidantes. En los peces, la respuesta antioxidante intensificada persuadida debido a la exposición al plomo puede producir grandes cantidades de ROS (especies reactivas de oxígeno) [20].

Estudios recientes han demostrado que concentraciones de Pb en ciertas áreas marinas han aumentado hasta niveles nocivos para la salud marina y humana, lo que pone de relieve la urgencia de abordar esta contaminación para mitigar los efectos de este metal [21,22].

La contaminación por Pb es tan generalizada que a nivel mundial muchos cuerpos acuáticos están contaminados, y la concentración de Pb en las aguas superficiales varía de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ a $566,2 \text{ mg L}^{-1}$ [23], las implicaciones ecológicas del Pb se extienden en los procesos de bioacumulación dentro de las redes alimentarias marinas, lo que plantea riesgos directamente relacionados a la salud humana a través del consumo de mariscos contaminados [24,25].

Sin embargo, a pesar de las regulaciones destinadas a la reducción de las emisiones de Pb, su presencia constante y persistente en entornos marinos y la amenaza que representa para la biodiversidad requieren una exploración minuciosa y vigilancia científica continuas [26]. La investigación del Pb se ha ampliado para abarcar su toxicocinética, implicaciones ecológicas y estrategias de mitigación en los ecosistemas marinos [27,28]. En esta situación, los métodos biológicos como la biorremediación y autosustentación pueden ser una solución atractiva para rectificar la condición natural del medio ambiente frente a la contaminación por metales pesados [29].

Los efectos nocivos y acciones tóxicas de la exposición al Pb son variados y requieren un análisis exhaustivo para comprender su impacto negativo en la salud de los peces y de los consumidores. Este estudio explora y revisa los patrones de bioacumulación en procesos de estrés oxidativo y alteraciones inmunotoxicológicas que podría producir el Pb y las respuestas inmunitaria en peces de agua dulce.

1. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce.

El Pb es uno de los metales con alta toxicidad, persistencia y efectos bioacumulativos que pueden causar daños nocivos e irreparables en los organismos vivos [30]. La estimación de la bioacumulación de MP en los peces es importante para la evaluación de la contaminación del agua y el riesgo potencial del consumo de pescado contaminado para la salud [31]. La contaminación por Pb en los sistemas acuáticos se produce por actividades antropogénicas y fuentes naturales. Exposición al Pb afecta la reproducción, el crecimiento y el comportamiento a nivel fisiológico de los peces [32]. Asimismo, la bioacumulación es un aspecto característico de la toxicidad causada por la exposición al Pb.

Los efectos tóxicos por la exposición al Pb afectan funciones bioquímicas y fisiológicas en los peces [20], así el Pb depositado en ambientes acuáticos puede acumularse en la cadena alimentaria y tener efectos ecológicamente negativos, debido a la biomagnificación a lo largo del tiempo [33].

Por lo tanto, la bioacumulación de Pb en los peces puede ocurrir ya sea por consumo directo de agua y alimentos o partículas de sedimentos a través del tracto digestivo o a través de membranas biológicas [34]. Los peces de agua dulce pueden absorber Pb directamente del agua y a través de sus branquias, piel e intestino [35], el grado de absorción depende de la concentración de Pb en el agua y las características fisicoquímicas del agua, como el pH, la temperatura y la dureza [36]. El Pb puede ingresar a la cadena alimentaria acuática a través de varios medios que se muestran en la **Figura 1**. El plancton, los insectos y los peces de agua dulce más pequeños, pueden acumular Pb del medio ambiente; cuando los peces más grandes consumen estos organismos contaminados [37].

Los hábitos alimentarios en los peces juegan un papel muy importante, ya que pueden tener diferentes daños; por ejemplo, los peces de agua dulce bentónicos (que habitan en el fondo) pueden estar más expuestos a la acción del Pb a través de la ingestión de sedimentos [38,39]. Comprender estas preferencias dietéticas y de las interacciones tróficas de diferentes peces de agua dulce es crucial para evaluar su vulnerabilidad a la bioacumulación de este metal. El Pb tiende a acumularse en órganos diana que incluyen el intestino, el hígado, los riñones, las branquias, los músculos y los huesos [40]. La bioacumulación de metales pesados en los músculos de los peces de agua dulce es especialmente preocupante porque son fuentes ricas en proteínas y se consumen ampliamente como alimento humano [42].

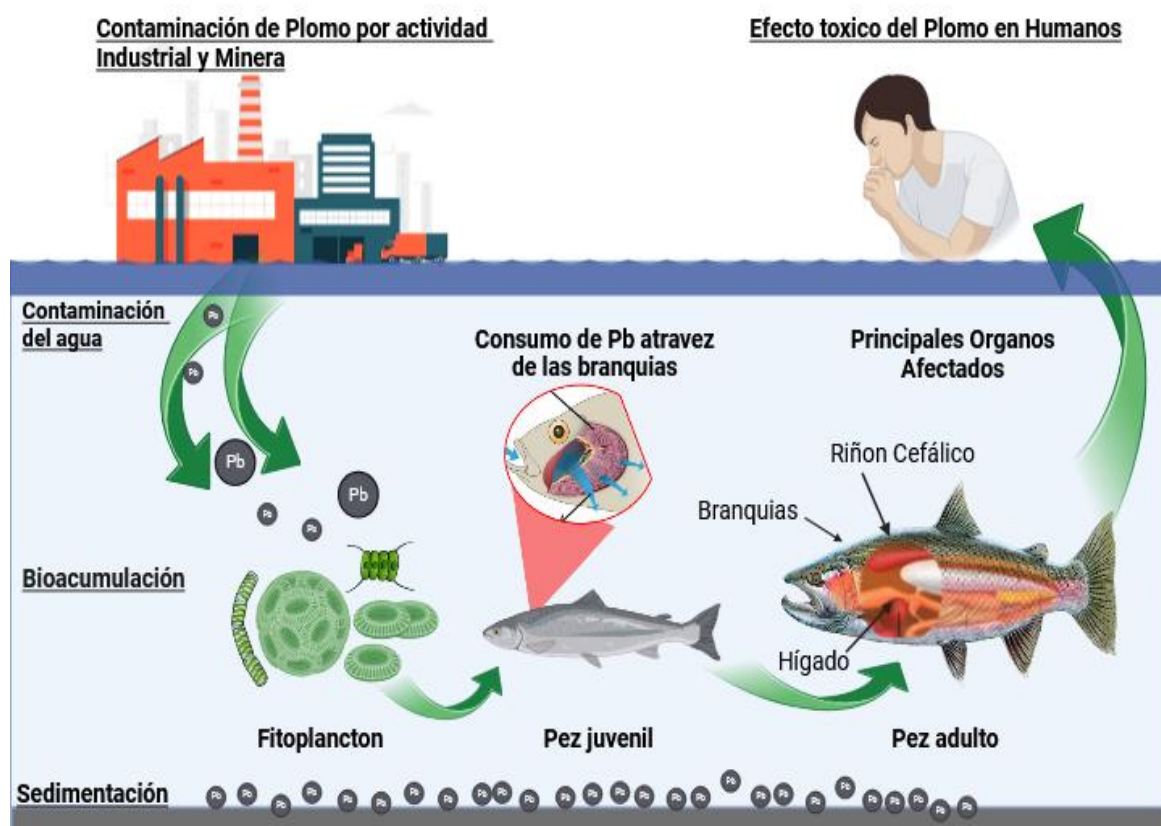


Figura 1. Ilustración que muestra cómo la contaminación se desplaza desde su origen hasta integrarse en la cadena alimentaria. El plomo (Pb) se filtra en estos sistemas, se disuelve en el agua y se acumula en diversos órganos de los peces de agua dulce, alterando varias funciones metabólicas, fisiológicas y afectando su salud. Estos contaminantes luego ingresan al cuerpo humano causando toxicidad. Fuente: figura creada por H.J.P.M con BioRender.com

La característica de los síntomas de la intoxicación por este metal incluye cambios en los parámetros sanguíneos con daño agudo a los glóbulos rojos y a glóbulos blancos que causan efectos nocivos en el sistema nervioso [43]. Entre varios tejidos, las branquias y el hígado de los peces son los tejidos que más acumulan este metal [44]. El hígado es a menudo un sitio primario de acumulación de Pb, ya que desempeña un papel central en todos los procesos de desintoxicación [45], la hepatotoxicidad inducida por el Pb da como resultado cambios estructurales de orgánulos como el retículo endoplásmico y las mitocondrias [46], las branquias son órganos respiratorios y de filtrado importantes, por lo que la exposición a largo y corto plazo causará una acumulación de Pb mayor que otros órganos [47].

El bazo también es un tejido crítico para la eliminación de xenobióticos de la sangre; por lo tanto, puede acumular una alta concentración de Pb [48]. Esta afinidad por acumular Pb en tejidos específicos se debe a factores como la fisiología, el metabolismo y las vías de

exposición [49]. Wagh et al. [50] informaron de rotura de la membrana basal, seguida de efectos en las células mucosas, hemorragia y roturas en las escamas branquiales, tras el tratamiento con Pb.

Los peces de agua dulce muestran diferentes susceptibilidades a la bioacumulación de Pb; factores como el tamaño, la edad y el estado reproductivo pueden influir [51]. Por ejemplo, los peces de agua dulce juveniles pueden ser más susceptibles a la toxicidad por Pb que los adultos debido a las diferencias en el metabolismo y la fisiología [52]. La toxicidad de la exposición al Pb provoca esta alteración del proceso de homeostasis en los animales acuáticos que conduce a una reasignación de los recursos energéticos del crecimiento a los procesos compensatorios, adaptativos y patológicos [32]. En resumen, una exposición al Pb superior a una concentración permisible da como resultado daños irreparables en todos los tejidos, del sistema nervioso central y la sangre [53].

1.1. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce (vías de captación en el agua).

Los patrones de bioacumulación de Pb en las diferentes especies y órganos analizados se presentan en la Tabla 1.

La bioacumulación es variable en las diferentes especies presentadas en esta revisión, siendo los órganos propensos a la acumulación de Pb, generalmente el hígado, las branquias, los intestinos y los músculos. Paul y Sengupta [54] reportaron una alta acumulación en el intestino ($0,33 \mu\text{g g}^{-1}$) de pez cabeza de serpiente (*Channa punctatus*) después de la exposición a Pb en el agua durante 4 días a $9.430 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb. Además, la exposición a Pb en concentraciones de 0, 50, 200 y $800 \mu\text{g L}^{-1}$ en cabeza de serpiente durante 14 y 28 días causó un orden de acumulación en los tejidos de mayor a menor de la siguiente manera: branquias, intestino, hígado y músculo. Sugiriendo que esta bioacumulación se origina en tejidos que se encuentran principalmente en contacto con el Pb proveniente del agua. [47]. Asimismo, Jia et al. [13] reportaron acumulación de Pb principalmente en las branquias, seguido del hígado y músculos en carpa prusiana, bagre amarillo y besugo esto muestra un patrón y señalamiento de bioacumulación en las tres especies. Eroglu et al. [19] en Turquía, expusieron a tilapia del Nilo a $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb durante 1, 7 y 14 días. El hígado fue el órgano clave y de depósito para la bioacumulación de Pb, probablemente por ser un órgano desintoxicante. Además, en Bagre (*Heteropneustes fossilis*) expuesta a plomo ($750 \mu\text{g L}^{-1}$) durante 28 días, se mostró

acumulación en el hígado, lo que provocó daño hepático severo de las funciones fisiológicas, afectando negativamente el crecimiento general del animal [55]. Por otra parte, en trucha arcoíris se probaron concentraciones de Pb entre 0 y 110 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante siete semanas en carcasa, branquias, hígado e intestino, acumulándose principalmente este metal en las branquias (40 - 50 $\mu\text{g g}^{-1}$) e hígado (10 $\mu\text{g g}^{-1}$) [14].

En carpa común (*Cyprinus carpio*), las concentraciones de Pb en los músculos (1.5841 $\mu\text{g g}^{-1}$) e intestino (1.0225 $\mu\text{g g}^{-1}$) excedieron los límites de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), lo que indica riesgos de intoxicación en caso de consumo humano [56]. Asimismo, Yin et al. [57] reportaron implicaciones para la salud debido a la acumulación de Pb y daño muscular en carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), expuesto a concentraciones de 12.9 a 522 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 30 días. Además, en anguila (*Mastacembelus armatus*), la bioacumulación de Pb en branquias, músculos e hígado fue de 63.800, 30.300 y 15.600 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, causando daño muscular severo [58]. En contraste, Sardinela del Sind (*Sardinella longiceps*) mostró una menor acumulación de Pb en el músculo (100 - 800 $\mu\text{g L}^{-1}$) versus una mayor acumulación en el hígado, lo que refleja el papel potencial del hígado (240 – 2.730 $\mu\text{g L}^{-1}$) en la desintoxicación de este metal [59]. En Bangladesh, experimentaron con tilapia del Nilo, así concentraciones de Pb de 1.000–10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante un período de tiempo de 30 días, la acumulación de Pb en el músculo varió de 4,54 a 6,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ [29]. Continuando con los datos obtenidos por Li et al. [60] especies como carpa cruciana (*Carassius auratus*), bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*), carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*), revelaron una significativa bioacumulación de Pb en las aletas y branquias. Por ejemplo, en el hígado, branquias y aletas del bagre amarillo se utilizaron concentraciones de Pb de 321, 425 y 665 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, mientras que en el músculo fue de 249 $\mu\text{g L}^{-1}$. Guo et al. [4] reportaron en bagre amarillo una mayor acumulación en el bazo que en el riñón después de la exposición al Pb durante 7, 14, 28 días (concentración de 0, 5, 50 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Además, Curcio et al. [61] reportaron bioacumulación de Pb en los tejidos espinales y de la cola de pez cebra (*Danio rerio*), donde concentraciones de Pb de 0,0025 a 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante 48 a 144 horas causaron deformidades y regulación positiva del estrés oxidativo. Finalmente, Carpa cabezona mostró acumulación de Pb en el intestino (55.100 $\mu\text{g g}^{-1}$) después de la exposición a concentraciones de Pb de 13.990 $\mu\text{g L}^{-1}$ y a las 6, 48 y 96 horas [62].

Tabla 1. Lista de estudios que informan sobre la bioacumulación de plomo (Pb) en especies de peces de agua dulce considerando el agua como vía de absorción.

Especie	Tamaño (cm) Peso (g)	Perfil de Acumulación	Concentración de Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tiempo de Exposición	Principales Consecuencias	Referencia	País
Snakehead punteado (<i>Channa punctatus</i>)	12,5 – 15,5 20,0 – 30,0	• Intestino	9.430	4 días	Especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, peroxidación lipídica, fueron incrementadas. Enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GST), disminuyeron. Aumento de actividad de SOD.	[54]	India
Sardinela del Sind (<i>Sardinella longiceps</i>)	13 - 22 40 - 92	• Hígado • Músculo	Musculo (100 – 800) Hígado (240 – 2.730)	No especificado	Niveles de Mn y Zn por encima de los límites permisibles; riesgo potencial para la salud en tejidos comestibles, requiere monitoreo continuo.	[59]	Pakistán
Carpa cruciana (<i>Carassius auratus</i>), Bagre amarillo (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>), Carpa cabezona (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	10,0 – 30,0 50 - 300	• Branquias • Hígado • Músculo • Aletas	(<i>C. auratus</i>) Músculo 196 Hígado 219 Branquias 163 Aletas 556 (<i>P. fulvidraco</i>) Músculo 249 Hígado 321 Branquias 425 Aletas 665 (<i>H. nobilis</i>) Músculo 147 Hígado 324 Branquias 435 Aletas 531	2, 4 semanas	Disfunción branquial, dificultad respiratoria.	[60]	China

Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	10,6 19,5	• Hígado	1.000	1, 7, 14 días	Incremento del estrés oxidativo, alteración del metabolismo del glutatión (relación GSH/GSSG disminuida). Reducción de la actividad de enzimas antioxidante fue comprometida.	[19]	Turquía
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	7,0 ± 0,5 2 - 4	• Intestino • Branquias • Hígado • Carcasa	0, 8, 20, 60, 110	7 semanas	En tejido sanguíneo se produjo la alteración de Na, reducción de lípidos y carbohidratos.	[14]	Canadá
Carpa prusiana (<i>Carassius auratus</i>), Bagre amarillo (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>), Brema de agua dulce Besugo (<i>Squaliobarbus Curriculum</i>)	<i>Auratus</i> 25,7 ± 2,4 295 <i>Fulvidraco</i> 18,4 ± 3 - <i>Curriculum</i> 23,6 ± 3,5 -	• Branquias • Hígado • Músculo	(<i>C. auratus</i>) 4 (<i>P. fulvidraco</i>) 14 (<i>S. Curriculum</i>) 8	No especificado	Nivel de bioacumulación alto en Hígado, Branquias y musculo Daño en las branquias y riesgos generalizado para el animal.	[13]	China

Anguila (<i>Mastacembelus armatus</i>)	27,14 – 32,3 65,11 – 70,1	• Branquias • Hígado • Músculo	Branquias 63.800, Músculo 30.300, Hígado 15.600	No especificado	Elevado nivel de Pb en muestras expuestas, branquias y músculos. Con mayor bioacumulación de Pb y riesgos de degeneración muscular para consumidores humanos.	[58]	India
Pez cabeza de serpiente del Norte (<i>Channa argus</i>)	10,0 ± 1,10 14,58	• Intestino • Branquias • Hígado • Músculo	50, 200, 800	14 y 28 días	Incremento del estrés oxidativo, inmunosupresión. Además, se dio la baja actividad de CAT y GPx.	[47]	China
Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	40,0 – 8,0 -	• Músculo	12, 191, 522	30 días	Riesgos inminentes y deterioros para la salud humana asociado a su consumo.	[57]	China
Carpa cabezona (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	11,5 ± 0,3 -	• Intestino	13.990	6, 48, 96 horas	Daño y degradación a la barrera intestinal, desequilibrios en la microbiota. Fallo en el crecimiento por el incremento de apoptosis celular.	[62]	China
Bagre amarillo (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	16,21 ± 2,4 56,38	• Riñón • Bazo	0.005, 0.05 y 0.5	7, 14, 28 días	Estrés, oxidación. Daño de tejidos.	[4]	China
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	2,0 – 6,0 mm -	• Espinal • Cola	0.0025 - 0.005	48, 96, 144 horas	Incremento de deformidades en regiones espinales y de la cola.	[61]	Italia
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	26 - 34.5 -	• Intestino • Branquias	1.250	30 días	Niveles de Pb, por encima de los límites FAO.	[56]	Pakistán

		• Músculo					
Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	2,5 – 7,6 -	• Branquias • Hígado • Músculo	1.000 – 10.000	30 días	Variabilidad en bioacumulación y en la toxicidad dependiendo de factores medioambientales y de la especie.	[29]	Bangladesh
Bagre punzante (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	15,0 ± 8,0 -	• Hígado • Músculo	750	28 días	Daño hepático, reducción de la función fisiológica e impacto en el crecimiento.	[55]	Bangladesh

Los estudios que se enumeran en esta tabla se centran en la bioacumulación de plomo (Pb) (vías de absorción en el agua) en diversas especies de peces de agua dulce en diversos entornos del mundo. Estos hallazgos contribuyen a nuestro conocimiento de la distribución y las concentraciones de Pb en los ecosistemas de especies de agua dulce y su posible impacto en la población de peces.

1.2. Bioacumulación de plomo en especies de peces de agua dulce (vías de absorción dieta).

La bioacumulación de Pb en peces de agua dulce varía en diferentes tejidos y especies, además, factores como el tiempo de exposición al metal y las concentraciones ambientales influyen directamente, diversos perfiles se detallan en la Tabla 2.

La carpa común muestra una alta acumulación ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Pb en el riñón 870 – 1.670, intestino 1.290 – 2.180, branquias 120 – 1.410, hígado 420 - 960, ovario 100 - 730, bazo 120 - 750, músculo 70 - 370 y corazón 30 – 1.590 con concentraciones de Pb que van desde 1,0 a 1,6 mg kg^{-1} en un periodo de tres años [63]. Además, la acumulación de Pb en el bagre plateado y la tilapia del Nilo se produjo principalmente en las branquias y el hígado, con concentraciones de plomo (0,13 a 0,20 mg kg^{-1}) y (0,01 a 0,27 mg kg^{-1}), respectivamente [64]. La acumulación de Pb en los órganos de la carpa prusiana se produjo en el siguiente orden de mayor a menor riñón, hígado, bazo, intestino, branquias y músculos después de la exposición a concentraciones de Pb de 120 - 240 mg kg^{-1} durante 15-30 días [65]. De manera similar, Liu et al. [7] informaron que la carpa herbívora acumuló Pb en el hígado y los músculos para este propósito, utilizando una concentración de Pb de 3,5 mg kg^{-1} durante 48 horas. Los niveles elevados de Pb en los tejidos comestibles de estas especies subrayan los riesgos para la salud pública asociados con su consumo, especialmente en comunidades que dependen en gran medida del pescado como fuente de proteínas.

Tabla 2. Lista de estudios que informan sobre la bioacumulación de plomo (Pb) en especies de peces de agua dulce considerando la dieta como vía de absorción.

Especie	Tamaño (cm) Peso (g)	Perfil de Acumulación	Concentración de Pb (mg kg ⁻¹)	Tiempo de Exposición	Principales Consecuencias	Referenci a	País
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	40,0 ± 8,0 -	• Riñón • Intestino • Branquias • Hígado • Ovario • Bazo • Músculo • Corazón	1,0 a 1,6	3 años	Riesgo para la salud humana.	[63]	Polonia
Carpa prusiana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	10,0 ± 5,0 62,51	• Riñón • Intestino • Branquias • Hígado • Bazo • Músculo	120 - 240	15-30 días	Aumento de niveles enzimáticos.	[65]	China
Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	9,43 12,11	• Músculo • Hígado	3,5	48 horas	Reducción de Pb en músculo. Mejora del índice de crecimiento.	[7]	China
Bagre plateado (<i>Chrysichthys nigrodigitatus</i>) y Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Bagre: 20,02 – 22,68 108,08 – 207,76 Tilapia: 12,52 – 13,09 78,59 – 78,87	• Branquias • Hígado	Bagre: 0,13 – 0,20 Tilapia: 0,01 – 0,27	No especificado	Aumento del Pb en órganos de mayor importancia en el animal.	[64]	Nigeria

Los estudios que se enumeran en esta tabla se centran en la bioacumulación de plomo (Pb) (vías de absorción en la dieta) en diversas especies de peces de agua dulce en diversos entornos de todo el mundo. Estos hallazgos contribuyen a nuestro conocimiento de la distribución y las concentraciones de Pb en los ecosistemas de especies de agua dulce y su posible impacto en la población de peces.

2. Estrés oxidativo en especies de peces de agua dulce inducido por la exposición al plomo.

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y de los sistemas de defensa antioxidante en los organismos [66]. La liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un factor de la inmunidad innata y la eliminación de patógenos, a través de la fagocitosis como parte de la función celular normal [67]. Sin embargo, se sabe que los metales no esenciales como el Pb generan ROS excesivos, como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$), que promueven el estrés oxidativo [48]. La sobreproducción de ROS inducida por estrés puede dañar indirectamente biomacromoléculas importantes dentro del huésped, incluido el ADN, las proteínas (oxidación) y los lípidos (peroxidación), e iniciar una cascada de eventos que resultan en una función celular deteriorada [4]. Además, la generación excesiva de ROS puede inducir una serie de resultados fisiopatológicos, incluyendo genotoxicidad, apoptosis, necrosis, inflamación, fibrosis, hipertrofia y carcinogénesis [69]. No todos los metales son cancerígenos, pero el Pb es considerado cancerígeno por su alto potencial tóxico [70].

La producción de ROS dentro de las células de los peces de agua dulce se produce a través de varios mecanismos. Además, la alteración de la función mitocondrial provoca una fuga de electrones y la formación de radicales superóxido [71]. El Pb también puede participar en reacciones catalizadas, generando ROS como producto [72], por activación de enzimas como la NADPH oxidasa, que produce radicales superóxido como parte de la respuesta inmunitaria [52].

El sistema enzimático y los antioxidantes de bajo peso molecular son los principales mecanismos de defensa antioxidante en peces como los mamíferos [73]. Estos mecanismos de defensa juntos mantienen la homeostasis de óxido reducción (redox) celular, equilibrando la producción de ROS con su neutralización [74].

Dar et al. [75] informaron sobre las formas oxidadas a reducidas de antioxidantes, como la relación (GSH/GSSG), es indicativa del estado de óxido reducción celular. Una de las principales consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica (LPO), la degradación oxidativa de los lípidos, por lo tanto, las ROS pueden iniciar la LPO, lo que lleva a la formación de hidroperóxidos lipídicos y otros subproductos tóxicos [76]. Las respuestas

antioxidantes parecen ser un buen indicador de la toxicidad del Pb, siendo las branquias y el hígado de los peces cruciales para la actividad antioxidante [77,78].

Exposición crónica al Pb aumenta los niveles de ROS puede provocar daño oxidativo en las células del hígado, lo que afecta las funciones relacionadas con la desintoxicación y el metabolismo de los nutrientes [79]. Las branquias pueden experimentar daño oxidativo, lo que afecta su capacidad para mantener funciones fisiológicas adecuadas [20]. El Pb puede inducir estrés oxidativo y suprimir el sistema inmunológico en peces de agua dulce. Además, puede conducir a mayor susceptibilidad a infecciones y enfermedades [78]. La exposición al Pb también compromete la producción y actividad de células inmunitarias, como linfocitos y fagocitos, pudiendo verse comprometida [80] y afectar negativamente la salud reproductiva de los peces de agua dulce a través de cambios en el desarrollo de gametos, desequilibrios hormonales y anomalías en los tejidos reproductivos [81]. Por último, se sabe que el daño oxidativo puede comprometer la integridad y función celular, contribuyendo a alteraciones fisiológicas generales [82]. En este sentido, los efectos acumulativos de LPO, oxidación de proteínas y daño al ADN pueden manifestarse en varios problemas de salud para las especies de peces de agua dulce.

Los antioxidantes enzimáticos clave incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). SOD y CAT juegan un papel importante en la eliminación de radicales libres [83]. Por lo tanto, la SOD es una enzima antioxidante decisiva en las células aeróbicas, que es responsable de la eliminación de radicales superóxido. La SOD cataliza la dismutación de dos moléculas: peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (O_2) [84,85]. La CAT descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, reduciendo los niveles de esta molécula potencialmente dañina [86]. La GPx es una enzima que trabaja con el glutatión (GSH) para desintoxicar el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos convirtiendo el peróxido de hidrógeno en agua [84,87]. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos, se encuentran el GSH y las vitaminas C y E. El GSH juega un papel central en la eliminación de radicales libres y en la participación en reacciones redox [88]. Se conoce que vitaminas actúan como antioxidantes, neutralizando los radicales libres y protegiendo las membranas de las células del daño oxidativo [89]. Además, el GSH reducido es un cofactor de enzimas como la GPx y el glutatión transferasa (GST) en desintoxicación de peróxidos lipídicos, protegiendo así a las células contra reacciones químicas citotóxicas y cancerígenas durante el estrés oxidativo inducido por radicales libres [90]. El disulfuro de glutatión

(GSSG) generado a partir del proceso de la oxidación de GSH es reducido por la glutatión reductasa utilizando NADPH como cofactor reductor [91]. Estudios han demostrado que la exposición al Pb produce inmunosupresión junto con la respuesta al estrés [47]. Según Holzerová y Prokisch [92], las mitocondrias desempeñan un papel clave y fundamental en el metabolismo de la célula a nivel aeróbico. La vía mediada por las mitocondrias es una vía apoptótica importante y desempeña un papel fundamental en la regulación de la apoptosis inducida por diversos tóxicos [13]. Así el aumento de la actividad de SOD puede ser una consecuencia de la producción intensiva de aniones superóxido en las mitocondrias [93]. Además, la exposición al Pb conduce al estrés oxidativo del retículo endoplásmico [94], y puede también causar una supresión directa del sistema inmunológico en especies de peces de agua dulce, al provocar estrés oxidativo debido a la sobreproducción de ROS, SOD, CAT, GSH y GST son factores clave en este proceso cuando se intenta reducir los efectos nocivos del Pb en la célula. Por otro lado, SOD, CAT y GSH son conocidas como las principales enzimas que pueden desintoxicar ROS [95].

En la **Figura 2** se muestra un diagrama esquemático del estrés oxidativo inducido por Pb en especies de peces de agua dulce, donde la captación de Pb por las células se produce a través de varios mecanismos, entre ellos el transportador de ATPasa activa (AAT), transportados de metal divalente 1 (DMT1) y canales pasivos (PC). Debido a su naturaleza liposoluble, el Pb puede atravesar fácilmente las membranas celulares, compuestas principalmente de fosfolípidos. En la membrana celular, el Pb interfiere con la actividad de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), alterando las respuestas celulares a las señales hormonales. El Pb se une a los grupos tiol dentro de la célula en proteínas y moléculas como el glutatión (GSH), formando complejos plomo-tiol que alteran la función celular y conducen a la homeostasis. Metalotioneína (MT) se une al Pb como mecanismo de defensa, reduciendo su concentración libre y mitigando sus efectos tóxicos. El Pb también afecta la actividad y regulación de la NADPH oxidasa, aumentando la generación ROS y radicales libres. Estas ROS causan peroxidación lipídica en las membranas celulares, dañan proteínas y ácidos nucleicos, oxidan proteínas, rompen cadenas de ADN y conducen a disfunción celular. El estrés oxidativo resultante induce inflamación y apoptosis en las células. Además, el Pb puede alterar la función del retículo endoplasmático (RE), afectando la síntesis de proteínas y la homeostasis del calcio, y contribuyendo aún más a la disfunción celular y al estrés oxidativo.

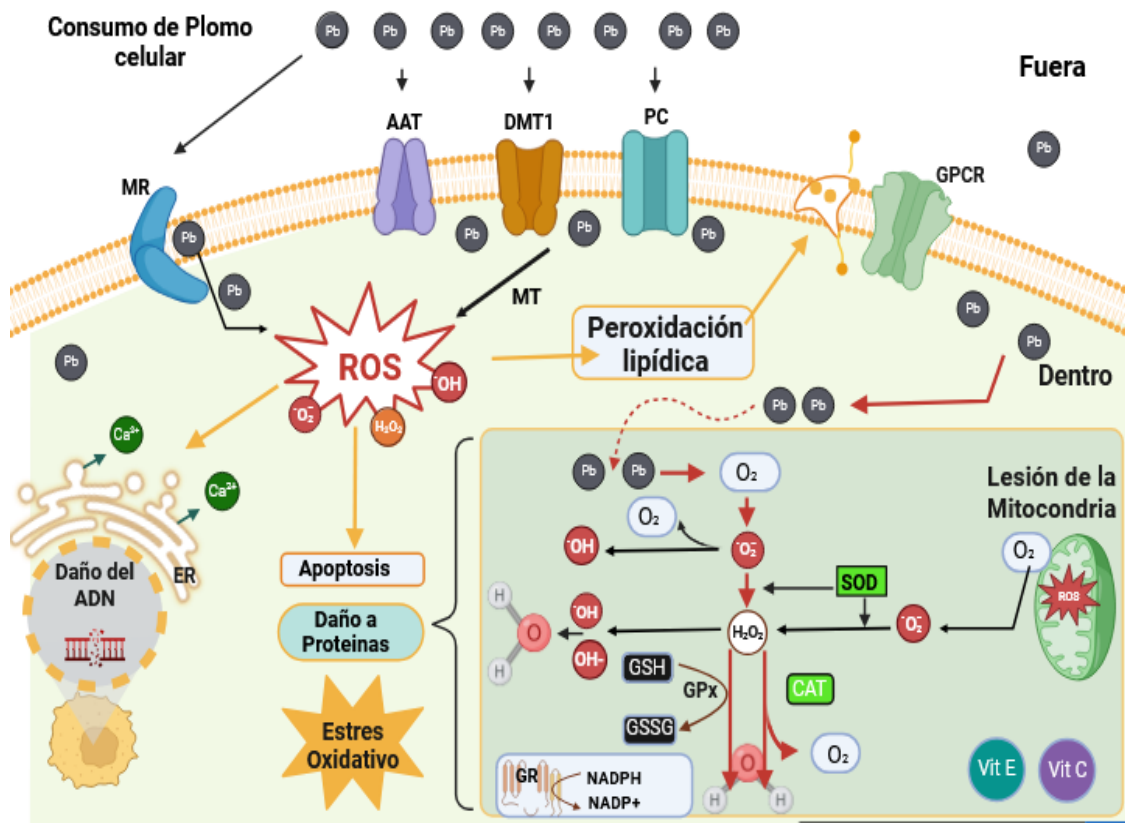


Figura 2. Esquema de la captación celular del plomo (Pb), componentes clave: AAT (transportador de ATPasa activa), DMT1 (transportador de metal divalente 1), PC (canal pasivo o transportador), GPCR (receptor acoplado a proteína G), MR (receptor de unión a metales), MT (metalotioneína), ROS (especies reactivas de oxígeno): superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\bullet OH$), SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), GPx (glutatión peroxidasa), GSH (glutatión), Vit C (vitamina C), Vit E (vitamina E), ER (retículo endoplasmático). Fuente: figura creada por H.J.P.M con BioRender.com

Las respuestas antioxidantes que muestran los peces expuestos a Pb se visualizan en la **Tabla 3**. Fátima et al. [96] informaron que en pez cabeza de serpiente y bagre punzante la actividad de SOD y CAT aumentó significativamente en el hígado después de la exposición al Pb, lo que indica un intento del organismo de neutralizar las ROS producidas. Como sabemos, el tejido y las especies reaccionan de manera diferente con respecto a su respuesta antioxidante. En carpa cruciana (*Carassius auratus gibelio*), Khan et al. [97] reportaron que la exposición crónica al Pb condujo a la inhibición de la actividad de SOD en los riñones, músculos e hígado, mientras que, en las branquias y el cerebro, se observó un aumento por exposición aguda. Esto sugiere que ciertos tejidos son más propensos a sufrir daños por estrés oxidativo.

CAT es otra enzima antioxidante que produce la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. En estudios con Anguilla amarilla, encontraron que la exposición crónica al Pb no afectó significativamente la actividad de CAT en el hígado, pero sí la aumentó en las branquias. La presencia de CAT en cantidades altas en las branquias sugiere que esta especie se adapta al estrés oxidativo en exposición directa a un ambiente acuático contaminado [98]. En contraste, Khalil et al. [99] reportaron en la carpa, que la actividad de CAT fue inhibida en peces expuestos a Pb, tanto en branquias (2.1%) como en el hígado (41.1%). Adicionalmente, Latif et al. [100] en el pez ray-finned (*Cirrhitina mrigala*), obtuvieron un incremento en SOD, y se observó una disminución significativa en la actividad de CAT en el hígado debido al efecto del Pb. Esto es consistente con Giri et al. [101] quienes reportaron en carpa común, baja actividad de GSH, SOD, GPx y GST en el riñón, intestino e hígado.

Por otro lado, glutatión peroxidasa (GPx), que protege a las células del daño oxidativo al convertir el peróxido de hidrógeno en agua, también muestra variaciones en su actividad en respuesta al Pb. En carpa cruciana, la exposición a Pb durante la fase aguda y la fase crónica mostró una inhibición de GPx en el hígado, mientras que, se detectó un incremento en las branquias y los riñones [97]. Algunos tejidos pueden compensar el daño del estrés oxidativo al aumentar la actividad de la enzima GPx. De manera similar, Dai et al. [102] encontraron que en carpa cruciana, los niveles de GPx y CAT aumentaron después de 30 y 60 días de exposición al Pb en los riñones y el hígado, lo que indica funciones defensivas a lo largo del tiempo contra la oxidación producida por este metal.

El GSH juega un papel importante en la defensa celular contra ROS. Se ha demostrado que los peces expuestos al Pb disminuyen los niveles de GSH en varios tejidos. Por ejemplo, en carpa común, los niveles de GSH disminuyeron significativamente en el cerebro y el hígado después de la exposición al Pb, lo que indica una pérdida de esta defensa antioxidante esencial [103]. Por el contrario, Atli et al. [17] encontraron que, en tilapia del Nilo, la exposición al Pb alteró el metabolismo normal de GSH en los eritrocitos, aumentando el GSH reducido y disminuyendo el glutatión oxidado (GSSG). Esta mejora en la relación GSH/GSSG actúa como un mecanismo compensatorio contra la oxidación causada; sin embargo, la función de GST y GPx fue abolida bajo la exposición al Pb, indicando una deficiencia de antioxidantes y una abundante acumulación de ROS.

En anguilla amarilla, GST aumentó en tejido branquial de los peces expuestos a Pb, mientras que no hubo daño hepático, sugiriendo una adaptación de este tejido protector para

eliminar este metal, mostrando también una función protectora contra la oxidación [98]. De manera similar, Nosheen et al. [104] igualmente reportaron un aumento de GST en el hígado y el cerebro en catla (*Labeo catla*) después de la exposición al Pb.

LPO causó un incremento de ROS tras la exposición al Pb que conduce agresivamente a un daño a nivel de la membrana celular. El malondialdehído (MDA) es un determinante en este proceso de LPO y estrés oxidativo. Fátima et al. [96] observaron niveles aumentados de MDA en dos órganos el cerebro y branquias, en pez cabeza de serpiente así como en bagre, destacando el daño oxidativo que sufren estos tipos de tejidos. De manera similar, Özkan-Yilmaz et al. [103] reportaron aumento de MDA en el cerebro e hígado de carpa común expuesta a Pb, indicando que este tipo de tejidos, al ser ricos en lípidos, son más susceptibles al daño por ROS. Adicionalmente, Oya-Silva et al. [105] reportaron oxidación significativa en presencia de Pb en bagre plateado (*Rhamdia quelen*), lo cual se evidenció por el aumento de los niveles de MDA en el hígado y la sangre.

Pez cebra expuesto a la acción de Pb mostró morfología hipertrófica y degeneración de células epiteliales en tejido branquial, junto con el aumento de SOD, sugiriendo actividad de esta enzima contra el daño oxidativo [35]. Sin embargo, Franklin et al. [106] encontraron que en rohu, el daño oxidativo causado por Pb generó un aumento de la peroxidasa (POD) en branquias y tejido hepático.

Tabla 3. Lista de estudios que informan de estrés oxidativo por plomo (Pb) en varias especies de peces de agua dulce en diversos ambientes de cuerpos de agua dulce alrededor del mundo.

Especie	Ruta de Exposición	Concentración de Pb	Tiempo de Exposición	Mecanismos de Defensa Antioxidante	Tejido	Producción de ROS Inducida por Pb	Respuestas Específicas del Tejido	Posibles Consecuencias para la Salud de los Peces	Referencia País
Anguilas amarillas (<i>Anguilla anguilla</i>)	Agua	300, 600, 1.200 $\mu\text{g L}^{-1}$	28 días	GST	• Branquias • Hígado	Aumento de GST.	Bioacumulación en branquias.	Sin daño en membranas ni Neurotoxicidad colinérgica.	[98] Portugal
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Agua	1,5 mg L^{-1}	14 días	GPx GST GSH	• Hígado • Cerebro	Disminución de GSH. Aumento de GST.	Respuestas entre hígado y cerebro.	Efecto protector del selenio orgánico contra el estrés oxidativo inducido por Pb.	[103] Turquía
Snakehead murrel (<i>Channa striatus</i>) y bagre punzante (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	Dieta	0.05, 0.5, y 1 mg L^{-1}	28 días	GSH SOD CAT	• Riñón • Hígado • Cerebro	Aumento de ROS y LPO, reducción de SOD.	Respuestas en cerebro mediante el daño a proteínas.	Histopatología alterada en hígado, riñón y cerebro.	[96] India
Carpa cruciana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	Agua	300 $\mu\text{g L}^{-1}$	48 horas	CAT SOD GPx	• Riñón • Hígado • Branquias	Aumento de LPO.	Neurotoxicidad crónica.	Desequilibrio entre producción de ROS y defensas antioxidantes.	[97] China
Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Agua	1,5 mg L^{-1}	48 horas	SOD CAT GPx GST GSH/GSSG	• Eritrocitos	Producción elevada de ROS.	Respuesta mixta antioxidante. Alteración GSH/GSSG	Estrés oxidativo agudo y crónico con respuestas adaptativas y fases de agotamiento.	[17] Turquía

Carpa cruciana (<i>Carassius auratus</i>)	Agua	0.05, 0.5, y 1 mg L ⁻¹	30 y 60 días	SOD, CAT, GPx GSH	• Riñón • Hígado	Incremento en actividades antioxidantes	Respuesta mixta antioxidante.	Estrés oxidativo con reducción de la capacidad inmunitaria.	[102] China
Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Dieta	1,5 mg L ⁻¹	14 días	LPO	• Branquias • Hígado	Aumento de LPO.	Respuesta mixta antioxidante. Daño de membranas celulares.	LPO como biomarcadores de daño oxidativo en peces expuestos al Pb.	[106] Pakistán
Catla (<i>Labeo catla</i>)	Agua	-	96 horas	POD	• Hígado • Branquias • Riñón • Músculo • Corazón • Cerebro	Incremento de POD.	Respuesta mixta antioxidante	Alteración en la actividad de enzimas antioxidantes como respuesta al estrés oxidativo.	[104] Pakistán
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Agua	2.072 µg L ⁻¹ 4.144 µg L ⁻¹	48 horas	CAT GST GSH	• Hígado • Branquias • Músculos • Riñones • Cerebro	Inhibición de GST y GSH.	Estrés oxidativo severo en hígado y branquias; deterioro en mecanismos de defensa antioxidantes.	Alteraciones inmunológicas, conductuales y fisiológicas.	[99] Pakistán
Ray-finned fish (<i>Cirrhina mrigala</i>)	Agua	20 µg L ⁻¹	48 horas	SOD CAT POD	• Hígado • Riñones • Branquias • Músculos • Cerebro	Inhibición de CAT y SOD; aumento de POD.	Estrés oxidativo variable según el tejido.	Acumulación de Pb en el orden: hígado, branquias, cerebro, riñones y músculos.	[100] Pakistán
Bagre plateado (<i>Rhamdia quelen</i>)	Agua	10, 20, y 30 µg L ⁻¹	96 horas y 21 días	SOD CAT	• Sangre • Riñón • Hígado	Alteraciones en GSH y enzimas antioxidantes	Genotoxicidad en sangre y riñón; daño hepático.	Efectos tóxicos significativos a corto plazo por exposición conjunta de NPTiO ₂ y Pb.	[105] Brasil

				GPx					
				GSH					
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Agua	0,2 mg L ⁻¹	30 días	SOD con cúrcuma	• Hígado	Aumento de SOD, GPx y GST.	Disminución de Pb acumulado y estrés oxidativo; mejora en la respuesta inmunitaria.	La cúrcuma reduce el daño oxidativo, restaura enzimas y mejora respuestas inmunológicas.	[101] Corea
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Agua	2,5 y 5 µg L ⁻¹	48, 96, 192 horas	SOD	• Branquias	Aumento de SOD y proteínas protectoras.	Alteraciones morfológicas y funcionales en branquias, incluyendo hipertrofia y degeneración celular.	Cambios histológicos y pérdida de la capacidad osmorreguladora.	[35] Italia

La tabla recopila los resultados de varios estudios que investigan el impacto del plomo (Pb) en el estrés oxidativo en especies de peces de agua dulce en diversos entornos acuáticos a nivel mundial. Los estudios abarcan una variedad de especies y ubicaciones geográficas, lo que contribuye a una comprensión integral de los efectos del plomo en la salud de los peces en los ecosistemas de agua dulce.

3. Inmunotoxicidad en especies de peces de agua dulce inducida por la exposición al plomo.

La exposición al Pb afecta significativamente las defensas inmunológicas de los peces de agua dulce. El sistema inmunológico es crucial para la protección contra infecciones de bacterias, parásitos y factores estresantes ambientales, incluidos contaminantes como el Pb [102,107]. Comprender los efectos inmunotóxicos del Pb es esencial para evaluar la salud general de las poblaciones de peces y la integridad ecológica de los ecosistemas de agua dulce. Por ejemplo, análisis de toxicidad del Pb para el pez cebra reveló que la mortalidad de los peces aumentó con el tiempo de exposición y el incremento de las concentraciones de Pb [108]. Además, el análisis hematológico es un parámetro básico para la determinación de la salud de los peces y el estrés en caso de exposición a diversos tóxicos, como los metales [18]. Además, el hígado de los peces es un órgano importante para los estudios ecotoxicológicos y es el sitio principal de acumulación de Pb. Por lo tanto, la toxicidad del Pb aumenta las expresiones del citocromo P450 1 A (*cyp1a*) y del citocromo P450 3 A (*cyp3a*) [109]. Por otro lado, las MTs (metalotioneínas) han surgido como un componente importante, aunque en gran medida se ha subestimado del sistema inmunológico. Las células inmunitarias innatas y adaptativas regulan las MTs en respuesta a estímulos de estrés [110]. Un estudio realizado en rohu, mostró que las proteínas de estrés de unión a metales pesados, las proteínas de choque térmico (*hsp60* y *hsp70*) y las MTs aumentaron debido a la toxicidad del Pb [109].

La exposición al Pb demuestra una producción deficiente de citoquinas y macrófagos, [111]. Los tejidos inmunitarios de los peces incluyendo el timo (diferenciación y maduración de linfocitos T asociados con daño oxidativo al hígado en peces) [112], las células B y T (que influyen en la respuesta celular y humoral alterando la función de las células T y aumentando la susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad e hipersensibilidad) [113] y la inflamación (un proceso de defensa clave), que se activan por la exposición al Pb. Los mediadores del proceso inflamatorio se pueden subdividir en mediadores tempranos (*tnf- α* , *il-1*, *il-6*, *il-8*), y mediadores secundarios (metabolitos del ácido araquidónico, proteasas, ROS, óxido nítrico) [114].

Las investigaciones actuales indican que la producción de forma simultánea y alta de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias es necesaria en cualquier respuesta inmunitaria, la liberación de las citocinas proinflamatorias provoca la activación de esta

respuesta, seguida de la síntesis de células inmunitarias y la liberación de citoquinas adicionales. [115]. Así, los iones Pb entran a la célula desde el espacio extracelular y alteran la función mitocondrial, lo que lleva a la producción de ROS. El exceso de ROS generado causa estrés oxidativo, y esto, a su vez, activa la vía de señalización de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y fosfoinosítido 3 - quinasa (PI3K), lo que contribuye a la inflamación y la desregulación del sistema inmunológico. Por otro lado, el estrés oxidativo causa daño al ADN y desencadena la activación de la vía NF- κ B, que promueve la expresión de genes y la activación de vías que conducen a la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo *tnf- α* , *il -6*, *il-8* e *il-1 β* involucradas en la inflamación, la respuesta inmunitaria y la apoptosis (**Figura 3**).

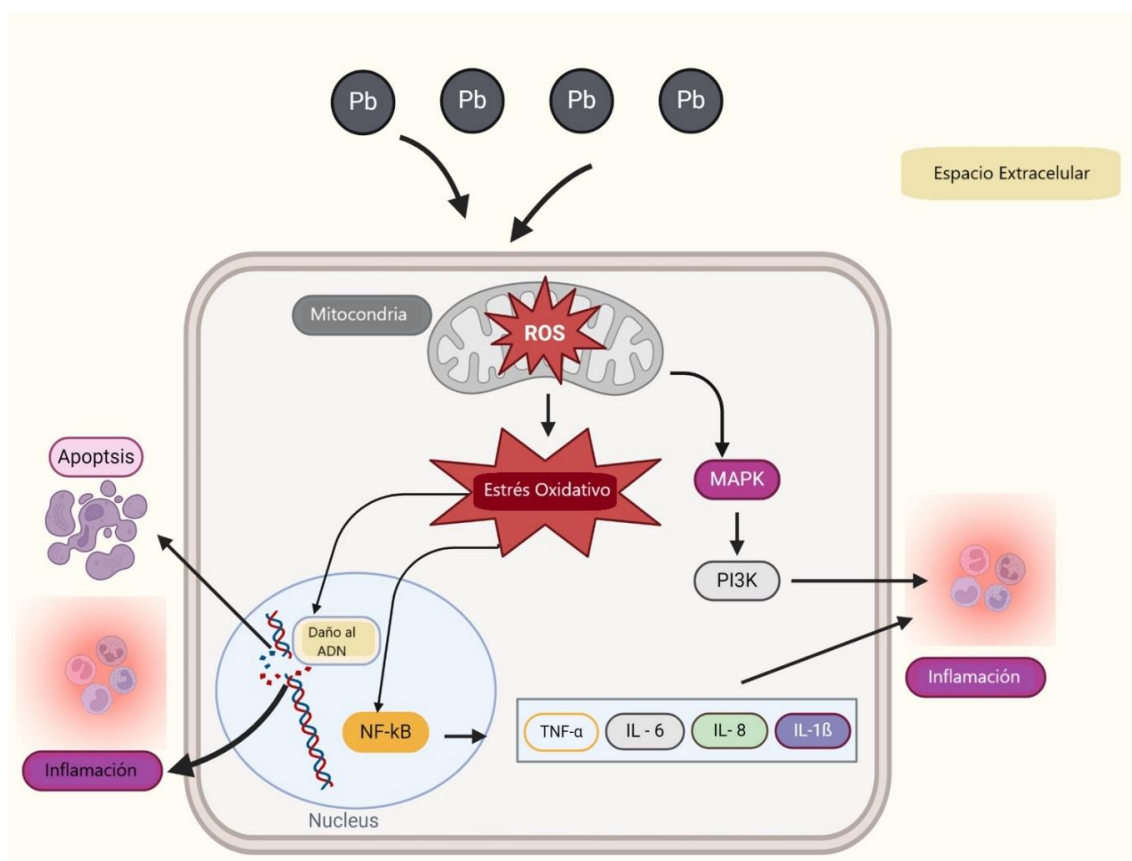


Figura 3. Esta figura ilustra la vía de estrés oxidativo inducido por Pb y sus efectos inmunotóxicos posteriores en peces de agua dulce. **Pb** (plomo), **ROS** (especies reactivas de oxígeno), **MAPK** (proteína quinasa activada por mitógeno), **PI3K** (fosfoinosítido 3-quinasa), **TNF- α** (factor de necrosis tumoral), **IL-6** (interleucina 6), **IL-8** (interleucina 8) e **IL-1 β** (interleucina 1 beta), **ADN** (ácido desoxirribonucleico), **NF- κ B** (potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas). Fuente: figura creada por H.J.P.M con BioRender.com

Por otro lado, estudios previos en trucha han demostrado que el estrés activa receptores de reconocimiento de patrones, incluidos los receptores tipo Toll 2/3/4/7/8, e inducen a las

citoquinas producidas a participar en la expresión diferencial de ncRNA [116]. El efecto más significativo del Pb en las vías de señalización se ha observado en las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) [117] y NF-κB (factor nuclear-κB) [118]. La cascada MAPK regula procesos fisiológicos clave, como la división y muerte celular, y está conectada a la inducción del proceso inflamatorio a través de la activación de moléculas de señalización, a saber, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), quinasas N-terminales c-Jun (JNK) y MAPK p38 [119]. Li et al. [120] demostraron que la exposición a Pb causa pérdida de la membrana mitocondrial JC-1, además de activar la vía de señalización JAK2/STAT3 y aumentar los niveles de Caspasa 3 y Caspasa 9. Algunos estudios recientes han demostrado que Pb actúa sobre las células T CD4⁺ esplénicas al suprimir la producción de IFN γ , lo que daña la señalización de vía Janus quinasa (Jak)1 transductor de señales y activador de la transcripción STAT1. La señalización debilitada de Jak1/STAT1 da como resultado una señalización nuclear mejorada de NF-κB en las células del endotelio [121]. El Pb en el hígado de lubina negra aumenta significativamente la relación con las cascadas del complemento, la coagulación, las vías de citotoxicidad mediadas por células asesinas naturales, las vías de señalización Jak-STAT y la apoptosis [122]. Ishola et al. [123] informaron que la evaluación de riesgos para la salud humana reportó que el consumo de tilapia no es seguro ya que los valores de ingesta diaria estimada para el consumo de tilapia por adultos arrojaron valores altos fuera del límite permitido para Pb. Por otro lado, la lisozima (LYZ) es una hidrolasa ampliamente distribuida que juega un papel importante en la inmunidad innata de los peces debido a sus propiedades antivirales, antibacterianas y antiinflamatorias [124].

La exposición al Pb en peces de agua dulce induce inmunotoxicidad, que afecta varios mecanismos y funciones inmunitarias, causando una brecha de defensa contra las infecciones. Estudios revisados profundizan en diferentes vías de exposición en varias especies, aportando hallazgos importantes para una visión oportuna de los efectos tóxicos que el Pb puede causar en varios tejidos del organismo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Lista de estudios que informan sobre los efectos inmunotoxicológicos del plomo (Pb) en varias especies de peces de agua dulce en diversos entornos de cuerpos de agua dulce en todo el mundo.

Especie	Ruta de Exposición	Tejidos Afectados	Mecanismos de Inmunotoxicidad Inducida por Pb	Marcadores para Evaluar Inmunotoxicidad	Concentración de Pb	Tiempo de Exposición	Posibles Consecuencias para la Salud de los Peces	Referencia País
Bagre (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	Agua	• Branquias • Hígado	Disminución de electrolitos plasmáticos, específicamente calcio y fosfato.	Niveles de calcio y fosfato plasmáticos.	Corto plazo: 164,4 mg L ⁻¹ Largo plazo: 657,6 mg L ⁻¹	Corto plazo: 96 h Largo plazo: 28 días	Alteraciones en la salud general y en el equilibrio de electrolitos.	[125] India
Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Agua	• Branquias • Hígado • Riñón	Estrés oxidativo, inflamación, cambios hematológicos, alteración en la función de células inmunitarias.	Conteo de eritrocitos (RBC), hematocrito (Hct), hemoglobina (Hb), actividad de lisozima, actividad de MPO.	0,5 – 2,5 - 5 mg L ⁻¹	14 días	Cambios hematológicos e inmunológicos, sugiriendo Inmunotoxicidad inducida por plomo.	[126] Turquía
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Agua	• Hígado • Branquias	Incremento en GST hepático y lipoperoxidación en branquias.	Parámetros de estrés oxidativo (CAT, GPx, LPO) y actividad de AchE.	300, 900, 2.700 µg L ⁻¹	28 días	Inhibición enzimática, disfunción inmunitaria, inflamación y apoptosis.	[248] Portugal
Cabeza de serpiente punteado (<i>Channa punctatus</i>)	Agua	• Intestino	Disminución de fagocitosis bacteriana, adhesión celular, liberación de NO y MPO. Reducción de TNF-α.	Fagocitosis, MPO, NO, TNF-α, índice de fagocitosis.	9,43 mg L ⁻¹	4 días	Inmunosupresión y mayor susceptibilidad a infecciones.	[132] India
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) y bagre (<i>Silurus glanis</i>)	Agua	• Branquias • Hígado	Estrés oxidativo, inflamación y disfunción del sistema inmunitario.	SOD, CAT, GPx, TNF-α, IL-1β, IL-6.	1 – 2,1 mg kg ⁻¹	-	Impacto en órganos reproductivos, daño orgánico y disfunción.	[3] Bosnia y Herzegovina

		• Músculos						
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)	Agua	• Branquias • Hígado • Músculos	Bioacumulación de Pb, alterando el sistema inmunitario.	Niveles de Pb en hígado, branquias y músculos.	$0,25 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ $0,56 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$	Muestras estacionales	No se observaron consecuencias en la salud debido a concentraciones seguras.	[128] Turquía
Surubí (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>)	Agua	• Bazo • Hígado • Músculos	Cambios histopatológicos en el hígado, alteraciones en enzimas hepáticas y proteínas séricas.	Actividad fagocítica, actividad de lisozima, producción de anticuerpos.	$1 - 50 \mu\text{g g}^{-1}$	-	Alteraciones hepáticas, hematológicas, neurológicas y renales.	[129] Brasil
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Agua	• Branquias • Hígado • Riñón • Intestino • Músculos	Alteraciones en actividad de enzimas antioxidantes, aumento de citocinas proinflamatorias.	CAT, SOD, LPO, TNF- α , IL-6, IFN- γ .	250 mg L^{-1}	7, 15, 30 días	Daño en hepatocitos, cambios morfológicos en branquias.	[127] China
Carpa cruciana (<i>Carassius auratus</i>)	Agua	• Riñón • Hígado	Estrés oxidativo, alteración antioxidante, inmunotoxicidad.	ALAD, LYZ, IgM, HSP70, TNF- α , IL-10.	$0 - 0,05 - 0,5 - 1 \text{ mg L}^{-1}$	30 y 60 días	Estrés oxidativo, inflamación, alteración de genes inmunológicos.	[112] China
Carpa (<i>Cirrhinus mrigala</i>), rohu (<i>Labeo rohita</i>), catla (<i>Labeo catla</i>)	Agua	• Branquias • Hígado • Intestino	Expresión de HSP70, biomarcadores de estrés, alteración en crecimiento.	Niveles de Pb en hígado, músculo y branquias.	$4,14 - 41,0 \mu\text{g L}^{-1}$	-	Daño en órganos reproductivos, alteración en testosterona, daño testicular.	[8] Pakistán
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Agua	• Riñón cefálico	Cambios morfológicos en el tejido del riñón cefálico, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y	Niveles de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y análisis de expresión génica	$0 - 1 \text{ y } 2 \text{ mg L}^{-1}$	60 días	Inflamación aumentada, niveles elevados de ROS y actividades comprometidas de enzimas	[133] China

			celular.	(microRNA-155).			antioxidantes.	
Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Dieta	• Bazo • Músculo	La exposición al plomo redujo la actividad de la lisozima, óxido nítrico y actividad bactericida.	Lisozima sérica, óxido nítrico, actividades bactericidas, expresión relativa de IL-1β.	20,2 mg L ⁻¹	45 días	Efectos inmunosupresores.	[269] Egipto
Bagre amarillo (<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	Agua	• Riñón cefálico • Bazo	Estrés oxidativo aumentado, alteraciones histomorfológicas, respuestas inflamatorias y apoptosis.	Enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GSH. Marcadores de estrés oxidativo: MDA, AKP, ACP. Marcadores inmunológicos: LYZ, C3, IgM. Expresión génica: HSP70, MT, IL-10.	0, 5, 50, 500 µg L ⁻¹	7, 14, y 28 días	Deterioro de la función inmunitaria y la integridad tisular.	[4] China
Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	Agua	• Hígado	Estrés oxidativo, alteración en genes y enzimas inmunológicas.	ROS, CAT, SOD, GSH, GPx, MDA, EROD.	60 mg L ⁻¹	45 – 90 días	Daño hepático, estrés oxidativo, alteración en crecimiento.	[141] China
Pez lobo (<i>Hoplias malabaricus</i>)	Cultivo celular	• Riñón	Citotoxicidad, reducción de NO, estrés oxidativo.	Viabilidad celular, NO, fragmentación de ADN.	100, 1.000, 10.000 µg L ⁻¹	24 horas	Afecta viabilidad celular y producción de NO.	[130] Brasil
Bagre africano (<i>Clarias gariepinus</i>)	Agua	• Hígado • Riñón	Aumento de LPO, disminución de parámetros inmunológicos y antioxidantes.	LPO, función hepatorenal, antioxidantes hepáticos.	69,30 mg L ⁻¹	45 días	Reducción en sobrevivencia, daño hepático y renal.	[131] Egipto

Los estudios enumerados en esta tabla investigan los efectos inmunotoxicológicos inducidos por el plomo (Pb) en diversas especies de peces de agua dulce en varios entornos de agua dulce en todo el mundo.

En bagre, el Pb provocó alteración del equilibrio electrolítico y la respuesta inmunitaria al disminuir los niveles de calcio y fosfato en el riñón y las branquias [125]. Por otra parte, Kaya et al. [126] reportaron una disminución considerable en el conteo total de glóbulos rojos junto con los niveles de hematocrito y hemoglobina en tilapia, además de estrés inflamatorio y actividades reducidas de lisozima y mieloperoxidasa. De manera similar, Nunes et al. [98] informaron que la exposición a Pb generó una serie de eventos como inflamación, apoptosis. Además, suprimió funciones del sistema inmunitario y bloqueó la actividad de lisozima en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), como respuesta a la producción de óxido nítrico en células de hígado y branquias. De acuerdo y en concordancia con, Has-Schön et al. [3] los niveles aumentados de citocinas inflamatorias como *tnf-α* e *il-6* en carpas, se debió a la formación de un ambiente proinflamatorio en el tejido hepático, muscular y branquial. De manera similar, Rajeshkumar et al. [127] en carpa común, reportaron niveles aumentados de citocinas inflamatorias lo que sugirió alteraciones morfológicas en las branquias. En bagre amarillo, se observó daño histológico en órganos como cabeza, riñón y bazo en respuesta a la exposición al plomo, que incluye apoptosis, atribuida a inmunosupresión que compromete la capacidad del organismo para mantenerse saludable en ambientes tóxicos [4]. Un estudio en chub (*Leuciscus cephalus*) indicó que la exposición al Pb daña branquias, hígado y músculos debido a la acumulación de este metal. Además, en respuesta a este daño se vió alteraciones histológicas [128]. En surubi (*P. corruscans*), la exposición al Pb afectó considerablemente al hígado y bazo al reducir la actividad fagocítica y la producción de anticuerpos [129]. En el caso de carpa cruciana, el Pb no solo incrementó el estrés inmunológico, sino que también alteró la expresión de genes claves de inmunidad como *lyz*, *igm* y *hsp70*, lo que representa un daño en la regulación genética de la respuesta inmunitaria [112]. Así mismo, en tilapia del Nilo, la exposición a Pb redujo la actividad de la lisozima y el óxido nítrico en la respuesta inmunitaria, debilitando la inmunidad innata y aumentando el riesgo de infecciones [40]. En pez lobo (*Hoplias malabaricus*), la exposición al Pb provocó la disminución de la viabilidad celular y la producción de óxido nítrico en células renales, indicando un impacto directo en la función de los macrófagos renales y afectando la capacidad inmunitaria [130]. Por otro lado, en bagre africano (*Clarias gariepinus*), se observó una disminución en los parámetros inmunitarios proteicos, lo que compromete la función hepática y renal, afectando la respuesta inmunitaria y reduciendo la capacidad de resistencia a infecciones [131]. Paul et al. [132] reportaron en pez cabeza de serpiente, una reducción en la actividad fagocítica bacteriana y la actividad de eliminación intracelular, lo que demuestra que esta especie es muy sensible a la

adhesión celular y la liberación de óxido nítrico debido a la exposición al Pb en su intestino. Junejo et al. [8] reportaron que la exposición a Pb en carpa dañó el tejido branquial, hepático e intestinal, lo que provocó un deterioro de la función reproductiva, mostrando que el daño se extiende a nivel sistémico e impacta en la supervivencia y adaptación. Además, en la carpa mostró daño morfológico en el riñón anterior, afectando los túbulos renales y promoviendo una fuerte respuesta inflamatoria [133].

4. Estudios de casos de sensibilidad a la exposición al plomo en peces de agua dulce en distintas etapas de la vida.

Es importante comprender los diferentes efectos de la exposición al plomo en los peces de agua dulce durante sus etapas de vida. Esta sección se centra en la toxicidad, las respuestas inmunológicas, los cambios en la morfología y el comportamiento neurológico de estos peces en las etapas embrionarias, juveniles, adultas y reproductivas.

4.1. Etapa embrionaria.

Las primeras etapas de desarrollo de los peces de agua dulce, es decir, los embriones y las larvas, son más sensibles a contaminantes como el Pb que los peces juveniles y adultos y se utilizan ampliamente como organismos modelo para los biomarcadores que definen la toxicidad de dichas sustancias químicas en los cuerpos de agua [134]. Por ejemplo, el Pb causa malformaciones y alta mortalidad en esta etapa de la vida, en particular, la influencia de metales pesados transportados por el agua puede alterar el desarrollo embrionario de los reproductores por el aumento de los niveles de Pb en las gónadas femeninas cuando se exponen a concentraciones tóxicas de este metal [135]. Estudios cuantitativos destacan cómo concentraciones tan bajas como $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb pueden causar malformaciones, mientras que niveles superiores a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ dan como resultado tasas de mortalidad superiores al 30% en embriones de pez cebra [61]. Se observaron algunas anomalías a nivel morfológico, como lo son curvaturas espinales y deformidades craneofaciales, en embriones expuestos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb, lo que sugiere una interferencia crítica con los procesos normales de diferenciación celular [136]. Además, Roy et al. [137] reportaron que el Pb causa alteraciones en la morfología de la notocorda y el somita utilizando enfoques en vivo e in situ. Además, el daño neurológico, probablemente debido al deterioro del transporte de iones y al estrés oxidativo, se observa con frecuencia en modelos embrionarios; en particular, el daño neurológico espontáneo causado por el Pb en esta etapa de la vida es muy marcado [52].

4.2. Etapa juvenil.

Se ha demostrado que las formas juveniles son más fuertes que las formas embrionarias. Sin embargo, la investigación actual en esta etapa de la vida sugiere que la contaminación del agua con Pb causa una reducción en el rendimiento del crecimiento debido al estrés inducido por Pb. En tilapia juvenil expuesto a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb, se registró una reducción del 15 % en la tasa de crecimiento, acompañada de una morfología irregular de los eritrocitos y marcadores inmunológicos deteriorados [138]. Las mediciones cuantitativas de los marcadores de estrés oxidativo, incluido un aumento del 40% en la producción de ROS, revelan además la tensión fisiológica que el Pb impone en las etapas juveniles [32]. De manera similar, una disminución de hasta el 20% en la actividad fagocítica en presencia de Pb ilustra una supresión inmunitaria significativa, lo que hace que los juveniles sean más vulnerables a los patógenos ambientales [139]. En consecuencia, la exposición al Pb durante las etapas juveniles compromete tanto el crecimiento como la resistencia inmunológica, factores importantes para el desarrollo normal de la vida del pez.

4.3. Etapa adulta.

Los adultos presentan daño grave en el hígado, cambios en parámetros hematológicos, fisiológicos, bioquímicos, daños en los sistemas nervioso, inmunológico, cardiovascular y estrés oxidativo por la generación de ROS [140]. Esto se debe a la bioacumulación de Pb en el hígado, que afecta directamente la función metabólica y la capacidad de desintoxicación [42]. Los datos de bioacumulación indican que las concentraciones de Pb en el hígado pueden superar los $1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ en ambientes con contaminación baja [42]. Como resultado, las alteraciones hematológicas son comunes; los recuentos de glóbulos rojos caen hasta un 30% después de una exposición prolongada, indicativo de anemia [13]. El Pb interfiere y bloquea la acetilcolinesterasa, lo que lleva a cambios del comportamiento exploratorio y un deterioro del aprendizaje, observados en concentraciones de exposición tan bajas como $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ [141].

4.4. Etapa reproductiva.

Esta fase se ve afectada por disminución de la fertilidad por el fallo en espermatozoides expuestos al Pb. Alterando la motilidad y velocidad espermática. Por lo tanto, los índices gonadosomáticos de los peces pueden ser inferiores hasta en un 25% tanto en peces machos

como hembras expuestas a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb [142]. El Pb puede actuar en diferentes niveles del proceso reproductivo, desde los receptores hormonales hasta la vía esteroidogénica, y el desarrollo gonadal, pudiendo afectar así al potencial reproductivo y la sostenibilidad de las poblaciones de peces [143]. El Pb daña además las vías esteroidogénicas, particularmente en enzimas como la 3β - Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3β -HSD) y la aromatasas, que son esenciales para el éxito reproductivo [144].

Es fundamental realizar más investigaciones para profundizar nuestra comprensión de los mecanismos moleculares y celulares, por los cuales el Pb induce efectos tóxicos en los peces de agua dulce, incluida la elucidación de las vías de señalización que contribuyen al estrés oxidativo y los efectos inmunotóxicos [145]. Además, investigar cómo la presencia de otros metales pesados o contaminantes orgánicos puede influir en la bioacumulación de Pb y los efectos toxicológicos combinados es esencial para una comprensión integral de los riesgos ambientales [146]. Identificar y comparar especies de peces que exhiben distintos niveles de sensibilidad o resistencia al Pb puede proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de defensa inmunitaria y las estrategias de adaptación, lo que podría conducir al desarrollo de biomarcadores de exposición y evaluaciones de los efectos tóxicos. Estudios adicionales deberían investigar los efectos subletales y crónicos de la exposición al Pb en peces de agua dulce, centrándose particularmente en la reproducción, el comportamiento y los impactos fisiológicos a largo plazo. Desarrollar y evaluar métodos efectivos para remediar o mitigar la contaminación por plomo en hábitats acuáticos es esencial para la protección ambiental, que puede involucrar técnicas de biorremediación o estrategias de manejo del hábitat. Mejorar los modelos predictivos para comprender la bioacumulación de Pb en las redes alimentarias y sus efectos en diferentes especies que pueden ayudar a evaluar los riesgos ambientales e informar los esfuerzos de conservación. Investigar los efectos transgeneracionales de la exposición al Pb en las poblaciones de peces puede proporcionar información sobre los impactos a largo plazo y la salud del ecosistema. Aplicación de tecnologías ómicas, como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, para explorar los efectos a nivel molecular y celular de la exposición al Pb en los peces puede revelar nuevos biomarcadores de gran interés además de mecanismos toxicológicos. Por último, la integración de los resultados de las investigaciones sobre la toxicología del Pb en las estrategias de conservación y gestión de las especies de peces de agua dulce es crucial para mitigar los efectos adversos y promover ecosistemas acuáticos saludables.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente **Tesis Doctoral** fue avanzar en el conocimiento científico de los efectos inducidos por el plomo en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a nivel fisiológico e inmunológico para identificar tanto situaciones adversas para la salud del pez y futuras consecuencias que se podrían dar en humanos que consumen estos peces como fuente de proteína. Además, obtener información importante para mitigar el daño de este metal en el ecosistema acuático y así mejorar el bienestar de los peces de agua dulce y, por extensión, la productividad de esta especie.

Para lograr el objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar y cuantificar los parámetros hematológicos y bioquímicos claves en la homeostasis fisiológica de trucha arcoíris afectadas por la exposición al plomo, así como la expresión diferencial de genes asociados a procesos de desintoxicación e inflamación.
2. Examinar la expresión de genes de mecanismos inmunológicos modulados por la exposición al plomo, en tejidos linfoides asociados a mucosas como el intestino, la piel y las branquias de trucha arcoíris.

3. CAPÍTULO EXPERIMENTALES

CAPÍTULO 1:

Evaluación de parámetros hematológicos, metabolitos bioquímicos y expresión de genes en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con una dieta con plomo.

H.J. Pérez-Mesa, A. Ordóñez-Ugalde, Iván Ricardo Vega-Valdez, María Zari-Muñoz, Johanna Sinchi, Francisco A. Guardiola, 2025. Assessment of haematological parameters, biochemical metabolites, and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lead-diet.

CAPÍTULO 2:

Efecto a nivel molecular de una dieta con plomo sobre tejidos linfoides asociados a mucosas en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

H.J. Pérez-Mesa, María Zari-Muñoz, A. Ordóñez-Ugalde, Iván Ricardo Vega-Valdez, Francisco A. Guardiola. 2025. Molecular-level effect of a lead-containing diet on mucosa-associated lymphoid tissues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

CAPÍTULO 1:

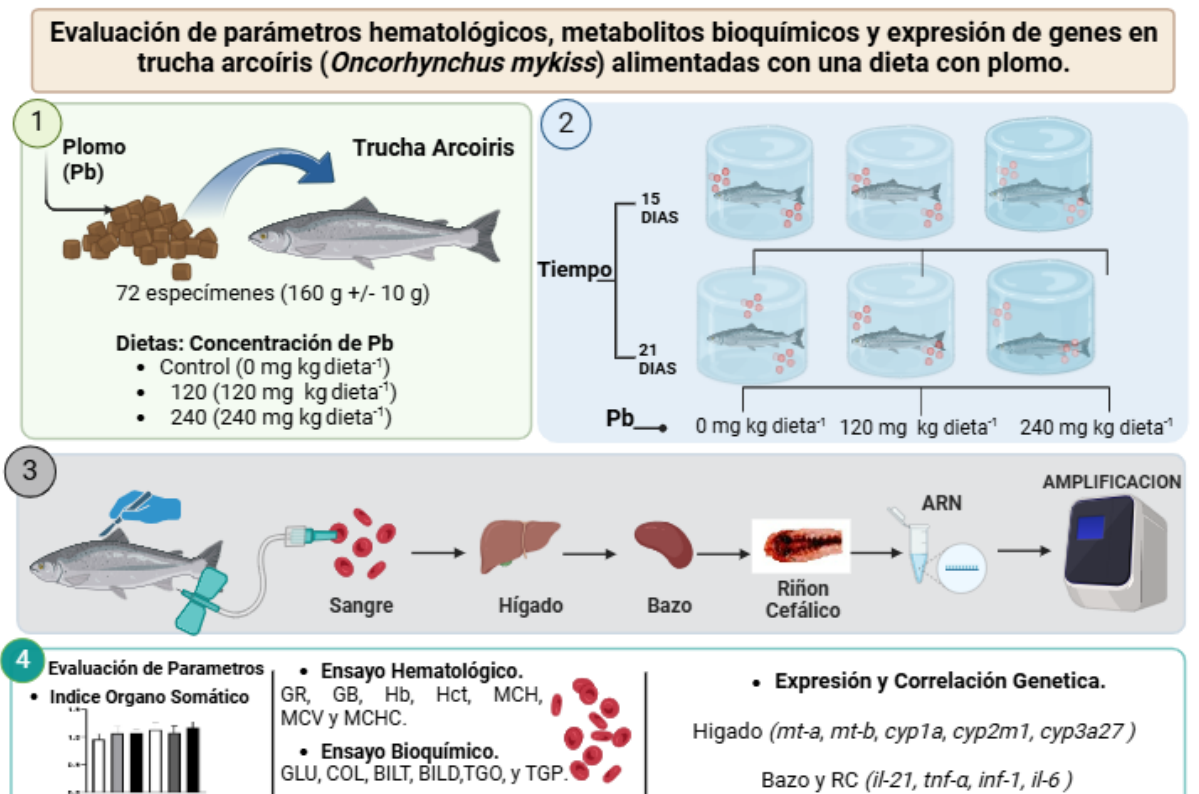
Evaluación de parámetros hematológicos, metabolitos bioquímicos y expresión de genes en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con una dieta con plomo.

1. Resumen.

El plomo (Pb) es un metal que puede contaminar ríos, lagos y arroyos al arrastrar partículas desde el suelo por el agua de lluvia y su bioacumulación se considera de alto peligro para la salud humana y ambiental. El objetivo del presente estudio fue evaluar los parámetros a nivel hematológico y bioquímico en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas suplementadas con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ durante 21 días. Para ello, se evaluaron los índices somáticos en hígado y bazo. Se analizaron glóbulos rojos (GR) glóbulos blancos (GB), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), hemoglobina corpuscular media (MCH), volumen corpuscular medio (MCV), y metabolitos bioquímicos como glucosa (GLU), colesterol (COL), transaminasas como la aspartato aminotransferasa (TGO) y la alanina aminotransferasa (TGP) también bilirrubina total (BILT), bilirrubina directa (BILD), en muestras de sangre a los 15 y 21 días de exposición al Pb. Por otro lado, se evaluó el impacto del Pb en la expresión de genes que participan en vías de desintoxicación (*mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1*, *cyp3a27*) en el hígado y en procesos de inflamación (*il-21*, *tnf-α*, *inf-1* e *il-6*) en bazo y riñón cefálico (RC). Nuestros resultados no revelaron variaciones en los índices organosomáticos. Sin embargo, en sangre completa, se observó una disminución en los valores de GR, Hb y Hct después de 15 y 21 días de exposición en peces alimentados con Pb. Contrariamente, el número de GB aumentó en peces expuestos a la dieta con Pb. En suero, se detectó un aumento inicial de GLU en peces expuestos a la concentración de Pb más alta (240 mg kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos a los 15 días, que posteriormente disminuyó a la exposición de 21 días. Los valores de COL, BILT, DILD y TGO aumentaron, mientras que los niveles de TGP disminuyeron en los peces expuestos a ambas concentraciones (120 y 240 mg kg dieta⁻¹). La sobreexpresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2m1* y *cyp3a27* se encontró en el hígado, mientras que los genes *il-21*, *tnf-α*, *inf-1* e *il-6* se sobreexpresaron en el bazo y RC. Además, correlaciones positivas se mostró entre la dieta con Pb y genes de desintoxicación (hígado) e inflamación (bazo y RC). Este estudio indicó que las concentraciones de plomo analizadas fueron capaces de alterar los perfiles hematológicos y bioquímicos de la trucha arcoíris, además de afectar los principales genes relacionados con la desintoxicación en el hígado y los genes de inflamación en el bazo y RC.

Palabras clave: Plomo; Dieta; Hematología; Perfil bioquímico; Desintoxicación; Inflamación; trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

2. Resumen gráfico.



H.J. Pérez-Mesa, A. Ordóñez-Ugalde, Iván Ricardo Vega-Valdez, María Zari-Muñoz, Johanna Sinchi, Francisco A. Guardiola, 2025. Assessment of haematological parameters, biochemical metabolites, and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lead-diet.

3. Introducción.

Durante los últimos años, las actividades antropogénicas han aumentado intensamente las emisiones de metales pesados, lo que ha hecho que la contaminación por metales pesados sea uno de los principales problemas ambientales a nivel mundial [147]. Las operaciones mineras se consideran la mayor amenaza a la integridad ecológica debido a la toxicidad duradera [148]. Los metales son motivo de preocupación ya que afectan negativamente a la vida acuática y pueden acumularse o incluso biomagnificarse en la cadena alimentaria [149]. La toxicidad de los metales pesados es multidireccional y provoca cambios fisiológicos y químicos [150]. Estos metales se pueden acumular provenientes del agua circundante y de la dieta [151]. El plomo (Pb) es uno de los metales con alta toxicidad, persistencia y efectos bioacumulativos que pueden causar daños nocivos a los organismos vivos [152]. Los peces, están expuestos al metal a través de los alimentos en el tracto gastrointestinal y el agua en las branquias [153]. Además, estos metales pesados al ingresar a través de las branquias y otros órganos de los peces se acumulan en diferentes partes del cuerpo hasta un nivel tóxico [154]. La acumulación del Pb que es absorbido por los organismos vivos puede tener un impacto peligroso en la salud humana [155]. El consumo humano de animales acuáticos que contienen niveles elevados de metales pesados puede causar efectos adversos, como daño renal o pancreático, trastornos del comportamiento, dolor abdominal, vómitos, irritación de la piel, alteración del sistema endocrino, problemas cardiovasculares e inmunológicos [156,157]. Por otro lado, aunque el músculo de pescado se utiliza comúnmente para los análisis, siendo la principal parte del pescado utilizada para el consumo humano, algunos tejidos bioacumulan cantidades significativamente mayores de contaminantes que el músculo. Por ejemplo, el hígado es un órgano objetivo para el almacenamiento y bioacumulación de metales debido a la presencia de metalotioneínas (MTs) [156].

Varios investigadores han estudiado la bioacumulación de metales pesados en peces, donde se destaca la importancia del impacto que incluso bajas concentraciones de metales tienen en los riesgos de genocitotoxicidad en los eritrocitos de especies de peces carnívoros y omnívoros expuestos, así como en las cantidades de metales acumulados en ellos [157]. De hecho, los cambios de los parámetros hematológicos observados después de la exposición a metales se evidenciaron en varias especies marinas como las de agua dulce [158]. Estas variaciones a nivel hematológico se utilizan como indicador de niveles de estrés precisamente originados por metales [159]. El Pb puede agotar los principales antioxidantes en la célula,

especialmente las enzimas que contienen tiol, y puede causar aumentos significativos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), seguido de estrés oxidativo que conduce a varias disfunciones en lípidos, proteínas y ADN [160]. Los radicales libres pueden atacar tanto las membranas celulares de fosfolípidos como las moléculas de proteínas intracelulares para inducir el estrés oxidativo [161]. Además, la exposición al Pb puede alterar inicialmente los parámetros inmunológicos como una respuesta primaria al estrés y luego inhibirse [153]. Shabrangharehdasht et al. [162] reportaron una deformación morfológica en algunas células sanguíneas en la trucha arcoíris expuesta a AgNP. En la gallineta (*Sebastes schlegelii*), los parámetros hematológicos como el recuento de glóbulos rojos, el valor del hematocrito y la de hemoglobina disminuyeron notablemente con la exposición a Pb en la dieta [163]. Según Ishaque et al. [164] el Pb tiene una alta afinidad por los glóbulos rojos, lo que produce efectos tóxicos en la estructura de las membranas celulares que causa un alto estrés oxidativo. En la trucha arcoíris y pethia conchonius (*Barbus conchonius*), la exposición al Pb también mostró una reducción en el contenido de Hb y se observaron valores de Hct [165]. Por otro lado, en un estudio antagónico en la cobia (*Rachycentron canadum*), los niveles de glucosa aumentaron significativamente con el aumento del Cd [166]. Otro estudio evidenció disminución en los niveles de glucosa en sangre en la trucha arcoíris expuesta al Pb [167]. Varios autores han reportado que el Pb inhibe la enzima ATPasa y el ácido d-aminolevulínico deshidratasa (ALAD) que participa en el crecimiento y la síntesis del grupo hemo en eritrocitos y afecta la enzima de peroxidación lipídica [168]. Igualmente, el Pb también tiene influencia en la comunicación intercelular al cambiar las concentraciones de alanina aminotransferasa (TGP) y aspartato aminotransferasa (TGO) en tejidos y órganos [169].

El impacto de los metales pesados en los peces también se ha evaluado a través de la modulación de genes relacionados con el estrés celular, la desintoxicación, el metabolismo y las respuestas inmunitarias. Así por ejemplo, MTs que pertenecen a un grupo de proteínas citosólicas de bajo peso molecular que actúan como un almacenamiento temporal de metales en las células [170]. En la trucha arcoíris, las expresiones de MTs hepáticas son inducidas por la exposición a metales pesados [171]. Estudios de exposición a Pb en peces evidenciaron que existe una correlación positiva entre la captación de Pb y la biosíntesis de MTs [172]. Las MTs en peces se analizan comúnmente en el hígado, a pesar de la acumulación de metales pesados en branquias, sangre, intestino o riñón [170,171]. Otros biomarcadores utilizados son las enzimas citocromo P450 (CYP) que constituyen una súper familia funcionalmente diversa de enzimas hemo ligadas a tiolato de cisteína [172]. Los peces pueden usarse para monitorear

la contaminación ambiental con base en la expresión de CYP, que son sensibles a los efectos de ciertos xenobióticos y metales pesados [173]. Por otro lado, la inmunidad innata de los peces depende en gran medida de los macrófagos y linfocitos involucrados en la producción de compuestos específicos, incluidas las citosinas [174]. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el objetivo del presente estudio fue evaluar varios biomarcadores en truchas arcoíris expuestas a una dieta con Pb, analizando parámetros hematológicos y bioquímicos en sangre. Además, se evaluó la expresión de varios genes relacionados con la desintoxicación y la inflamación en el hígado, el bazo y riñón cefálico (RC) para identificar biomarcadores de contaminación en animales de acuicultura para prevenir problemas de salud en los consumidores finales.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Cuidado y mantenimiento de los peces.

Setenta y dos ejemplares (160 g $\pm$ 10 g de peso medio) de trucha arcoíris, obtenidos de un criadero local (Parque Nacional El Cajas, Cuenca, Ecuador), se mantuvieron en tanques de 750 litros (L) y se alimentaron con una dieta comercial a una tasa del 3%, directamente proporcional a la biomasa total, durante al menos 15 días antes de iniciar el experimento. Los animales se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas de luz a 12 horas de oscuridad y a una temperatura de 4°C. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (España) y analizados en el Laboratorio Biomolecular de O&U (Ecuador).

4.2. Preparación del pienso y exposición al plomo.

Para los tratamientos experimentales se utilizó una dieta comercial estándar para trucha (S-400). La suplementación se realizó con S-400 mezclado con aceite Omega 3 (Nature's Life®) y polvo metálico de plomo (TMMEDIA®), obteniéndose tres dietas suplementadas: i) Dieta control (dieta con 0 mg de plomo kg^{-1}); ii) Dieta 120 (dieta con 120 mg de plomo kg^{-1}), y iii) Dieta 240 (dieta con 240 mg de plomo kg^{-1}). Los peces fueron seleccionados aleatoria y posteriormente divididos en seis tanques (12 peces en cada tanque, 750 L). Se establecieron tres grupos experimentales por duplicado de la siguiente manera: i) Grupo no expuesto (control) alimentado con dieta con 0 mg de plomo kg^{-1} ; ii) Expuesto a 120 mg de plomo kg^{-1} ; y iii) Expuesto a 240 mg de plomo kg^{-1} . Los animales fueron alimentados con dietas

experimentales a una tasa del 3% durante el experimento. Los animales fueron mantenidos con las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura descritas en la sección 4.1.

4.3. Toma de muestras.

Se tomaron muestras de seis ejemplares de cada tanque después de 15 y 21 días de prueba. Se dejaron en ayunas durante 24 horas antes del muestreo y después de una dosis de aceite de clavo (20 mg L^{-1} , Eufar®), se sacrificaron. Las muestras de sangre para el análisis hematológico se obtuvieron puncionando directamente en la vena de la cola de los peces según el protocolo de Lawrence et al. [175] con una aguja calibre 21, jeringa de 3 mL, en tubo MiniCollect® tapa morada con EDTA k3, y el análisis bioquímico se recolectó en un tubo MiniCollect® tapa roja con aditivo activador de la coagulación. Este procedimiento duró menos de 60 segundos para evitar estrés en los especímenes. Posteriormente, se recolectó el suero después de la centrifugación ($10,000 \times g$ por 5 min, 4°C , Centrífuga Horizon Modelo 755VES). Se recolectó y pesó el hígado y el bazo para la determinación de los índices organosomáticos. Se recogieron muestras de hígado, bazo y RC de todos los especímenes mediante disección en un tubo Eppendorf libre de ARNasa. Estos tejidos se almacenaron a -80°C y se enviaron al laboratorio para su posterior análisis de expresión génica.

4.4. Determinación de índices organosomáticos.

Se pesó todo el cuerpo, el hígado y el bazo. El índice organosomático (OSI) para estos tejidos se calculó utilizando la siguiente fórmula según Guardiola et al. [176]: $\text{OSI} = (\text{g tejido g}^{-1} \text{ cuerpo}) \times 100$.

4.5. Ensayo hematológico.

Las muestras de sangre se mantuvieron a una temperatura constante de 4°C durante toda la evaluación integral de los parámetros sanguíneos totales. La cuantificación de glóbulos rojos (GR) y glóbulos blancos (GB), así como la determinación del hematocrito (Hct) y la hemoglobina (Hb), se evaluó utilizando el equipo Sysmex XT-2000i (empleando citometría de flujo fluorescente y un enfoque hidrodinámico), utilizando un volumen total de $10 \mu\text{L}$. Para asegurar tanto la integridad del experimento como la confiabilidad del equipo, se instituyeron controles de calidad. Esto abarcó evaluaciones preliminares de calidad en los

niveles 1 (bajo), 2 (medio) y 3 (alto) para examinar los perfiles hematológicos de los peces no expuestos y expuestos. El propósito de estas evaluaciones de calidad fue corroborar la precisión, tanto dentro de cada iteración como en todos los lotes de reactivos.

Se realizó un análisis manual en muestras específicas que mostraron patrones inusuales o cambios significativos, siguiendo las recomendaciones técnicas de Grant [177]. En el caso de los GR, las células se contaron en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio (Zeiss) con una dilución de 1:200 en solución diluyente de reactivo de Hayem. El recuento de GB se realizó utilizando una cámara de Neubauer y una pipeta Shali, empleando una dilución de 1:20 con reactivo de Turck (ácido acético glacial). Los valores de Hct se determinaron por la técnica de centrifugación de microhematocrito, utilizando una centrífuga Presvac-CMH-28 ($3.000 \times g$, 5 minutos, 4°C). Los niveles de Hb se midieron utilizando la técnica de ciano-metahemoglobina. Para esto, se mezclaron 10 μL de sangre completa con 2,5 mL de reactivo de ferricianuro de potasio, y la absorbancia de la mezcla resultante se midió a una longitud de onda de 540 nm en el instrumento MINDRAY BA-88A. Índices hematimétricos: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (HCCM) se calcularon según Mohammadian et al. [178], de la siguiente manera:

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = (\text{Hct/GR}) \times 10.$$

$$\text{HCM } (\text{pg. cel}^{-1}) = (\text{Hb/GR}) \times 10.$$

$$\text{HCCM } (\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}) = (\text{Hb/Hct}) \times 100.$$

4.6. Ensayo bioquímico.

Química analítica en suero se determinó mediante la técnica colorimétrica enzimática utilizando el equipo de inmunoensayo (Cobas Hitachi c311) y reactivos marca Roche. El volumen de muestra utilizado, y la medición de los analitos (absorbancia) es la siguiente: glucosa (GLU, 20 μL , 340/378 nm), colesterol (CHO, 15 μL , 700/505 nm), bilirrubina total (BILT, 2 μL , 552/505 nm), 629 nm), bilirrubina directa (BILD, 6.7 μL , 800/546 nm), aspartato aminotransferasa (TGO, 11 μL , 340/378 nm), alanina aminotransferasa (TGP, 9 μL , 700/340 nm). Previo a los experimentos antes mencionados, la calibración y control del instrumento se realizó con el Calibrador F.A.S. más agua desionizada en una proporción de

1:26. Todos los analitos fueron determinados según las guías publicadas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [179].

4.7. Lisis tisular y aislamiento de ARN.

Para la lisis tisular y extracción de ARN se utilizó el SV Total RNA Isolation System de Promega. Para ello se transfirió 1 mL de buffer de lisis de ARN (con BME añadido) al tubo destinado a la muestra de tejido. El tejido se añadió al tubo que contenía el buffer de lisis de ARN. El tejido se homogeneizó a alta velocidad con un homogeneizador Gemmy Modelo VRN-200 hasta que no quedaran fragmentos visibles de tejido. La masa del tejido se calculó restando el peso obtenido del tubo buffer de lisis de ARN (previamente pesado), obteniendo una relación entre la masa del tejido y el buffer de lisis de ARN que fue de 169 mg mL⁻¹. Posteriormente se tomaron 175 µL del lisado tisular y se añadieron 350 µL de buffer de dilución de ARN. Después de mezclar, se sometió a 70°C con la ayuda de un baño de agua WNB 14 Memmert durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000 x *g* durante 10 min. La extracción de ARN se realizó según el protocolo del fabricante. Un microgramo de ARN total se trató con DNasa I para eliminar el ADN genómico. La concentración y pureza del ARN (260/280 y 260/230) se cuantificaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.8. Retrotranscripción de ARN total a ADNc.

La transcripción inversa del ácido ribonucleico (ARN) purificado (1 µg) se realizó utilizando el kit ipsogen® RT Handbook siguiendo los pasos a continuación, se incubó a 65 °C en un baño de agua WNB 14 Memmert por 5 min, luego se dejó enfriar por 5 min y luego se centrifugó por 1 min a 12,000 x *g*, se mantuvo en hielo. Luego, se añadieron 15 µL de premezclada de transcripción inversa compuesta por los siguientes volúmenes: 5 µL de buffer 5x, 2 µL de dNTPs (10 mM cada uno), 5.25 µL de nonámero aleatorio (100 µM), 0.5 µL de inhibidor de ARNasa (40 U µL⁻¹), 1 µL de la enzima transcriptasa inversa (200 U µL⁻¹) y 1.25 µL de DTT, según lo indicado por el fabricante. La reacción de transcripción inversa se realizó durante 1 h 20 min, en un ciclador térmico SimpliAmp. El ADNc así obtenido se almacenó a -20 °C en espera de su análisis mediante una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.

4.9. Diseño y eficiencia de los cebadores.

Los cebadores elegidos se obtuvieron de la revisión de la literatura y se confirmaron en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los primers utilizados para este estudio tienen una eficiencia mayor al 95% (**Tabla 5**), y fueron optimizados tanto en temperatura como en concentración. Las temperaturas (55, 58 y 61°C), y las concentraciones (250, 375, 500 y 625 nM) fueron testeadas con PCR en tiempo real utilizando SYBR green con 50 ng de cDNA, la especificidad de los productos de cada par de primers también fue validada ya que solo se presentó un pico en el análisis de la curva de melting.

4.10. Análisis cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos utilizando el Applied Biosystems 7500. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y, en relación con los genes de desintoxicación, cada reacción consistió en 1.2 µL de ADNc, 8 µL de Fast Gene IC Green 2 x qPCR Universal Mix, 5.6 µL de agua libre de nucleasas (Invitrogen) y 0.6 µL para cada cebador en un volumen de reacción total de 16 µL para *cyp2m1*, para el resto de los genes, se utilizó un volumen de 0.8 µL de cebador. Las condiciones de PCR fueron las siguientes. Para los genes *cyp2m1* y *cyp3a27*: 95 °C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 30 s. Para los genes *β-actin*, *mt-b*, *cyp1a* y *cyp2k1*: 95 °C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 20 s, 61 °C durante 30 s. Finalmente, para el gen *mt-a*: 95 °C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 20 s, 58 °C durante 30 s. Se realizó una curva de fusión inmediatamente al final de los ciclos para verificar la especificidad de la amplificación. Para los genes de inflamación (*eflα*, *il-21*, *tnf-α*, *ifn1* e *il-6*) la mezcla de reacción estuvo compuesta por 10 µL de SYBR, 1 µL de ADNc (equivalente a 1.0 ng de ARN total con una concentración inicial de 100 ng µL⁻¹), 0.5 µL de primers directo e inverso, respectivamente, y 8 µL de agua ultrapura (Invitrogen) que se añadieron a un volumen final de 20 µL. El protocolo de ciclado térmico fue de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 10 s a 95 °C y 1 min a 60 °C y un ciclo de disociación (1 min a 95 °C y 1 min a 60 °C). El ciclo umbral (TC) se determinó manualmente para cada ejecución. El *eflα* al igual que la *β-actin* se utilizaron como genes de mantenimiento en cada muestra de ARN para eliminar la variación en la cuantificación del ARNm/ADNc.

4.11. Análisis estadístico.

Los datos se representan como la media aritmética acompañada del error estándar de la media (SEM). Se usó el análisis de varianza bifactorial (ANOVA) para evaluar la influencia de las concentraciones de plomo en la dieta (0, 120 y 240 mg kg dieta⁻¹) a los 15 y 21 días. Para las comparaciones post-hoc, se utilizó la prueba de Tukey. Las correlaciones entre genes se exploraron utilizando RStudio® (versión 4.0.3), mientras que se eligió GraphPad Prism (versión 9.5.1) para un mayor escrutinio estadístico y representación gráfica. Se respetó un umbral de significancia de $p \leq 0,05$ para todas las pruebas.

Table 5. Primers usados para (RT-qPCR).

Gen	Abreviatura Gen	Primers (F: cebador directo, R: cebador inverso)	Eficiencia	Genbank
Beta-actina	<i>β-actin</i>	F: GACCCAGSTCATGTTTGAGACCTT R: CGTAGCCCTCGTAGATGGGTA	99%	AJ438158
Factor de elongación 1-alfa	<i>ef1α</i>	F: CAAGGATATCCGTCGTGGCA R: ACAGCGAAACGACCAAGAG	100%	AF498320
Metalotionina A	<i>mt-a</i>	F: ATCCTGCAAGTGCTCCAAC R: ACAAAGCTATGCTCAAGATGG	105%	X59395.1
Metalotionina B	<i>mt-b</i>	F: ATCCTGCAAGTGCTCAAAC R: ATGACTGCATTGTACGGTA	98%	M18104
Citocromo 1A	<i>cyp1a</i>	F: AGTGATGAGTTTGGGCAGGT R: TCACGGATGTTGTCCTTGTC	101%	AF015660.1
Citocromo 2K1	<i>cyp2k1</i>	F: CTCACACCACCAGCCGAGAT R: CTTGACAAATCCTCCCTGCTCAT	97%	AF0455053
Citocromo 2M1	<i>cyp2m1</i>	F: GCTGTATATCACACTCACCTGCTTTG R: CCCCTAAGTGCTTTGCATGTATAGAT	99%	OMU16657
Citocromo 3A27	<i>cyp3a27</i>	F: TCTGCTGATGCCCAAACGA R: CGTTGTTGGACTCTTCAGAGTGGTA	96%	OMU96077
Interleucina 21	<i>il-21</i>	F: GGATGCAGACAAGGGTGAGAG R: CCTTTTGAAGCAGAGATCCCAACT	98%	FM883702
Factor de Necrosis tumoral-alfa	<i>tnf-α</i>	F: CGCTGACACAGTGCAGTGGA R: TCCCCGATGGAGTCCGAATA	99%	NM_001124357.1
Interferon 1	<i>inf 1</i>	F: GCCCAGTCCTTTTCCCAAC R: CCTCTCAGGTTTCATGGCAGGT	105%	AJ580911.2
Interleucina 6	<i>Il-6</i>	F: TTTCAGAAGCCCGTGGAAGAGA R: TCTTTGACCAGCCCTAATCAGCA	98%	NM_001124657.1

5. Resultados.

5.1. Índices organosomáticos.

Los índices organosomáticos del hígado y el bazo medidos en peces no expuestos y expuestos a Pb por dieta no mostraron variaciones entre los grupos experimentales y los tiempos de exposición (**Figura 4**).

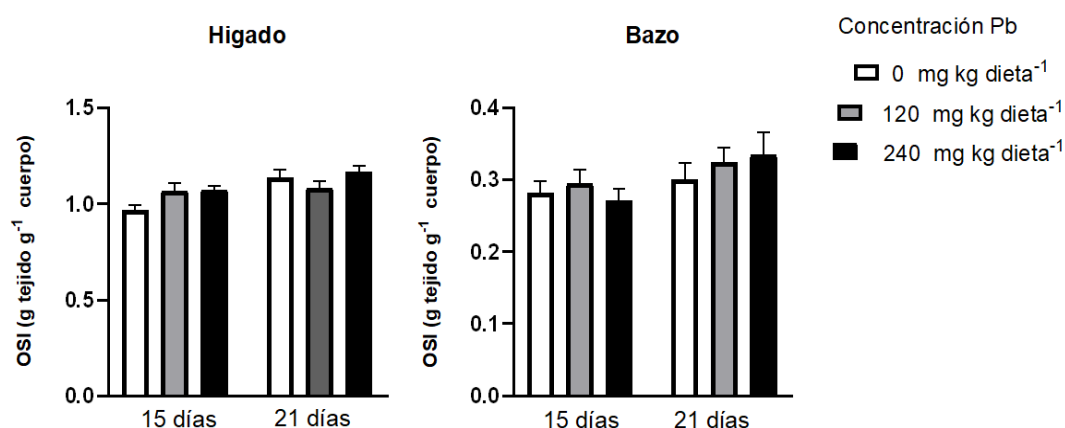


Figura 4. Índices organosomáticos en el hígado y en el bazo de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dieta con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.) para cada grupo experimental (n = 12).

5.2. Parámetros sanguíneos.

5.2.1. Ensayo hematológico.

Análisis hematológicos realizados en sangre completa de trucha arcoíris se representan en la **Tabla 6**. Los valores de GR disminuyeron en la sangre de los peces expuestos a la concentración de plomo más alta (240 mg kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos y los expuestos a 120 mg kg dieta⁻¹ a los 15 días del experimento. Además, los valores de glóbulos rojos disminuyeron en los peces expuestos en comparación con los valores encontrados en los peces no expuestos a los 21 días. Por el contrario, el número de GB aumentó en los peces alimentados con dieta de Pb en comparación con los peces no expuestos a los 15 y 21 días. Por otro lado, a los 15 y 21 días del experimento se observó una disminución en los valores de Hb y Hct en los peces alimentados con dieta de Pb en comparación con los valores encontrados en los peces no expuestos. De la misma manera, disminución de los valores de Hb y Hct observados a los 15 días de recorrido en peces

expuestos a la concentración más alta 240 mg kg dieta⁻¹, fueron observados con respecto a los peces alimentados con dieta de 120 mg kg dieta⁻¹.

En el caso de MCH, los valores disminuyeron en los peces alimentados con 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los resultados observados en peces no expuestos a los 15 días de ensayo. Sin embargo, el patrón opuesto se observó a los 21 días, donde los valores de MCH aumentaron en los peces alimentados con mayor concentración de Pb en comparación con los peces no expuestos. El parámetro MCV mostró una disminución en los peces alimentados con dietas de Pb a los 15 días en comparación con los peces no expuestos. Por el contrario, los valores de MCV aumentaron en los peces expuestos a Pb en comparación con los no expuestos a los 21 días. Los valores de MCHC incrementaron en la sangre de los peces alimentados con mayor concentración de Pb (240 mg kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos a los 15 días del experimento. No se observaron variaciones de los valores de MCHC a los 21 días.

Considerando el factor tiempo, los valores de GR no mostraron variaciones en los peces alimentados con mayor concentración de Pb. Sin embargo, en los peces expuestos a 120 mg kg dieta⁻¹ muestran una disminución, mientras que en los peces no expuestos se observó un aumento en los valores de GR entre los 15 y 21 días. En el caso del número de GB, los valores no variaron con el tiempo en todos los grupos experimentales. Curiosamente, los valores de Hb y Hct disminuyeron en los peces alimentados con la menor concentración de Pb (120 mg kg dieta⁻¹) entre los 15 y 21 días. Sin embargo, los valores de Hb y Hct en los peces no expuestos y peces expuestos a 240 mg kg dieta⁻¹ no mostraron variaciones considerando el factor tiempo. Por otra parte, se observó una disminución en los valores de MCH en los peces no expuestos a los 21 días en comparación con los valores encontrados a los 15 días, mientras que los peces alimentados con plomo (dieta 120 y 240), no mostraron variaciones. Los valores de MCV disminuyeron en los peces no expuestos y los peces expuestos a la concentración más baja de Pb entre los 15 y 21 días. Sin embargo, en peces expuestos a la dieta 240, se observó un aumento de los valores de MCV con el tiempo. En el caso de MCHC, los valores disminuyeron a los 21 días en comparación con los valores encontrados a los 15 días en los peces alimentados con una mayor concentración de Pb (240 mg kg dieta⁻¹), mientras que no se encontraron cambios en los peces no expuestos y los peces expuestos a la baja concentración.

Tabla 6. Parámetros hematológicos medidos en la sangre de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dieta con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los valores representan la media ± error estándar de la media (S.E.M.) (n = 6). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos experimentales (P ≤ 0,05).

Parámetros	Concentración de Pb [mg kg dieta ⁻¹]	15 días	21 días
		Mean ± SEM	Mean ± SEM
GR [10 ⁶ µL ⁻¹]	0	1.10 ± 0.04 ^a	1.40 ± 0.04 ^{a*}
	120	1.07 ± 0.04 ^a	0.67 ± 0.04 ^{b*}
	240	0.64 ± 0.04 ^b	0.58 ± 0.04 ^b
GB [10 ³ µL ⁻¹]	0	151.81 ± 4.69 ^a	150.80 ± 4.69 ^a
	120	168.26 ± 4.69 ^b	166.60 ± 4.69 ^b
	240	177.09 ± 4.69 ^b	174.08 ± 4.69 ^b
Hb [g dL ⁻¹]	0	11.74 ± 0.21 ^a	12.36 ± 0.21 ^a
	120	10.71 ± 0.21 ^b	6.46 ± 0.21 ^{b*}
	240	6.17 ± 0.21 ^c	6.03 ± 0.21 ^b
Hct [%]	0	22.78 ± 0.46 ^a	23.47 ± 0.46 ^a
	120	20.00 ± 0.46 ^b	12.29 ± 0.46 ^{b*}
	240	11.37 ± 0.46 ^c	11.83 ± 0.46 ^b
MCH [pg cell ⁻¹]	0	107.43 ± 3.08 ^a	92.12 ± 3.08 ^{a*}
	120	101.12 ± 3.08 ^{ab}	96.47 ± 3.08 ^{ab}
	240	97.29 ± 3.08 ^b	104.17 ± 3.08 ^b
MCV [µm ³]	0	208.00 ± 6.05 ^a	174.23 ± 6.05 ^{a*}
	120	189.29 ± 6.05 ^b	183.43 ± 6.05 ^{b*}
	240	180.23 ± 6.05 ^b	204.52 ± 6.05 ^{b*}
MCHC [g 100 mL ⁻¹]	0	51.78 ± 1.00 ^a	52.80 ± 1.00 ^a
	120	53.54 ± 1.00 ^{ab}	52.73 ± 1.00 ^a
	240	54.44 ± 1.00 ^b	51.02 ± 1.00 ^{a*}

GR = glóbulos rojos; GB = glóbulos blancos; Hb = hemoglobina; Hct = hematocrito; MCH = hemoglobina corpuscular media; MCV = volumen corpuscular medio; MCHC = concentración de hemoglobina corpuscular media.

5.2.2 Ensayo bioquímico.

Entre los biomarcadores de química analítica, los valores de GLU aumentaron después de 15 días en los peces expuestos a la concentración de 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos y expuestos a la concentración de 120 mg de Pb kg dieta⁻¹. Por el contrario, se observó una disminución de los valores de GLU en los peces expuestos a la mayor concentración de plomo (240 mg kg dieta⁻¹) a los 21 días (**Figura 5A**). En el caso del COL los valores aumentaron en los peces alimentados con 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los resultados observados en los peces no expuestos y los peces expuestos a la

concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ a los 15 días. A los 21 días, los valores de colesterol aumentaron en los peces alimentados con 120 mg de Pb kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos y los peces expuestos a la concentración de 240 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 5B**). A los 15 días, los resultados de BILT aumentaron en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb en comparación con los peces no expuestos (**Figura 5C**).

En el caso de los valores de BILD, estos aumentaron a los 15 días del experimento en los peces expuestos a la concentración más alta (240 mg de Pb kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos (**Figura 5D**). A los 21 días, los valores de BILT y BILD siguieron el mismo patrón y no se observaron variaciones entre el grupo experimental. Por otro lado, los valores de TGO aumentaron en los peces expuestos a la mayor concentración de Pb (240 mg kg dieta⁻¹) a los 15 días, mientras que a los 21 días los valores de TGO aumentaron en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb en comparación con los peces no expuestos (**Figura 5E**). A los 15 días del experimento, los valores de TGP disminuyeron en los peces expuestos a la concentración más alta (dieta 240) en comparación a los peces no expuestos y expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹. Sin embargo, los valores de TGP disminuyeron en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb en comparación con los peces no expuestos a los 21 días (**Figura 5F**).

Considerando el factor tiempo, los valores de GLU disminuyeron en los peces expuestos a la mayor concentración de Pb (240 mg kg dieta⁻¹) en comparación a los peces no expuestos y peces expuestos a la dieta 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 5A**). Por el contrario, los valores de COL aumentaron con el tiempo en los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ en comparación a los peces no expuestos y peces expuestos (dieta 240) (**Figura 5B**). En el caso de los parámetros BILT y BILD los valores aumentaron, en todos los grupos experimentales entre 15 y 21 días (**Figuras 5C y 5D**). En la misma línea, los peces expuestos y peces no expuestos mostraron un aumento en los valores de TGO a lo largo del tiempo (**Figura 5E**). Sin embargo, los valores de TGP disminuyeron en los peces no expuestos y en los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ a lo largo del tiempo, mientras que no se observaron variaciones en los peces expuestos a la mayor concentración de Pb (**Figura 5F**).

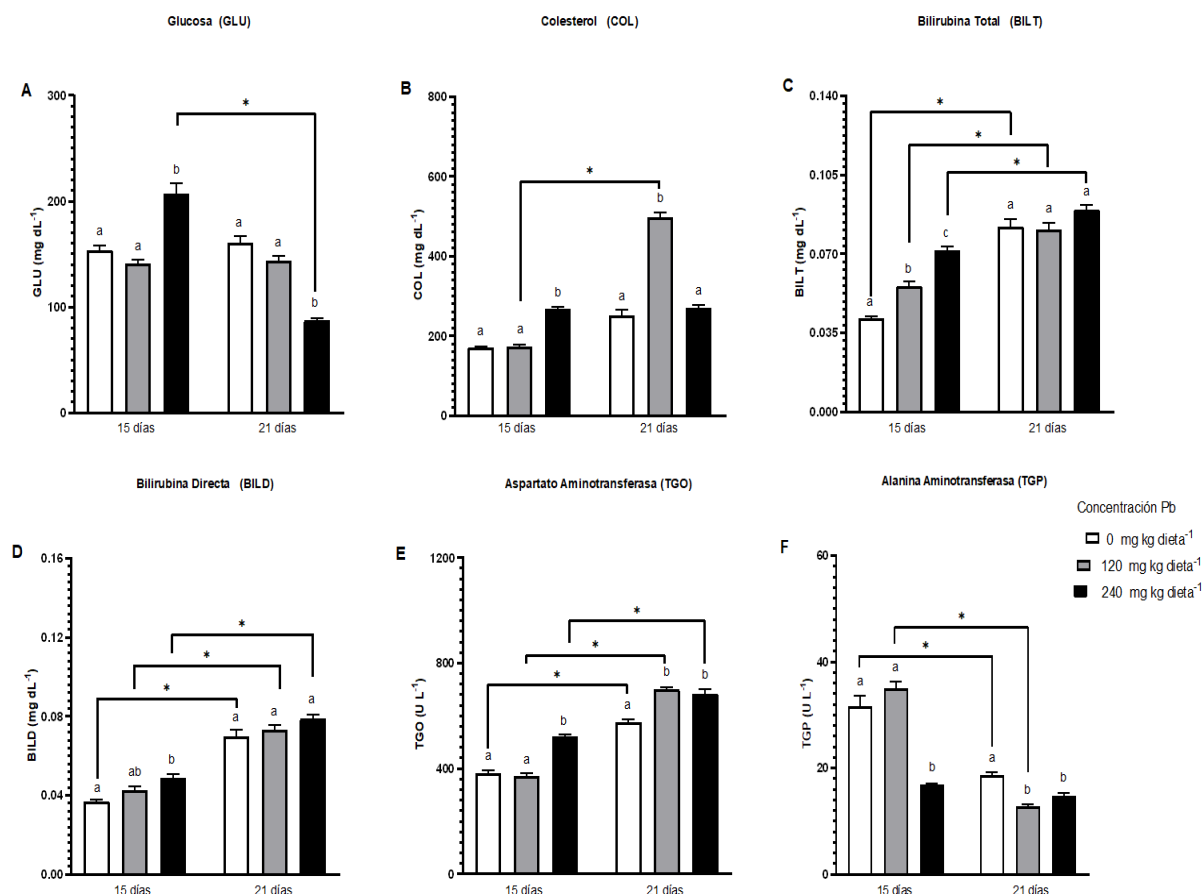


Figura 5. A) Niveles de glucosa (GLU, mg dL⁻¹); B) Niveles de colesterol (COL, mg dL⁻¹); C) Niveles de bilirrubina total (BILT, mg dL⁻¹); D) Niveles de bilirrubina directa (BILD, mg dL⁻¹); E) Niveles de aspartato aminotransferasa TGO, U L⁻¹; y F) Niveles de alanina aminotransferasa (TGP, U L⁻¹); en suero de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dieta con 0 (no expuesta, grupo de control), 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (S.E.M.) para cada grupo (n = 12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA de dos vías, p ≤ 0,05).

5.3. Expresión genética.

El análisis de la expresión genética indicó que la exposición de la trucha arcoíris al Pb indujo variaciones significativas en los genes seleccionados. En el hígado, los niveles de expresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27* se sobreexpresaron en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb (120 y 240 mg kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos a los 15 y 21 días (**Figura 6**). Sin embargo, se observaron algunas variaciones significativas entre los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb. Más específicamente, a los 15 y 21 días, los niveles de expresión de los genes *mt-a*, *cyp1a* y

cyp2k1 se sobreexpresaron en los peces expuestos a la concentración de 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos y los peces expuestos a 120 mg kg dieta⁻¹. (**Figuras 6A, 6C y 6D**). Por otra parte, los niveles de expresión de los genes *mt-b* y *cyp2m1* se sobreexpresaron en los peces expuestos a concentraciones de Pb de 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos en el grupo experimental de 15 días. Sin embargo, a los 21 días *mt-b* y *cyp2m1* mostraron sobreexpresión en los peces alimentados con Pb a la concentración más alta en comparación con los peces no expuestos y los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figuras 6B y 6E**). En el caso de la expresión del gen *cyp3a27* a los 15 días, mostró un incremento en sus niveles en peces alimentados con ambas concentraciones de Pb en comparación con peces no expuestos. En el tiempo experimental de 21 días, la expresión de *cyp3a27* disminuyó en peces expuestos a la concentración de 240 mg kg dieta⁻¹ comparado con los peces expuestos a la dieta de 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 6F**).

En el bazo (**Figura 7**) y en el RC (**Figura 8**), los niveles de expresión de los genes *il-21*, *tnf-α*, *inf-1* e *il-6* se sobreexpresaron en peces alimentados con ambas dietas de Pb en comparación con los peces no expuestos en ambos tiempos experimentales. Destacamos que, en el bazo, los niveles de expresión del gen *il-21* incrementó después de 15 días en peces expuestos a la concentración de 120 mg kg de dieta⁻¹ en comparación con peces no expuestos y peces expuestos a la concentración de 240 mg kg de dieta⁻¹. Igualmente, a los 21 días, se observó una expresión incrementada del gen *il-21* en peces expuestos a la concentración de 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ y peces no expuestos (**Figura 7A**). A los 15 y 21 días, los niveles de expresión de los genes *tnfa*, *inf-1* e *il-6* mostraron el mismo patrón de sobreexpresión en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb (120 y 240 mg kg dieta⁻¹) en comparación con los peces no expuestos (**Figuras 7B, 7C y 7D**).

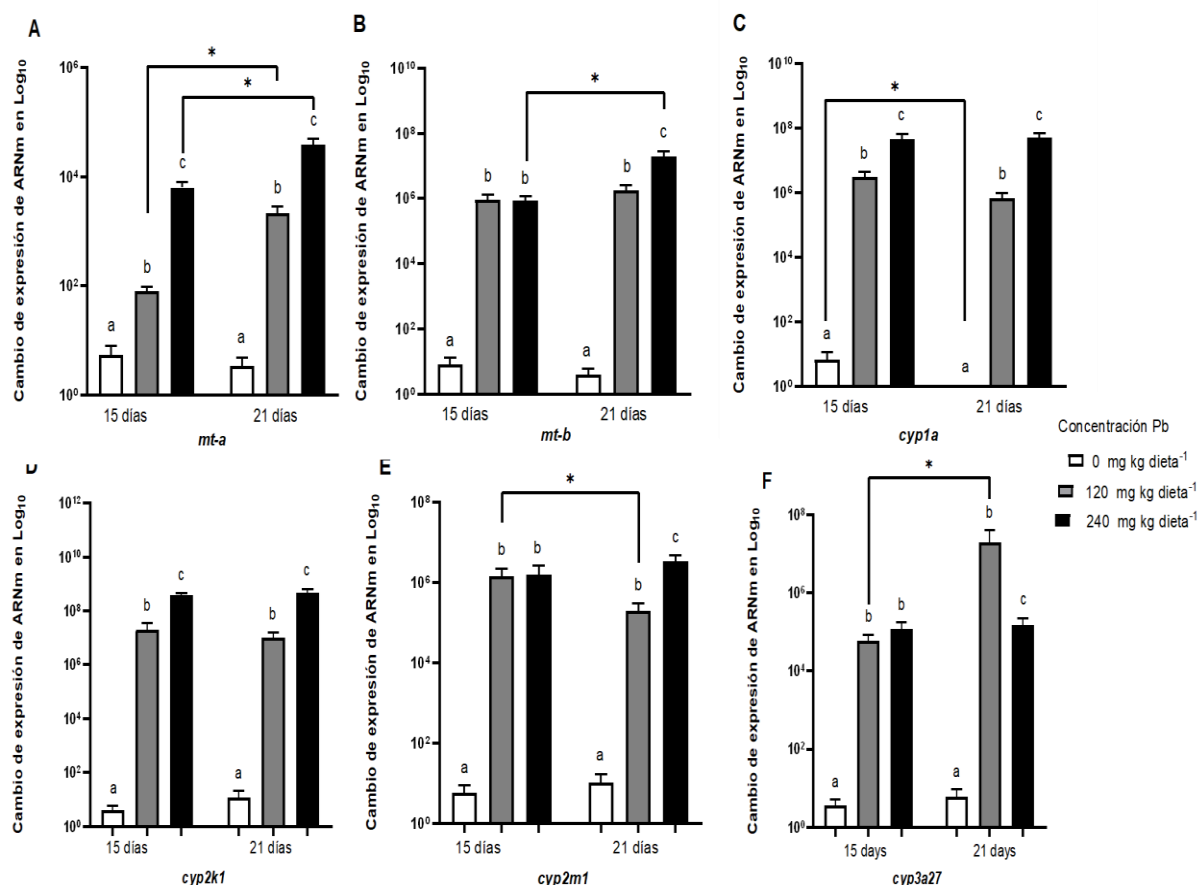


Figura 6. Expresión de genes: A) Metalotioneína A (*mt-a*); B) Metalotioneína B (*mt-b*); C) Citocromo 1A (*cyp1a*); D) Citocromo 2K1 (*cyp2k1*); E) Citocromo 2M1 (*cyp2m1*); y F) Citocromo 3A27 (*cyp3a27*); en el hígado de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con una dieta con 0 (no expuesta, grupo de control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.) para cada grupo (n = 12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA de dos vías, $p \leq 0,05$).

En RC, a los 15 y 21 días los niveles de expresión de los genes *il-21* e *il-6* mostraron un incremento en los peces expuestos a concentraciones de 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ con respecto a los peces no expuestos (**Figuras 8A y 8D**). En el caso de *tnfa* e *inf-1*, los niveles de la expresión mostraron un incremento en los peces alimentados con 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ en comparación con las expresiones observadas en los peces no expuestos y en los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ a los 15 días de ensayo (**Figuras 8B y 8C**). Por el contrario, se observó que la expresión de *tnfa* a los 21 días disminuyó en los peces alimentados con la mayor concentración de Pb (dieta 240) en comparación con los peces expuestos a la concentración de más baja (120 mg kg dieta⁻¹) (**Figura 8B**). A los 21 días el gen *inf-1* mostró incremento de sus niveles de expresión en los peces expuestos tanto a

la dieta 120 mg kg dieta⁻¹ como a la dieta 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación de los peces no expuestos (**Figuras 8C**).

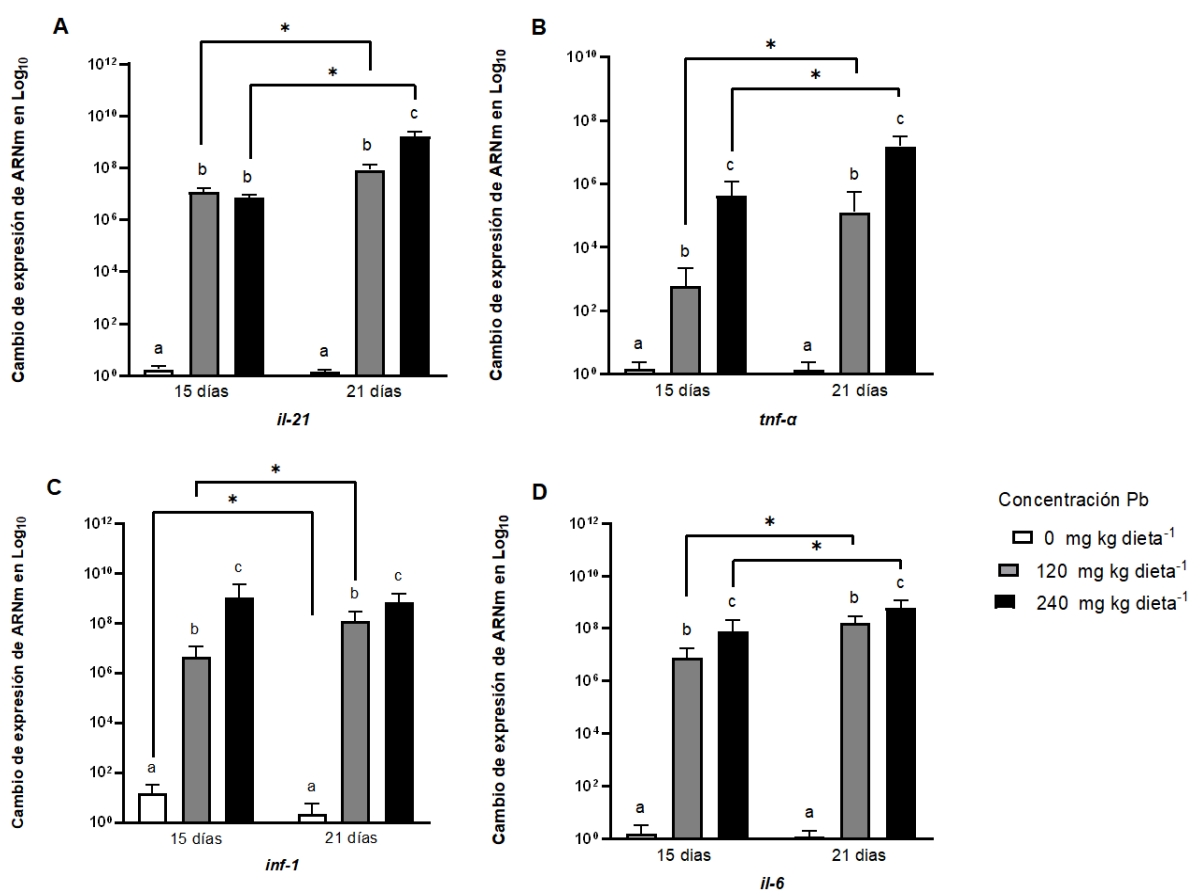


Figura 7. Expresión de genes: **A)** Interleucina 21 (*il-21*), **B)** factor de necrosis tumoral (*tnfr-a*); **C)** Interferón 1 (*inf 1*); **D)** Interleucina 6 (*il-6*); en el bazo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con una dieta con 0 (no expuesta, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.) para cada grupo (n = 12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA de dos vías, $p \leq 0,05$).

Considerando el factor tiempo en el hígado, los niveles de expresión del gen *mt-a* incrementó con el tiempo en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb dietas 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación a peces no expuestos (**Figura 6A**). Por otro lado, el gen *mt-b* se sobreexpresó en peces expuestos a la mayor concentración de Pb (240 mg kg dieta⁻¹) entre los 15 y 21 días de ensayo en comparación a peces no expuestos y peces expuestos a la concentración de Pb 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 6B**). Los niveles de expresión de los genes *cyp2m1* y *cyp3a27* se incrementó y disminuyó, respectivamente, en los peces expuestos a la menor concentración de Pb (dieta 120) con el tiempo (**Figuras 6E y 6F**). En el caso del gen *cyp1a*, la expresión disminuyó (**Figuras 6C**), en los peces no expuestos (control) entre 15 y 21 días. El gen *cyp2k1* no mostró variaciones en su expresión a lo largo del tiempo (**Figura**

6D). En el bazo, la expresión de los genes *il-21*, *tnfa* e *il-6* aumentó en peces expuestos a ambas concentraciones de Pb (dietas 120 y 240) en comparación a peces no expuestos (**Figuras 7A, 7B y 7D**). Sin embargo, la expresión del gen *inf-1* disminuyó en los peces no expuestos entre los días 15 y 21 del ensayo, mientras que niveles de expresión aumentaron en los peces expuestos a la concentración de Pb 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 7C**). En RC, la expresión del gen *il-21* aumentó en los peces expuestos a 120 mg kg dieta⁻¹ a lo largo del tiempo en comparación a los peces no expuestos y peces expuestos a la mayor concentración de Pb (**Figura 8A**). Los niveles de expresión de *tnfa* e *inf-1* aumentó en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb con respecto a los peces no expuestos (**Figuras 8B y 8C**). En el caso del gen *il-6*, la expresión disminuyó en los peces no expuestos (**Figura 8D**), mientras que no se observaron variaciones en los peces expuestos a Pb.

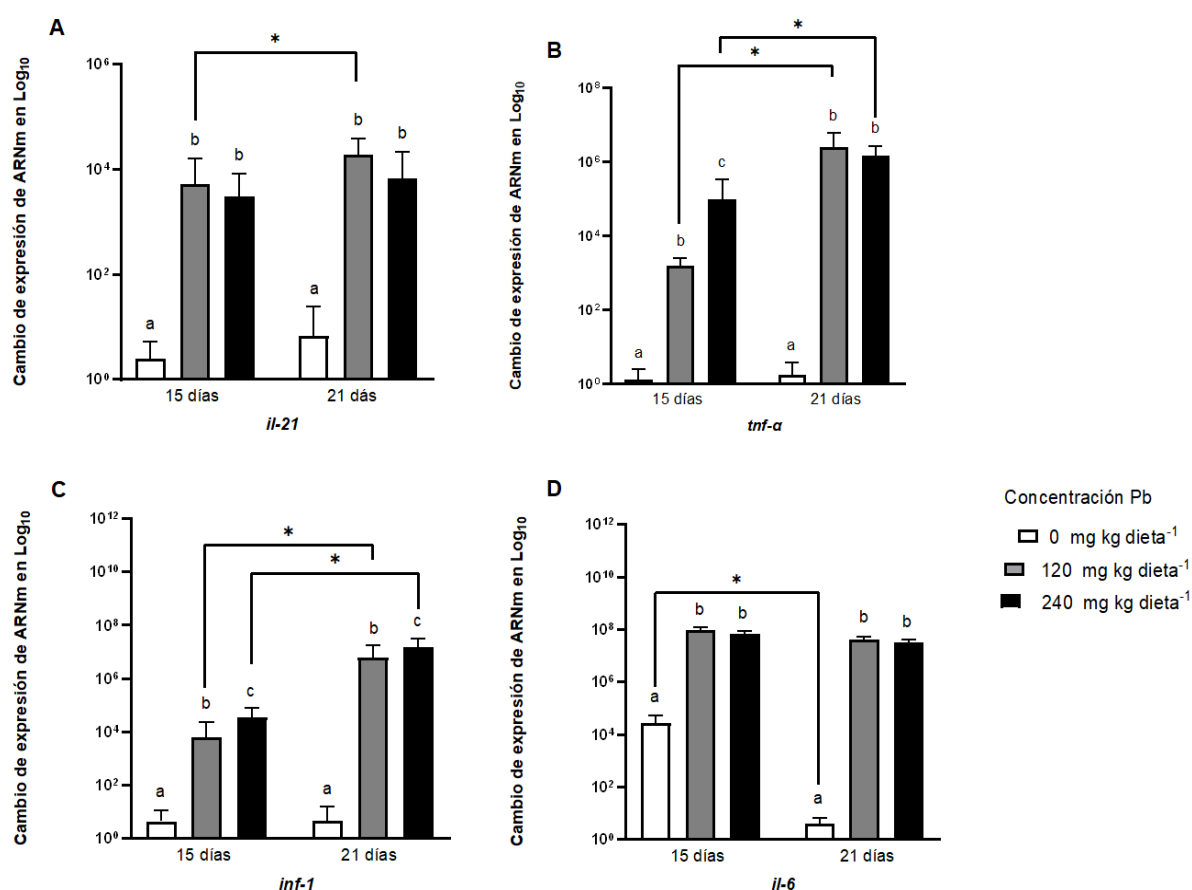


Figura 8. Expresión de genes: **A)** Interleucina 21 (*il-21*), **B)** factor de necrosis tumoral (*tnf-α*); **C)** Interferón 1 (*inf 1*); **D)** Interleucina 6 (*il-6*); en RC de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dieta con 0 (no expuesta, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (S.E.M.) para cada grupo (n = 12). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA de dos vías, p ≤ 0,05).

5.4. Correlación genética.

En cuanto a los análisis de correlación, la dieta con Pb mostró una correlación positiva con la expresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27* en el hígado. Sin embargo, estas correlaciones positivas fueron significativas en el caso de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1* y *cyp2m1*. Además, se encontraron correlaciones positivas significativas de la siguiente manera: *mt-a* con *mt-b*, *cyp2k1* y *cyp2m1*; *mt-b* con *cyp2m1*; y *cyp1a* con *cyp2k1* y *cyp2m1* (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para parámetros relacionados con el hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) después de 15 y 21 días de exposición a 120 mg y 240 mg Pb kg dieta⁻¹. La tabla presenta los coeficientes de correlación, acompañados de intervalos de confianza. Los niveles de significancia se indican como *p ≤ 0,05 lo que indica correlaciones significativas entre las expresiones genéticas.

Variable	Pb-dieta	<i>mt-a</i>	<i>mt-b</i>	<i>cyp1a</i>	<i>cyp2k1</i>	<i>cyp2m1</i>	<i>cyp3a27</i>	tiempo
1. Pb-dieta	1							
2. <i>mt-a</i>	.45* [.24, .61]							
3. <i>mt-b</i>	.31* [.09, .51]	.54* [.36, .69]						
4. <i>cyp1a</i>	.44* [.23, .61]	.13 [-.10, .35]	.13 [-.10, .36]					
5. <i>cyp2k1</i>	.58* [.41, .72]	.28* [.05, .48]	.13 [-.10, .35]	.32* [.09, .51]				
6. <i>cyp2m1</i>	.36* [.14, .55]	.35* [.13, .54]	.40* [.18, .58]	.35* [.13, .54]	.18 [-.05, .40]			
7. <i>cyp3a27</i>	.00 [-.23, .23]	-.03 [-.26, .20]	-.03 [-.26, .20]	-.04 [-.27, .19]	-.05 [-.28, .18]	-.04 [-.27, .19]		
8. tiempo	.00 [-.23, .23]	.28* [.05, .48]	.24* [.01, .45]	.01 [-.22, .24]	.05 [-.18, .28]	.03 [-.20, .26]	.12 [-.12, .34]	1

Dieta con Plomo (Pb-dieta), Metalotioneína A (*mt-a*), Metalotioneína B (*mt-b*), Citocromo 1a (*cyp1a*), Citocromo 2K1 (*cyp2k1*), Citocromo 2M1 (*cyp2m1*), y Citocromo 3A27 (*cyp3a27*), tiempo.

En el bazo, la expresión de los genes *il-21*, *tnf-α*, *inf-1* e *il-6* se correlacionó de forma positiva y significativa con la dieta con Pb. Además, se detectaron correlaciones positivas

significativas entre: *il-21* con el gen *tnf- α* ; *tnf- α* con *il-6*; y *inf-1* con *il-6*. (**Figura 9**). En RC, los resultados indicaron que el plomo en la dieta se correlaciona de forma positiva y significativa con la expresión de los genes *il-21*, *inf-1* e *il-6*, mientras que la expresión de los genes *il-21* y *tnf- α* mostró una correlación positiva significativa entre ellos (**Figura 10**).

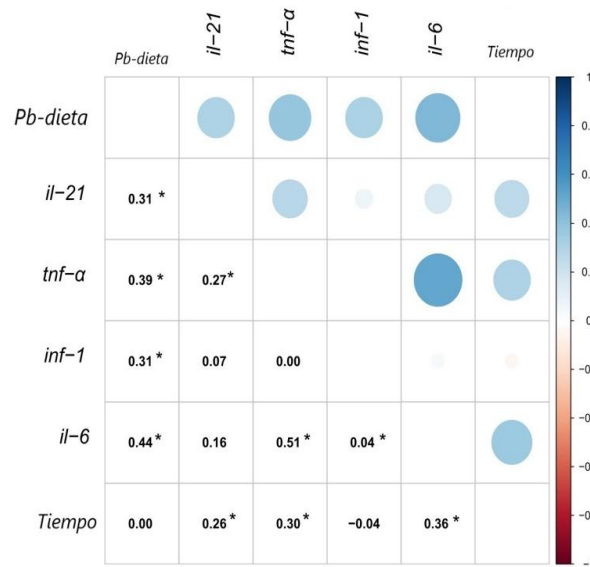


Figura 9. Mapa de calor que ilustra las correlaciones entre Dieta con Plomo = (Pb-dieta); Interleucina 21 (*il-21*); factor de necrosis tumoral α (*tnf- α*); Interferón 1 (*inf-1*); Interleucina 6 (*il-6*); y tiempo en el bazo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dieta con 0 (no expuesta, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. El gradiente de color representa los niveles de correlación genética, asociados con los valores más altos mostrados en azul y los valores más bajos en rojo oscuro. El gráfico se generó utilizando agrupamiento jerárquico (método 'ward.D') para ordenar las variables, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

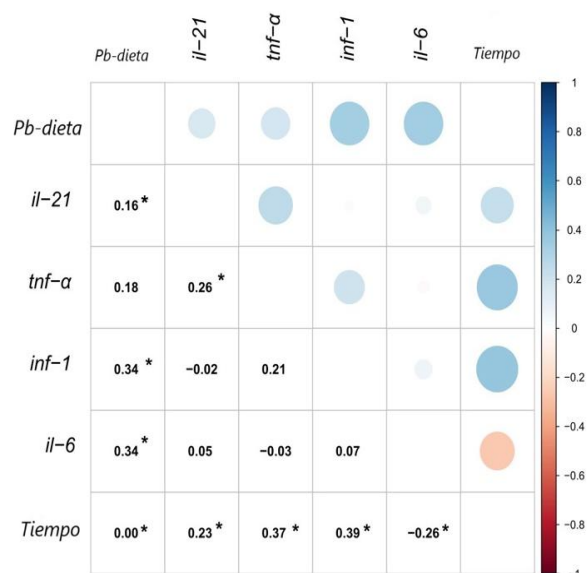


Figura 10. Mapa de calor que ilustra las correlaciones entre Dieta con Plomo = (Pb-dieta); Interleucina 21 (*il-21*); factor de necrosis tumoral α (*tnf-\alpha*); Interferón 1 (*inf 1*); Interleucina 6 (*il-6*); y tiempo en RC de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dieta con 0 (no expuesta, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. El gradiente de color representa los niveles de correlación genética, asociados con los valores más altos mostrados en azul y los valores más bajos en rojo oscuro. El gráfico se generó utilizando agrupamiento jerárquico (método 'ward.D') para ordenar las variables, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Considerando el factor tiempo, se observó una correlación positiva con la expresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27* en el hígado (**Tabla 7**). En el bazo, la expresión de los genes *il-21*, *tnf-\alpha* e *il-6* se correlacionó positivamente con el tiempo, aunque la expresión del gen *inf-1* tuvo una correlación negativa (**Figura 9**). En RC, la expresión de los genes *il-21*, *tnf-\alpha* e *inf-1* se correlacionó positivamente con el factor tiempo. Sin embargo, se observó una correlación negativa con la expresión del gen *il-6* (**Figura 10**).

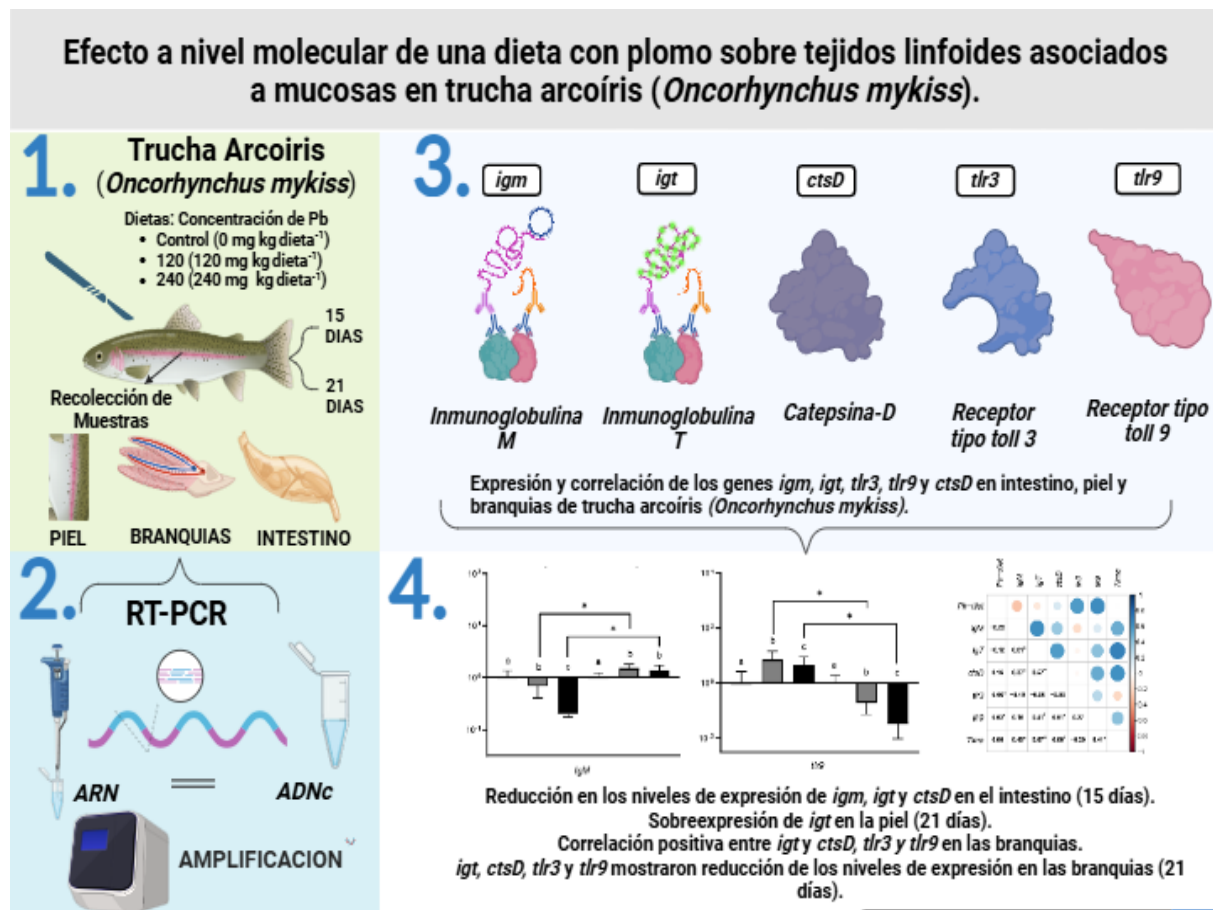
CAPÍTULO 2: Efecto a nivel molecular de una dieta con plomo sobre tejidos linfoides asociados a mucosas en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Resumen.

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) juega un papel primordial en las respuestas inmunitaria adaptativas y la defensa para mantener la salud de los peces frente a diferentes contaminantes, siendo el intestino, la piel y las branquias los principales órganos que lo conforman. Desafortunadamente, el efecto provocado por metales pesados en genes implicados en la respuesta inmunitaria de los teleósteos no ha sido suficientemente explorado. Por lo tanto, en este capítulo se estudió la respuesta inmunitaria del MALT en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dietas no suplementadas (grupo control) y suplementadas con plomo (120 y 240 mg kg dieta⁻¹) durante 15 y 21 días a nivel molecular. Más concretamente, se evaluaron los cambios en la expresión de varios genes relacionados con las vías de defensa de la trucha arcoíris en órganos linfoides asociados a mucosas como el intestino, la piel y las branquias. La expresión de los genes *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* mostraron variaciones en cuanto a los niveles de expresión y correlación genética en los órganos evaluados tras la exposición a la dieta con plomo. Los resultados demostraron que la sobreexpresión de *igm*, *igt* y *ctsD* a 21 días de exposición, en el intestino se asoció con una respuesta inmunitaria innata temprana. La disminución de la expresión del gen *igt* a los 15 días de exposición en la piel se relaciona con una respuesta localizada a la toxicidad del plomo, lo que resalta el papel del órgano como barrera contra las amenazas ambientales. Considerando la expresión genética, se encontraron correlaciones positivas entre la expresión del gen *igt* con la expresión de *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* en las branquias. Este hallazgo sugiere un posible esfuerzo colaborativo entre genes para combatir la supresión del sistema inmunológico, posiblemente compartiendo una misma vía de defensa inmunológica común. En general, nuestros hallazgos revelaron que el MALT de la trucha arcoíris muestra una interacción compleja de protección contra los efectos del Pb, de hecho, la dieta suplementada proporciona información sobre una posible respuesta temprana de estos genes contra el estrés celular. Además, podría ser útil comprender el comportamiento del MALT como parte de la defensa del sistema inmunológico innato contra los metales pesados.

Palabras clave: Tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT); Intestino, Piel; Branquias; Plomo; RT-qPCR; Respuesta inmunitaria; Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

1. Resumen gráfico.



H.J. Pérez-Mesa, María Zari-Muñoz, A. Ordóñez-Ugalde, Iván Ricardo Vega-Valdez, Francisco A. Guardiola. 2025. Molecular-level effect of a lead-containing diet on mucosa-associated lymphoid tissues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

2. Introducción.

Los metales y semimetales están presentes de forma natural en la tierra y entran en los ambientes acuáticos a través de diversos procesos geoquímicos [180]. La principal fuente de exposición a metales es a través de fuentes antropogénicas como el transporte, la agricultura, la minería y otras operaciones relacionadas [181]. El plomo (Pb) como metal pesado, es uno de los contaminantes de los sistemas acuáticos que tiene efectos sobre los organismos que viven en este sistema. El Pb se utiliza comúnmente en los procesos de producción de varios productos, como pesticidas, cerámicas y baterías [182]. Los peces pueden acumular Pb del agua y la dieta [183] y es un inmunotóxico que a través de la exposición resulta en cambios en la función inmunitaria [184]. Existen rutas de absorción de metales por los peces por ejemplo: a través de las branquias y por absorción a través de la piel [185]. En el caso de la piel, tanto la estructura como la composición celular de la epidermis pueden verse afectadas por estresores, patógenos o contaminantes ambientales, como la exposición a metales pesados [186]. La absorción del metal también puede ocurrir a través del tracto gastrointestinal ya que las fuentes dietéticas para los peces pueden contaminarse con agua contaminada o sedimentos [183]. Por otro lado, el sistema inmunitario de las mucosas de los vertebrados comprende una variedad única de células y moléculas inmunitarias innatas y adaptativas, que actúan en conjunto para proteger al huésped contra patógenos [187]. Por lo tanto, las superficies mucosas (branquias, fosas nasales, piel, intestino e intestino grueso) están en contacto con el ambiente externo, constituyen la primera línea de defensa y pueden generar una primera respuesta a los agentes estresantes después de la activación de los receptores celulares locales [186]. Estos tejidos apoyan la respuesta inmunitaria local a través de la distribución de abundantes células inmunitarias [187].

Uno de los órganos secundarios es el MALT (tejido linfoide asociado a las mucosas), que es la principal estructura linfoide del cuerpo [186,188]. Las superficies mucosas del cuerpo del pez están estrechamente asociadas con el ambiente externo y son particularmente vulnerables a las infecciones [189]. Existen cuatro tipos diferentes de MALT en los peces, tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a la piel (SALT) y el tejido linfoide asociado a branquias (GIALT) [190,191], que desempeña un papel importante en la salud de los peces [192]. El intestino de los peces teleósteos es una estructura compleja multifunción que desempeña un papel defensor inmunológico fundamental en la homeostasis y el mantenimiento de la salud, además de la digestión de los alimentos y/o la absorción de

nutrientes [193]. La piel es el órgano más externo del cuerpo y la primera línea de defensa ante agresiones externas [194]. Las branquias de los peces teleósteos son un órgano complejo cuya función va más allá de extraer oxígeno del agua y excretar dióxido de carbono [195]. La exposición de los peces a metales transportados por el agua a concentraciones elevadas puede inducir cambios estructurales en las branquias [196]. La estructura de las branquias es muy sensible a los cambios ambientales [197]. Los peces son organismos centinelas comunes y se encuentran entre los organismos de prueba más populares para el biomonitoreo en ambientes acuáticos porque acumulan contaminantes metálicos tóxicos a través de sus branquias [198].

Los peces teleósteos son excelentes modelos para el estudio de la inmunidad de las mucosas porque cada barrera que separa al huésped del ambiente es una barrera mucosa viva [199]. La trucha arcoíris fue seleccionada como un modelo de pez de laboratorio debido a su importancia económica a nivel mundial y su uso como especie bioindicadora en estudios ecotoxicológicos, dada la extensa homología entre los genomas de los peces y los humanos [200]. Varios estudios sugieren que el moco de pescado contiene inmunoglobulinas (Igs) que se producen localmente en lugar de representar trasudados del plasma [199]. Las células *igm+* e *igt+* están todas presentes constitutivamente en diversos tejidos de trucha arco iris [201]. Una de las funciones de los anticuerpos *igm* (Inmunoglobulina M) naturales incluye la orientación de antígenos alterados o neoepítomos en células moribundas para su eliminación dirigida [202]. Además, la respuesta inmunitaria que involucra el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) y las respuestas inmunitarias *igm*, aún no se ha estudiado ampliamente en peces [203]. Asimismo, la inmunoglobulina Z (*igz*) o (*igt*) su equivalente inmunoglobulina T es una clase de inmunoglobulina (Ig) recientemente identificada de peces teleósteos. Esta clase de Ig se caracteriza por su participación en MALT para la defensa de las mucosas contra la infección por patógenos [204]. Además, aparece en las secreciones mucosas y representa la principal Ig en la inmunidad mucosa [205].

Los receptores tipo *toll* (TLR) comprenden una familia de receptores transmembrana de un solo paso que pueden identificar varias clases de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) [206]. En los peces se han identificado varios TLR que comparten una homología cercana con otros eucariotas, incluidos los humanos [207]. Estudios recientes sobre los TLR de peces se han centrado en la identificación y expresión de los miembros de TLR y sus genes de cascada de señalización en respuesta a la estimulación de patógenos [208]. Según Elfeil et al. [209] el papel de TLR3 involucrado en la mediación de la señalización a través de

la molécula adaptadora que contiene el dominio TIR-1 (TICAM-1), que considera la proteína adaptadora TLR-3, conduce a la activación de una cascada de moduladores inmunitarios que incluyen el factor regulador de interferón-III, los factores de transcripción, el factor nuclear- κ B y la proteína activadora-I, que es seguida por una producción de citocinas específicas, mientras que, TLR9 es un receptor intracelular que reconoce ADN CpG no metilado que se origina de los genomas de bacterias, virus de ADN, virus de ADN propio generado en condiciones patológicas [210]. Asimismo, la catepsina D posee una amplia especificidad de enlace peptídico similar a la pepsina y está involucrada en diversas vías metabólicas y fisiológicas, incluyendo la proteólisis catabólica intracelular [211]. En peces, pocos estudios se han realizado sobre la función de la catepsina D en el sistema inmunitario [212].

Desafortunadamente, los estudios sobre el daño causado por el Pb a los tejidos linfoides asociados a las mucosas son todavía escasos. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta inmunitaria del MALT de la trucha arcoíris a través de la detección de alteraciones en la expresión y correlación de los genes *igm*, *igt*, *tlr3*, *tlr9* y *ctsD* asociados a intestino, piel y branquias. Para ello, ejemplares de trucha fueron sometidos a una dieta no suplementada y suplementada con dos concentraciones de plomo durante 21 días. Además, este estudio también evaluó el uso de estos genes como potenciales biomarcadores de la primera línea de defensa. Los hallazgos de este trabajo de investigación podrían contribuir a una mejor comprensión del papel inmunológico del MALT en los peces, la conservación de la acuicultura y la seguridad nutricional de la población.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Cuidado y mantenimiento de los peces.

Setenta y dos ejemplares (160 g +/- 10) de trucha arcoíris, obtenidos de un criadero local (Parque Nacional El Cajas, Cuenca, Ecuador), se mantuvieron en tanques de 750 L y se alimentaron con una dieta comercial (S-400) a una tasa del 3%, directamente proporcional a la biomasa total generada durante al menos 15 días antes de iniciar el experimento. Los animales se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 horas de luz a 12 horas de oscuridad y a una temperatura de 4°C. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Murcia (España) y analizados en el Laboratorio Biomolecular de O&U (Ecuador).

3.2. Preparación del pienso y exposición al plomo.

Para los tratamientos experimentales se utilizó una dieta comercial estándar para trucha (S-400). La suplementación se realizó con S-400 mezclado con aceite Omega 3 (Nature's Life®) y polvo metálico de plomo (TMMEDIA®), obteniéndose tres dietas suplementadas: i) Dieta control (dieta con 0 mg de plomo kg⁻¹); ii) Dieta 120 (dieta con 120 mg de plomo kg⁻¹), y iii) Dieta 240 (dieta con 240 mg de plomo kg⁻¹). Los peces fueron seleccionados aleatoria y posteriormente divididos en seis tanques (12 peces en cada tanque, 750 L). De esta manera, se establecieron tres grupos experimentales por duplicado de la siguiente manera: i) Grupo no expuesto (control) alimentado con dieta con 0 mg de plomo kg⁻¹; ii) Expuesto a 120 mg de plomo kg⁻¹; y iii) Expuesto a 240 mg de plomo kg⁻¹. Los animales fueron alimentados con dietas experimentales a una tasa del 3% durante todo el experimento. Los animales fueron mantenidos con las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura que se describen en la Sección 4.1.

3.3. Toma de muestras.

Se tomaron muestras de tres ejemplares de cada tanque después de 15 y 21 días de prueba, estableciendo una N de 6 por grupo. Se dejaron en ayunas durante 24 horas antes del muestreo y después de la administración de aceite de clavo (20 mg L⁻¹, Eufar®), se sacrificaron. Se recolectaron muestras de intestino, piel y branquias de todos los especímenes mediante disección en un tubo Eppendorf libre de ARNasas. Estos tejidos se almacenaron a -80 °C y se enviaron al laboratorio para su posterior análisis de expresión génica.

3.4. Lisis tisular y aislamiento de ARN.

Para la lisis tisular y la extracción de ARN se utilizó el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega, por lo que se transfirió 1 mL de tampón de lisis de ARN (con BME añadido) al tubo al que se agregará la muestra de tejido. Se utilizaron pipetas y guantes libres de ARNasa para reducir la contaminación por ARNasa. El tejido de interés se agregó al tubo que contenía el tampón de lisis de ARN. El tejido se homogeneizó a alta velocidad con un homogeneizador Gemmy Modelo VRN-200 hasta no tener fragmentos visibles de tejido. Para la lisis de intestino y piel se estableció un tiempo de 50 min, mientras que para la lisis de las branquias se estableció 60 min por ser un tejido más grueso. La masa del tejido se calculó restando el peso obtenido del tubo que contenía el buffer de lisis de ARN (previamente

pesado), obteniendo una relación entre la masa del tejido y el buffer de lisis de ARN que fue de 169 mg mL⁻¹. Se tomaron 175 µL del lisado de tejido y se añadieron 350 µL de buffer de dilución de ARN. Después de mezclar, se sometió a 70°C con la ayuda de un baño de agua WNB 14 Memmert durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000 x *g* durante 10 minutos.

La extracción de ARN se realizó según el protocolo del fabricante. Un microgramo de ARN total se trató con DNasa I para eliminar el ADN genómico. La concentración y pureza del ARN (260/280 y 260/230) se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.5. Retrotranscripción del ARN total a ADNc.

La retrotranscripción del ácido ribonucleico (ARN) purificado (1 µg) se llevó a cabo utilizando el kit ipsogen® RT Handbook siguiendo los pasos que se indican a continuación, se incubó a 65 °C en un baño de agua WNB 14 Memmert durante 5 min, luego se dejó enfriar durante 5 min y luego se centrifugó durante 1 min a 12.000 x *g*, se mantuvo en hielo. Se procedió a adicionar 15 µL de premezcla de transcripción reversa compuesta por los siguientes 5 µL de buffer 5x, 2 µL de dNTPs (10 mM cada uno), 5.25 de Random nonámeros (100 µM), 0.5 µL de inhibidor de ARNasa (40 U µL⁻¹), 1 µL de la enzima Transcriptasa reversa (200 U µL⁻¹) y 1.25 µL de DTT, según lo indicado por el fabricante. La reacción de transcripción reversa se realizó durante 1 h 20 min, en un Termociclador SimpliAmp. El ADNc así obtenido se almacenó a -20 °C en espera de su análisis mediante una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.

3.6. Diseño y Eficiencia de Primers.

Los cebadores fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies™ (Iowa, Estados Unidos) representada por Ascarbi Biosystems (Quito, Ecuador). El kit de extracción de ARN fue adquirido de Ascarbi Biosystems. Los cebadores seleccionados se obtuvieron de la revisión científica y se confirmaron en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Todos los pares de cebadores utilizados en qPCR fueron graduados y las eficiencias estuvieron entre el 92 y el 105% (**Tabla 8**). Se optimizaron tanto en temperatura como en concentración. Las temperaturas probadas fueron 55, 58 y 61 °C, y las concentraciones (250, 375, 500 y 625 nM) se probaron con PCR en tiempo real utilizando SYBR green con 50 ng de

ADNc, la especificidad de los productos de cada par de cebadores también se validó ya que solo un pico estaba presente en el análisis de la curva de fusión.

3.7. Análisis cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real se llevó para análisis de expresión génica la misma se realizó utilizando el termociclador Applied Biosystems 7500 después de la síntesis de ADNc de genes en el intestino, la piel y las branquias. La mezcla de reacción estaba compuesta por 10 µL de SYBR, 1 µL de ADNc, 0.6 µL de cebadores directos e inversos, respectivamente, y se añadieron 7 µL de agua ultrapura (Invitrogen) hasta un volumen final de 19.2 µL. Los ensayos se realizaron en una placa de 96 pocillos en condiciones de predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Table 8. Primers usados para (RT-qPCR).

Gen	Abreviatura Gen	Primers (F: cebador directo, R: cebador inverso)	Eficiencia	Genbank
Beta-actina	<i>β-actin</i>	F: ATGGAAGATGAAATCGCCGC R: CGACATGGAGAAGATCTGGCA	99%	AJ438158
Inmunoglobulina M	<i>igm</i>	F: AAGAAAGCCTACAAGAGGGAGA R: CGTCAACAAGCCAAGCCACTA	98%	S63348.1
Inmunoglobulina T	<i>igt</i>	F: CAACACTGACTGGAACAACAAGGT R: CGTCAGTGGTTCTGTTTTGGA	95%	AY870266.1
Catepsina-D	<i>ctsD</i>	F: GCCTGTCATCACATTCAACCT R: CCACTCAGGCAGATGGTCTTA	92%	U90321
Receptor tipo toll 3	<i>tlr3</i>	F: AGCCCTTTGCTGCCTTACA R: GTCTTCAGGTCATTTTTGGACACG	96%	NM_001124578.1
Receptor tipo toll 9	<i>tlr9</i>	F: TCTTCATAGAGCTGAAGAGGCCTCA R: GTTCCCACTGAGGAGAAGTGTTTT	105%	NM_001129991

3.8. Análisis estadístico.

Todas las mediciones se realizaron en tres réplicas, empleamos la técnica RT-qPCR para evaluar la expresión génica de los genes *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* en varios tejidos (intestino, piel y branquias) de trucha arcoíris, expuesta a una dieta con Pb en concentraciones de 0, 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ durante períodos de 15 y 21 días. El gen *β-actin* se utilizó como gen de mantenimiento (*housekeeping*). Los niveles de expresión se analizaron utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ ($2(-\Delta\Delta Ct)$), lo que permitió una comparación en condiciones experimentales específicas, como se describió. Empleamos un ANOVA de dos factores utilizando el software *GraphPad Prism* para comparar los valores de cambio de la

expresión de cada gen, con un nivel de significancia establecido en $p \leq 0,05$. Los datos se representan como la media aritmética acompañada del error estándar de la media (S.E.M.).

4. Resultados.

4.1. Expresión de genes.

Se estudió la expresión de los genes *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* en varios tejidos del MALT de truchas arcoíris (intestino, piel y branquias) expuestas a una dieta con Pb en concentraciones de 0 (control, no expuestos), 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ durante 21 días.

4.1.1. Expresión de genes evaluados en intestino.

En el intestino, la expresión de los genes *igm*, *igt* y *ctsD* mostró una disminución en los peces expuestos a concentraciones de 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos a los 15 días. Curiosamente, los peces expuestos a concentraciones de 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ mostraron una sobreexpresión de los genes *igm*, *igt* y *ctsD*, a los 21 días, en comparación con los peces no expuestos (**Figuras 11A, 11B y 11C**). Por otro lado, a los 15 días de experimentación, la expresión del gen *tlr3* registró una sobreexpresión en peces expuestos a la concentración de 120 mg de Pb kg dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos y los peces alimentados con una dieta con Pb de 240 mg kg dieta⁻¹. Sin embargo, a los 21 días se observó una sobreexpresión del gen *tlr3* en los peces expuestos a la concentración de Pb más alta (dieta 240) en comparación con los niveles de expresión obtenidas de este gen en los peces no expuestos y los peces expuestos a 120 mg kg dieta⁻¹ (**Figura 11D**). En el caso del gen *tlr9*, a los 15 y 21 días, los niveles de expresión de este gen se encontraron sobreexpresados en los peces expuestos a la concentración de 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ en comparación con los niveles de expresión observadas en los peces no expuestos (**Figura 11E**).

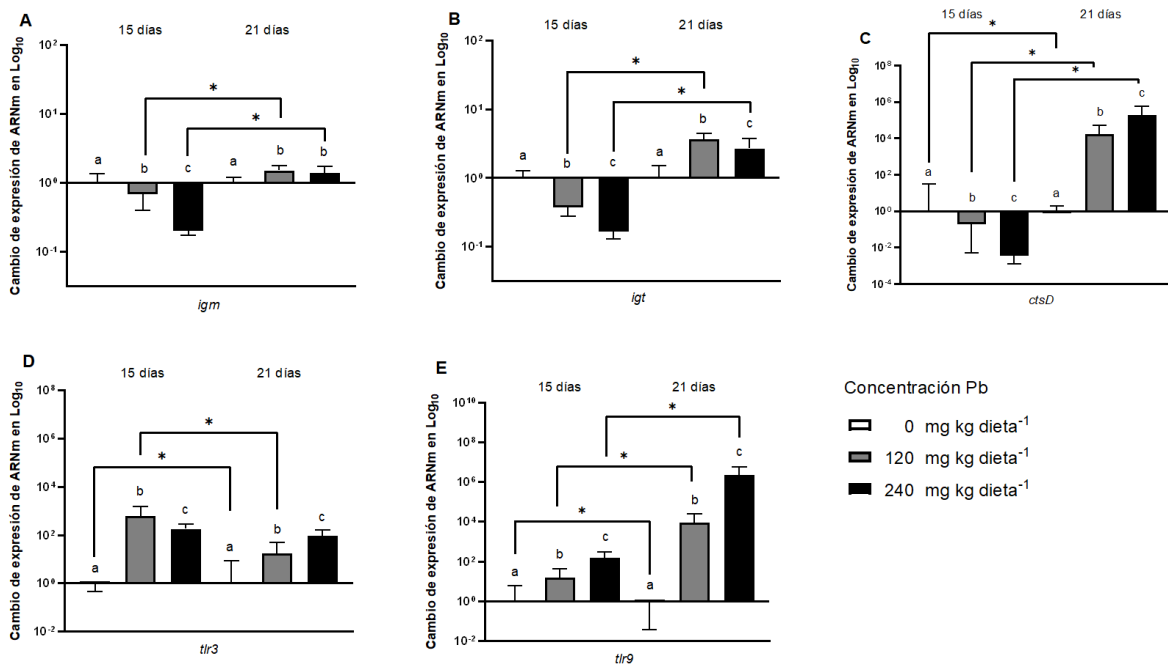


Figura 11. Expresión de genes: **A)** inmunoglobulina M (*igm*); **B)** inmunoglobulina T (*igt*); **C)** catepsina D (*ctsD*); **D)** receptor tipo toll 3 (*tlr3*); y **E)** receptor tipo toll 9 (*tlr9*); en el intestino de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dieta con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.). Las letras indican variaciones significativas entre los grupos experimentales para un tiempo determinado, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas dentro de cada grupo experimental en relación con el tiempo. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando el gen de mantenimiento β -actina. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Tukey para evaluar los efectos de las concentraciones y el tiempo en cada grupo experimental (n = 6). La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

Considerando el factor tiempo, se observó niveles de expresión incrementados de los genes *igm*, *igt* y *ctsD* en los peces expuestos a la concentración de 120 y 240 mg kg dieta⁻¹ (**Figuras 11A, 11B y 11C**). En el caso del gen *tlr3*, el nivel de expresión disminuyó en peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹, mientras que, una sobreexpresión en peces no expuestos fue observada entre 15 y 21 días (**Figura 11D**). Los niveles de expresión del gen *tlr9* mostraron una sobreexpresión en los peces expuestos a 120 y 240 mg kg de dieta⁻¹ sin embargo, los niveles de expresión en los peces no expuestos disminuyeron a lo largo del tiempo (**Figura 11E**).

4.1.2. Expresión de genes evaluados en la piel.

Los niveles de expresión del gen *igm* en la piel de la trucha arcoíris mostró una sobreexpresión en los peces expuestos a la concentración más alta (240 mg kg dieta⁻¹), a los 15 días, en comparación con los peces no expuestos. Por el contrario, se observó una disminución de los niveles de expresión de gen *igm* en los peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ comparado con los peces no expuestos y peces expuestos a la dieta 240 mg kg dieta⁻¹. A los 21 días, se observó una reducción en los niveles de expresión del gen *igm* en los peces expuestos a la concentración de 240 mg kg de dieta⁻¹ en comparación con los peces no expuestos y los peces expuestos a la concentración más baja de Pb (dieta 120) (**Figura 12A**). En el caso de los niveles de expresión del gen *igt*, se observó una disminución en todos los grupos experimentales a los 15 días. Contrariamente, se observó una sobreexpresión a los 21 días en los peces expuestos a las concentraciones 120 y 240 mg kg de dieta⁻¹ en comparación con la expresión obtenida en la piel de los peces no expuestos la cual estuvo disminuida (**Figura 12B**). Además, a los 15 y 21 días del ensayo, la expresión del gen *ctsD* mostró una sobreexpresión en sus niveles en los peces alimentados con Pb (dietas de 120 y 240) en comparación a los peces no expuestos (**Figura 12C**). Por otro lado, los niveles de expresión de los genes *tlr3* y *tlr9* mostró una disminución en todos los grupos experimentales a los 15 días de recorrido. Sin embargo, a los 21 días, se observó una sobreexpresión de los niveles de *tlr3* y *tlr9* en los peces alimentados con ambas concentraciones de Pb en comparación con los peces no expuestos (**Figuras 12D y 12E**).

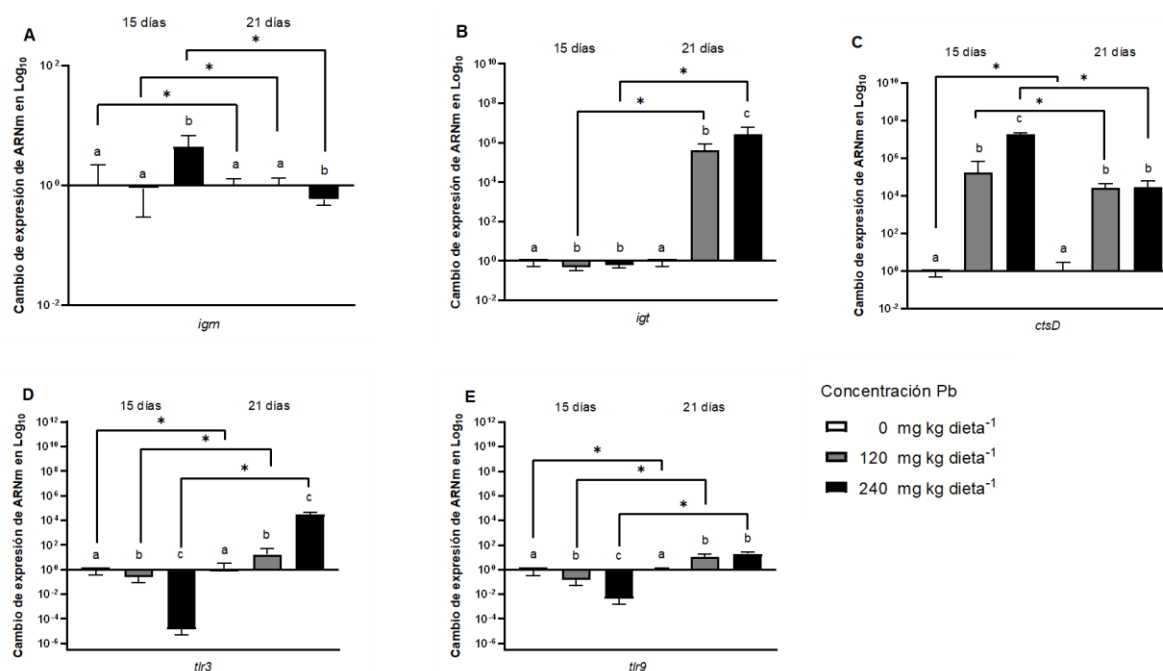


Figura 12. Expresión de genes: **A)** inmunoglobulina M (*igm*); **B)** inmunoglobulina T (*igt*); **C)** catepsina D (*ctsD*); **D)** receptor tipo toll 3 (*tlr3*); y **E)** receptor tipo toll 9 (*tlr9*); en la piel de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dieta con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.). Las letras indican variaciones significativas entre los grupos experimentales para un tiempo determinado, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas dentro de cada grupo experimental en relación con el tiempo. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando el gen de mantenimiento β -actina. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Tukey para evaluar los efectos del tratamiento y el tiempo en cada grupo experimental ($n = 6$). La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

Considerando el factor tiempo, se observó una reducción de la expresión del gen *igm* en peces no expuestos y peces expuestos a la concentración de 240 mg de Pb kg dieta⁻¹, mientras que, se observó una sobreexpresión en peces expuestos a concentraciones de 120 mg de Pb kg dieta⁻¹ (**Figura 12A**). En cuanto a los niveles de expresión de los genes *igt*, *tlr3* y *tlr9*, estos mostraron una sobreexpresión en peces expuestos a ambas concentraciones de Pb entre 15 y 21 días (**Figuras 12B, 12D y 12E**). Los resultados del gen *ctsD* en peces expuestos a ambas concentraciones de Pb mostraron una reducción de la expresión en función del tiempo (**Figura 12C**). En el caso de los genes *ctsD*, *tlr3* y *tlr9*, estos mostraron un incremento en sus niveles de expresión entre 15 y 21 días en peces no expuestos (**Figuras 12C, 12D y 12E**).

4.1.3. Expresión de genes evaluados en las branquias.

Los niveles de expresión del gen *igm* mostró un incremento en la expresión en peces expuestos a ambas concentraciones de Pb a los 15 días del experimento en comparación a los niveles de expresión que mostraron los peces no expuestos. Por el contrario, a los 21 días del ensayo, se observó una disminución de los niveles de expresión de *igm* en los peces alimentados con las dietas 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ en comparación a los peces no expuestos (**Figura 13A**). A 15 días, se observó una sobreexpresión de los niveles de expresión de genes *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* en peces expuestos a ambas concentraciones de Pb (dieta 120 y 240) en comparación con los peces no expuestos. Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de *igt*, *tlr3* y *tlr9* en los peces expuestos a ambas concentraciones de Pb a los 21 días del experimento (**Figuras 13B, 13D y 13E**) comparado con los peces no expuestos. Por otro lado, a los 21 días de recorrido los niveles de expresión del gen *ctsD* disminuyeron en todos los grupos experimentales. (**Figura 13C**).

Considerando el factor tiempo, los niveles de expresión del gen *igm*, *igt*, *tlr3* y *tlr9* mostraron una disminución en los peces alimentados con dietas 120 y 240 mg de Pb kg dieta⁻¹ (**Figuras 13 A, 13B, 13D y 13E**). Por otra parte, se observó una disminución de los niveles de expresión del gen *ctsD* en todos los grupos experimentales a lo largo del tiempo (**Figura 13C**).

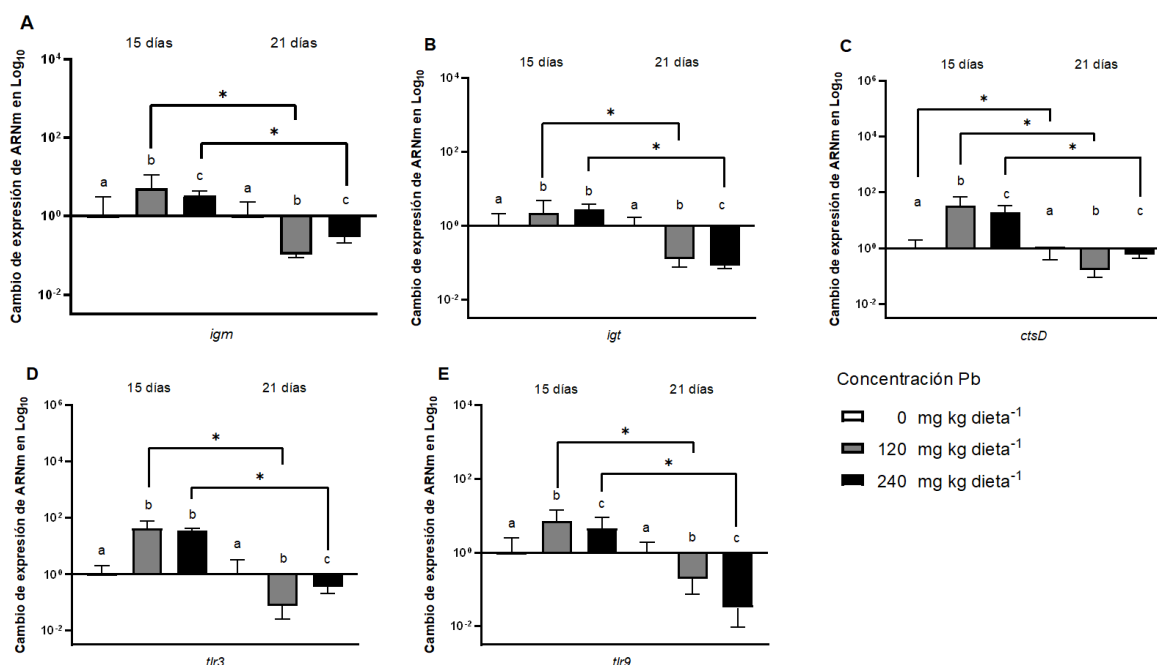


Figura 13. Expresión de genes: **A)** inmunoglobulina M (*igm*); **B)** inmunoglobulina T (*igt*); **C)** catepsina D (*ctsD*); **D)** receptor tipo toll 3 (*tlr3*); y **E)** receptor tipo toll 9 (*tlr9*); en las branquias de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dieta con 0 (no expuestas, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. Los datos se representan como la media $\pm$ error estándar de la media (S.E.M.). Las letras indican variaciones significativas entre los grupos experimentales para un tiempo determinado, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas dentro de cada grupo experimental en relación con el tiempo. Los niveles de expresión génica se normalizaron utilizando el gen de mantenimiento β -actina. Se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de Tukey para evaluar los efectos del tratamiento y el tiempo en cada grupo experimental (n = 6). La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

4.2. Correlación genética.

4.2.1 Correlación de la expresión de genes evaluados en el intestino.

La correlación de genes en el intestino de la trucha arcoíris (**Tabla 9**) evidenció que la dieta con Pb está correlacionada negativamente con la expresión de los genes *igm* e *igt*. Por el contrario, se observó una correlación positiva entre la expresión del gen *ctsD* y la dieta con Pb. Por otro lado, se mostraron correlaciones positivas significativas entre la dieta de Pb con la expresión de los genes *tlr3* y *tlr9*. El factor tiempo mostró una correlación positiva significativa con la expresión de los genes *igm*, *igt*, *ctsD* y *tlr9*. Curiosamente, se mostró una correlación negativa en la expresión del gen *tlr3* con el tiempo. Se mostraron correlaciones positivas significativas entre la expresión de los genes *igm* con *igt* y *ctsD*. Además, la expresión del gen *igm* mostró una correlación negativa con la del gen *tlr3*, mientras que se observó una correlación positiva con el gen *tlr9*. En el caso del gen *igt*, se mostraron correlaciones positivas significativas con la expresión de los genes *ctsD* y *tlr9*.

Por el contrario, se observaron correlaciones negativas entre la expresión de los genes *igt* y *tlr3*. La expresión del gen *ctsD* mostró una correlación positiva con el gen *tlr9*, mientras que se correlacionó negativamente con el gen *tlr3*. Por otro lado, la expresión de los genes *tlr3* y *tlr9* mostraron una correlación positiva.

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para parámetros relacionados con el intestino en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) después de 15 y 21 días de exposición a 120 mg y 240 mg kg⁻¹ de dieta. La tabla presenta los coeficientes de correlación, acompañados de intervalos de confianza. Los niveles de significancia se indican como *p ≤ 0,05.

Variable	Pb-dieta	<i>igm</i>	<i>igt</i>	<i>ctsD</i>	<i>tlr3</i>	<i>tlr9</i>	Tiempo
1. Pb-dieta	1						
2. <i>igm</i>	-.29 [-.56, .05]						
3. <i>igt</i>	-.12 [-.43, .22]	.61** [.35, .78]					
4. <i>ctsD</i>	.16 [-.17, .47]	.37* [.05, .62]	.57** [.30, .76]				
5. <i>tlr3</i>	.56** [.29, .75]	-.19 [-.49, .15]	-.05 [-.37, .28]	-.03 [-.36, .30]			
6. <i>tlr9</i>	.62** [.37, .79]	.16 [-.18, .46]	.41* [.10, .65]	.51** [.22, .72]	.27 [-.06, .55]		
7. Tiempo	.00 [-.33, .33]	.49** [.19, .71]	.67** [.44, .82]	.60** [.34, .78]	-.20 [-.50, .14]	.41* [.10, .65]	1

Dieta con plomo (Pb-dieta), inmunoglobulina M (*igm*), inmunoglobulina T (*igt*), catepsina D (*ctsD*), receptor tipo toll 3 (*tlr3*) y receptor tipo toll 9 (*tlr9*), tiempo.

4.2.2. Correlación de la expresión de genes evaluados en la piel.

La piel de la trucha arcoíris mostró correlaciones positivas significativas entre la dieta con Pb y los genes *igm*, *igt* y *ctsD*. Sin embargo, los genes *tlr3* y *tlr9* se correlacionaron negativamente a la dieta con Pb. Por otro lado, los genes *igm* y *ctsD* mostraron una correlación negativa a con el factor tiempo. Sin embargo, el factor tiempo tuvo correlaciones positivas significativas con los genes *igt*, *tlr3* y *tlr9*. Considerando la expresión del gen *igm*, este mostró correlaciones negativas con los genes *igt*, *tlr3* y *tlr9*. Por el contrario, la expresión del gen *igm* mostró correlación positiva con *ctsD*. La expresión de *igt* se correlacionó positivamente con *ctsD*, mientras que, se observaron correlaciones positivas significativas con los genes *tlr3* y *tlr9*. En el caso del gen *ctsD*, este mostró una correlación negativa con el gen *tlr3* y una correlación negativa significativa con el gen *tlr9*. Además, la expresión de los genes *tlr3* y *tlr9* mostraron una correlación positiva entre sí (**Figura 14**).

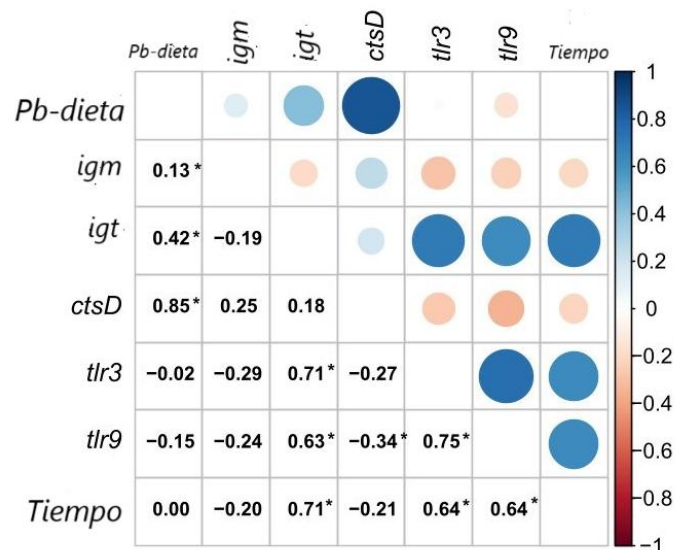


Figura 14. Mapa de calor que ilustra las correlaciones entre dieta con plomo (Pb-dieta); inmunoglobulina M (*igm*; inmunoglobulina T (*igt*); catepsina D (*ctsD*); receptor tipo toll 3 (*tlr3*); receptor tipo toll 9 (*tlr9*); y tiempo en las muestras de piel de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dieta con 0 (no expuesta, grupo control), 120 y 240 mg Pb kg dieta⁻¹ a los 15 y 21 días. El gradiente de color representa los niveles de correlación genética, asociados con los valores más altos mostrados en azul y los valores más bajos en rojo oscuro. El gráfico se generó utilizando agrupamiento jerárquico (método 'ward.D') para ordenar las variables, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

4.2.3. Correlación de la expresión de genes evaluados en las branquias.

En las branquias de la trucha arcoíris se observó que la dieta con Pb está correlacionada positivamente con la expresión de los genes *ctsD* y *tlr3*. Por otro lado, la dieta con plomo se correlaciona de forma negativa con los genes *igm*, *igt*, y *tlr9*. El factor tiempo mostró correlaciones negativas significativas con los genes *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9*. Además, *igm* mostró correlación positiva con *igt*, mientras que con *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* las correlaciones positivas fueron significativas. Así, *igt* mostró correlación positiva significativa con *ctsD*, *tlr3* y *tlr9*. Igualmente, en el caso de *ctsD*, mostró correlación positiva significativa con *tlr3* y *tlr9*. Finalmente, una correlación positiva significativa se vio entre el gen *tlr3* y *tlr9* (**Tabla 10**).

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson (r) para parámetros relacionados con las branquias en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) después de 15 y 21 días de exposición a 120 mg y 240 mg kg dieta⁻¹. La tabla presenta los coeficientes de correlación, acompañados de intervalos de confianza. Los niveles de significancia se indican como asterisco ($p \leq 0,05$).

Variable	Pb-dieta	<i>igm</i>	<i>igt</i>	<i>ctsD</i>	<i>tlr3</i>	<i>tlr9</i>	Tiempo
1. Pb-dieta	1						
2. <i>igm</i>	-.00 [-.33, .33]						
3. <i>igt</i>	-.16 [-.46, .18]	.28 [-.05, .56]					
4. <i>ctsD</i>	.21 [-.12, .51]	.43** [.12, .66]	.62** [.37, .79]				
5. <i>tlr3</i>	.17 [-.16, .48]	.49** [.19, .70]	.52** [.23, .73]	.68** [.45, .82]			
6. <i>tlr9</i>	-.15 [-.45, .19]	.38* [.06, .63]	.39* [.08, .64]	.35* [.02, .61]	.53** [.25, .73]		
7. tiempo	.00 [-.33, .33]	-.53** [-.73, -.24]	-.59** [-.77, -.32]	-.61** [-.78, -.36]	-.63** [-.79, -.38]	-.53** [-.73, -.24]	1

Dieta con plomo (Pb-dieta), inmunoglobulina M (*igm*), inmunoglobulina T (*igt*), catepsina D (*ctsD*), receptor tipo toll 3 (*tlr3*) y receptor tipo toll 9 (*tlr9*), tiempo.

4. DISCUSIÓN.

La presente Tesis Doctoral pretende avanzar en el conocimiento de los efectos tóxicos del Pb en trucha arcoíris por ser un pez de interés comercial, ampliamente valorada tanto por su aporte nutricional como por su relevancia en la acuicultura. Durante el desarrollo experimental, se han estudiado dos aspectos principales de daño inducido por la exposición al Pb: las alteraciones metabólicas, que afectan procesos hematológicos y bioquímicos esenciales, la función hepática y la capacidad antioxidante y, por otro lado, los daños genéticos, que comprometen la integridad del ADN y alteran la expresión de genes relacionados con la desintoxicación celular, la inflamación y la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos buscan favorecer no solo al entendimiento de los mecanismos de toxicidad del plomo en organismos acuáticos, sino también a la generación de estrategias para mitigar su impacto en la salud de los peces y en la seguridad alimentaria humana, promoviendo prácticas sostenibles.

4.1. Hematología.

Los indicadores hematológicos muestran el estado de salud y las condiciones patológicas de los peces, además de la calidad del agua, estos indicadores son: glóbulos rojos (GR), glóbulos blancos (GB), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), factores hematológicos como hemoglobina celular media (MCH), volumen celular medio (MCV) y concentración media de hemoglobina celular (MCHC) [213]. En este estudio, se observaron cambios en la trucha arcoíris en parámetros hematológicos después de la exposición al Pb, el tiempo de 21 días mostró una disminución en los valores de GR, Hb y Hct en peces no expuestos y peces expuestos a la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹. Nuestros resultados concuerdan con los datos de Mohammadian et al. [178] donde la exposición a Pb indujo una reducción tolerable en los glóbulos rojos de trucha arcoíris. De hecho, los peces expuestos crónicamente al Pb tuvieron anemia producto de esta exposición. Por otro lado, los cambios en los parámetros sanguíneos de los peces también son indicadores informativos de la respuesta sistémica al estrés externo [5,15]. Esto puede sugerir que a mayor concentración del Pb y a mayor paso de los días, la trucha arcoíris se intoxica de forma más rápida. Por lo tanto, la disminución en el nivel de Hb y Hct puede ser un indicador de anemia conjuntamente con inhibición de la eritropoyesis en el tejido hematopoyético [214]. Ahmed et al. [165] consideran que estas variaciones pueden deberse a que el Pb afecta la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre afectando los niveles de Hb y Hct de diferentes maneras dependiendo de la especie y

la duración de la exposición. Ucar et al. [215] indicaron que el estado anémico de los peces también puede ser efectivo en el aumento de los niveles de MCV y MCH, lo que concuerda con nuestros resultados ya que los peces expuestos a $240 \text{ mg kg dieta}^{-1}$ en el grupo experimental de 21 días mostraron un aumento en el valor de MCV, así como un aumento en el valor de MCHC en los peces expuestos a $120 \text{ mg kg dieta}^{-1}$ a los 15 días de recorrido. En este estudio la dieta con Pb mostró un aumento en GB, concordando con Palikova et al. [216] donde utilizaron un metal análogo como lo es el arsénico, obteniendo un recuento total de leucocitos en trucha arcoíris aumentando notablemente después de 30 días del experimento. En estudios tempranos, el cobre (Cu) también causó un aumento estadísticamente significativo en el nivel de GB de trucha arcoíris [217]. Sugerimos que el aumento en el GB es un indicador de defensa de la trucha arcoíris contra el Pb. Dado que la disminución de estos glóbulos puede estar relacionada con trastornos o infecciones desarrolladas en los tejidos hematológicos e indican inmunosupresión del sistema inmunitario [218].

4.2. Bioquímica.

La GLU está considerada como monosacárido biológico más importante, además de ser una fuente de energía privilegiada o única para muchos tipos de células [219]. Los niveles de GLU en sangre se pueden utilizar como un biomarcador de estrés en teleósteos [220]. En este estudio, la exposición de la trucha arcoíris a la dieta con Pb mostró a los 15 días aumentó significativamente los valores de GLU, mientras que en el grupo de 21 días disminuyó. Esto difiere de los estudios realizados por Stankevičiūtė et al. [157] donde el nivel de GLU en trucha arcoíris disminuyó en los primeros días de exposición (1, 4, 7 y 14 días). Por otro lado, el comportamiento de la GLU en este estudio fue similar en comparación con estudios previos, donde la disminución de la glucosa es muy probablemente el resultado de la retención de alimento durante la aclimatación y la experimentación dando el agotamiento de las reservas de energía [221]. Nuestros resultados concuerdan con estudios donde el zinc redujo de forma severa los niveles de GLU de trucha arcoíris en los primeros 7 días de experimento, aumentando sus niveles significativamente después de 15 días [222]. Elbeshti et al. [168] concluyeron en bagre que, el cadmio (Cd) también afecta los niveles de GLU de los peces. Se ha demostrado que la exposición al Cd al igual que el Pb provoca que los niveles de GLU en la trucha arcoíris aumenten. Un incremento en los valores de COL en peces expuestos a la dieta de $120 \text{ mg kg dieta}^{-1}$ se vio marcado. Este comportamiento se mantuvo durante 15 y 21 días de exposición al Pb. La alteración en los niveles de COL podría deberse

a los efectos nocivos del Pb sobre la membrana celular y a elevados niveles de estrés [223], ya que el Pb activa la oxidación de lípidos en la membrana. Esto concuerda con estudios experimentados con hierro, que han mostrado alteraciones en las características físicas de la membrana celular; además de estimular el potencial oxidante de las ROS. Por lo tanto, sugerimos que el incremento en los niveles de COL son buenos indicadores de estrés ambiental en peces [7,42]. Por otro lado, en este estudio, los valores aumentados de BILT, BILD y TGO están relacionados con la hepatotoxicidad. Esto concuerda con el estudio de Ullah et al. [224] realizado en mahseer donde el nivel de BILT aumentó debido a la bioacumulación de Pb. La exposición prolongada de los peces a metales pesados puede causar la muerte al obstaculizar las actividades de TGO y TGP [225]. Por lo tanto, la trucha arcoíris mostró un comportamiento propio en términos de enzimas transaminasas, aumentando y disminuyendo los valores de TGP. Fazio et al. [220] reportaron resultados similares a los obtenidos en este estudio sugiriendo que el aumento de los niveles de TGP en trucha arcoíris es significativo para determinar los niveles de daño en el tejido hepático y las funciones celulares. Esto concuerda con Annamalai et al. [226] donde informaron lesión celular hepática por niveles de TGO y TGP aumentados en bagre en el transcurso de siete días de exposición a MP. Nuestros resultados sugieren que el Pb causó una función hepática anormal en la trucha, especialmente en el comportamiento de sus transaminasas. Estos biomarcadores podrían analizarse en futuras investigaciones ya que son necesarios nuevos estudios para comprender de mejor forma su actividad protectora.

4.3. Expresión de genes.

Se ha documentado que los MTs son moléculas quelantes de metales que previenen el desequilibrio de los sistemas antioxidantes y, en consecuencia, la peroxidación lipídica [227]. Por otro lado, la superfamilia de genes CYP al igual que las MTs está involucrada en la desintoxicación de sustancias químicas exógenas como los son los MP [228]. Este estudio muestra una sobreexpresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27* en el hígado de trucha arcoíris. Estos resultados no concuerdan con los observados en otros estudios como, por ejemplo, Santos et al. [229] reportaron en trucha arcoíris una represión significativa de los genes implicados en la desintoxicación (*gst*, *mt1* y *mt2*). Shekh et al. [230] reportaron una expresión disminuida de *mt-a* y *mt-b*, además, del hecho de que el Pb es un potente inhibidor de las enzimas CYP al promover la conversión de CYP a su forma inactiva, suprimiendo la expresión del gen CYP y la actividad catalítica de *cyp1a* [231]. Yang et al.

[232] también reportaron una disminución en la expresión de *cyp1a*, *cyp2aa1*, *cyp2aa2*, *cyp2k6*, *cyp2k18*, *cyp2y3*, *cyp3a65*, *cyp3c1* y *cyp3c4* en pez cebra. Sin embargo, se han obtenido diferentes resultados en otras especies. Por ejemplo, el tratamiento con 25 μ M de Pb^{2+} provocó una elevación de *cyp1a* en el pez cebra, mientras que la adición de 50 μ M de Pb^{2+} aumentó aún más los valores de *cyp1a* [233]. Por otro lado, se encontraron correlaciones positivas entre la dieta con Pb y la expresión de *mt-a* y *mt-b*, lo que apunta un papel de desintoxicación activo. Una correlación significativa de la dieta con Pb con *cyp1a*, *cyp2k1* y *cyp2m1* fue obtenida sugiriendo cambios metabólicos más amplios, indicando respuestas de estrés activadas por la dieta con Pb.

4.4. Citoquinas.

La familia IL es una parte esencial de las citoquinas que participan en la mediación de la enfermedad inflamatoria [234]. Las citoquinas proinflamatorias, secretadas al comienzo de una respuesta inflamatoria, incluyen las interleucinas *il-1*, *il-6*, *il-8* y *tnf- α* [235], que están involucradas en el dolor patológico; mientras que las citoquinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor *il-1*, *il-4*, *il-10*, *il-11* e *il-13* se producen para controlar las acciones de las citoquinas proinflamatorias [236]. En este estudio, *il-21*, *tnf- α* , *inf-1* e *il-6*, analizados en el bazo y RC en trucha arcoíris mostraron una sobreexpresión como respuesta al aumento de la concentración de Pb y el paso de los días. Así, resultados similares en carpa fueron reportados por Zhang et al. [237] donde *il-21* muestra la capacidad de inducir la expresión de varias citoquinas, incluyendo *ifn- γ* , *il-10*, *il-6*, *tnf- α* e *il-1 β* , indicando el efecto pleiotrópico de *il-21* en la inmunidad. Además, Zhang et al. [238] atribuyeron que el uso de Cd en la carpa provocó un aumento de *il-6*. Estudios futuros deberían analizar la respuesta de la trucha arcoíris a las 72 horas después de la exposición al Pb ya que, Wang et al. [239] reportaron que *IL-21* estimulada por la actividad de MP induce una rápida y duradera respuesta (4-72 h) de la expresión de *ifn-g*, *il-10* e *il-22* en las células de trucha arcoíris, pero tiene pocos efectos sobre la expresión de otras citoquinas estudiadas. Nuestra investigación descubre relaciones intrincadas entre la exposición a la dieta con Pb y la correlación con genes en el bazo y el RC de la trucha arcoíris. Las correlaciones observadas en bazo y RC evidencian una correlación positiva de los genes *il-21*, *tnf- α* , *inf-1* e *il-6* con la dieta con Pb, sugiriendo mecanismos potenciales del impacto toxicológico del Pb. Específicamente, *tnf- α* , que es conocido por su papel en la inflamación y la respuesta inmunitaria se correlaciona positivamente no solo con la dieta con Pb sino también con *il-21*. Esta interacción intrincada podría sugerir una

respuesta inmunitaria orquestada a la toxicidad del Pb. Además, el factor tiempo también se correlacionó significativamente de manera positiva con varios genes, lo que podría sugerir que a corto y a largo plazo contribuyen a los cambios en la expresión genética.

4.5. Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT).

El sistema inmunológico mucoso de los vertebrados reúne una amplia gama exclusiva de células y moléculas inmunitarias innatas y adaptativas (biológicamente activas) que actúan en conjunto para proteger al huésped contra patógenos y/o estresores. Así, un componente importante del tejido linfoide está asociado con el moco, formando el MALT [186]. El MALT en los peces está compuesto principalmente por el intestino, la piel y las branquias que están continuamente expuestas a patógenos y contaminantes ambientales. Además, la inmunidad de las mucosas juega un papel de defensa significativa contra los intrusos, ya que protege al cuerpo del primer contacto con los antígenos [203]. Este estudio se centró en el Pb consumido mediante la dieta por estar menos estudiado que el Pb transmitido por el agua [240]. Por otro lado, existe un creciente interés en comprender las respuestas inmunitarias provocadas por la exposición al Pb en varias especies como trucha arcoíris. Sin embargo, hasta la fecha, existe información limitada sobre el comportamiento de genes como *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* ante dicha exposición en el intestino, la piel y las branquias.

4.6. Intestino.

El intestino es la ruta más importante de captación de MP esenciales en los peces y parece ocurrir a través de un mecanismo diferente a la captación de metales branquiales [241]. En este estudio, se mantuvo a la trucha arcoíris durante 15 (primera vez) y 21 (segunda vez) días con una dieta con Pb la disminución de la expresión del gen *igm* fue notable durante la primera exposición, posteriormente este gen mostró una sobreexpresión a los 21 días, en este sentido, posiblemente indicando una respuesta inmunológica inicial en el tejido gastrointestinal de la trucha como mecanismo de defensa contra el Pb. Esto concuerda con el hecho de que la *igm* juega un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota en los sitios mucosos [199]. Además, la dieta con Pb correlaciona negativamente con la *igm* y la *igt*, lo que sugiere que la microbiota intestinal juega un papel importante en la promoción de la digestión y la absorción, el mantenimiento de las funciones fisiológicas del tracto intestinal y la regulación de la inmunidad [242]. Asimismo, la disminución de la expresión de la *igt* a la concentración baja (dieta 120) y la sobreexpresión a la concentración

alta (dieta 240) de Pb podría sugerir supresión inmunitaria. Por esta razón, pensamos que *la igt* también puede jugar un papel importante como mecanismo de defensa contra el Pb en el intestino de la trucha arcoíris. Estos hallazgos están relacionados directamente con el hecho de que la *igt* al ser una sIg especializada en la inmunidad de la mucosa se mantiene de forma activa brindando protección en el intestino de la trucha arcoíris frente al Pb [199]. Sin embargo, la sobreexpresión de *igt* a los 21 días considera una respuesta inmunitaria comprometida con la exposición prolongada a Pb. Además, estos resultados son consistentes con una alteración directa de la microbiota intestinal ya que la *sigt* también tiene funciones en el control de la homeostasis de la microbiota por las sIgs mucosas en teleósteos [243]. Nuestros resultados demostraron que la sobreexpresión en los niveles de *ctsD* podría estar relacionada con una respuesta al estrés celular [244]. En este contexto, el comportamiento de *ctsD* podría estar dado por la activación de metaloproteasas contra Pb, lo que coincide con Cho et al. [245] los cuales reportaron inhibición de proteasas donde la enzima activadora de *ctsD* inducida en el moco de bagres heridos fue reprimida por el efecto tóxico de este metal. En vertebrados, las metaloproteasas, que se expresan o liberan en respuesta a una lesión, enfermedad o inflamación, suelen estar asociadas a la respuesta inmunitaria y la reparación tisular. Sin embargo, la metaloproteasa funciona en la defensa de la mucosa intestinal regulando la actividad de las defensinas [42,43]. Hasta la fecha, varias clases de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo *Toll* (TLR), han sido caracterizados por muchas especies, incluidos humanos, roedores, aves y peces teleósteos [246]. En este nivel, la expresión de los genes *tlr3* y *tlr9* se sobreexpresó de manera significativa, lo que implica el impacto peligroso del Pb en la respuesta inmunitaria innata en el tejido gastrointestinal. Al mismo tiempo, este hecho podría estar relacionado con el daño causado por el Pb a la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) que es una proteína adaptadora importante en respuesta a la señalización de la microbiota como los lipopolisacáridos (LPS) responsables de activar varias respuestas inmunitarias en la vía de TLR [247]. Desafortunadamente, no se define en qué medida estos cambios en la expresión genética interactúan directa o indirectamente con el Pb.

4.7. Piel.

En particular, los peces teleósteos representan los vertebrados óseos vivos más antiguos que revelan un sistema inmunitario asociado a la piel y contienen inmunoglobulinas [294]. Por lo tanto, la mucosa de la piel se considera la primera línea de defensa contra una amplia

variedad de patógenos y estresores ambientales [186,248]. Como ejemplo, la piel de trucha arcoíris exhiben actividades vibriostáticas y vibriocidas, por lo tanto, desempeñan un papel de defensa antimicrobiana. Además, al no tener escamas secreta grandes cantidades de moco que compensan la falta de estas y ayuda a combatir condiciones de estrés que pudieran provocar los MP [249]. En nuestro estudio, un hallazgo clave fue la sobreexpresión (15 días) de los niveles de *igm*. Concretamente, la sobreexpresión de *igm* es consistente con la respuesta primaria temprana que se activa contra contaminantes y antígenos [194]. Nuestro resultado concuerda con el hecho de que, aunque las *igm* de células B están presentes en porcentajes bajos en piel de trucha, representan el principal subconjunto de inmunoglobulinas en incrementarse en este tejido frente al daño provocado por MP [194].

Después de la infección, los títulos específicos de *igt* para patógenos son altamente prevalentes en el moco y piel [250], lo que sugiere el mismo comportamiento frente al daño por MP. En concreto, nuestro estudio identificó una disminución de los niveles de expresión de *igt*, que concuerdan con la idea de que la *igt* en la piel también está implicada en la supresión de la respuesta inmunitaria, siendo coherente con el hecho de que la *igt* desempeña un papel significativo en la respuesta inmunitaria de las mucosas en los peces [251]. Nuestros resultados parecen sugerir una respuesta inmunitaria comprometida a la exposición al Pb, en consonancia con investigaciones anteriores que destacan la toxicidad del Pb en la modulación de la respuesta inmunitaria. En el caso de *ctsD*, la sobreexpresión en las dos concentraciones probadas y la correlación positiva entre *igt* y *ctsD* pueden indicar estrés celular y procesos de degradación de proteínas en la piel. Además, se ha visto una posible apoptosis celular ante la infección por parásitos [252], lo que nos llevaría a pensar que esta apoptosis también podría ocurrir ante el efecto tóxico del Pb. Este comportamiento mostrado por *ctsD* es similar al mostrado con las infecciones bacterianas, sirviendo como una defensa antimicrobiana innata aguda contra patógenos invasores en los peces [253]. Por otro lado, publicaciones recientes han demostrado que se puede encontrar una amplia gama de diferentes TLR en los peces [254]. En el pez globo el TLR3 se asoció con el reconocimiento de dsRNA de tamaño relativamente corto y se demostró que el TLR 9 era un receptor para el ADN bacteriano rico en CpG [255]. Por lo tanto, comprender los mecanismos de defensa inmunitaria innata de los genes TLR puede contribuir al desarrollo de técnicas saludables para el control de enfermedades provocada por el Pb [256]. Cornet et al. [257] determinaron en trucha que el Cd reduce la expresión del gen *tlr9*. De acuerdo con esto, la disminución de la expresión (15 días) y la sobreexpresión (21 días) de los niveles de *tlr3* y *tlr9* en nuestro estudio podrían

estar asociados con una respuesta inflamatoria, ya que los TLR pueden activar los macrófagos residentes en los tejidos para producir citocinas inflamatorias en piel [258]. Además, la función principal de TLR3 es detectar infecciones virales [259], lo que indicaría que esta vía de defensa viral es compartida o asociada con la defensa contra el Pb. Considerando el enfoque aplicado, nuestros resultados podrían indicar que los genes *ctsD*, *tlr3* y *tlr9* están vinculados a la respuesta inmunitaria y a los procesos de estrés celular ya que el Pb altera la expresión de estos genes en la piel de la trucha arcoíris.

4.8. Branquias.

Las branquias de los peces son los órganos primarios para el intercambio gaseoso, la osmorregulación y los mecanismos de desintoxicación en los peces. En particular, el riesgo de acumulación de MP a través de la absorción branquial es mayor que la absorción intestinal [57-58]. Los patrones de expresión génica en el tejido branquial de la trucha arcoíris expuesto a diversas concentraciones de Pb arrojan conocimientos biológicos intrigantes. Además, hay muy pocos estudios disponibles en los que se hayan estudiado algunos de estos genes en peces expuestos a MP. Por lo tanto, nuestros resultados evidenciaron una sobreexpresión temprana de *igm*, lo que podría estar relacionado con el hecho de que el Pb altera la respuesta inmunitaria sistémica de la trucha este resultado sugiere el daño causado por el Pb en este tejido, alterando la respiración de los peces [260]. También concuerda con los resultados reportados por Siwei et al. [261] donde la tilapia del Nilo fue desafiada contra bacterias patógenas, se podría decir que esta sobreexpresión mostrada por *igm* en los peces es un mecanismo de defensa compartido tanto para las bacterias como para el Pb. Como se sabe la *igt/z* está especializada en la inmunidad de las mucosas [262]. En este estudio, la expresión del gen *igt* mostró una sobreexpresión a ambas concentraciones de Pb (120 y 240 mg kg dieta⁻¹) a los 15 días. Por el contrario, se observó una disminución de este gen a los 21 días para ambas concentraciones de Pb, lo que podría indicar una alteración de la microbiota branquial de la trucha arcoíris derivada del mecanismo de respuesta inmunitaria de las mucosas contra el Pb ya que un estudio reciente en trucha arcoíris mostró que la *igt* secretora en la superficie de la mucosa branquial es funcionalmente análoga a la *iga* de los mamíferos en términos de eliminación de patógenos y hemostasia [263]. Además, la *igm* mostró una correlación positiva con la *igt*. Esto podría significar una respuesta inmunitaria de las mucosas mejorada en el tejido branquial. La expresión de *igt* puede ser particularmente sensible a la exposición al Pb, con respuestas tanto agudas como retardadas. En este estudio,

el comportamiento tanto de la *igm* como de la *igt* frente a la dieta con Pb podría estar estrechamente relacionado con el componente secretor de la trucha, que está asociado con la *igt* y la *igm* en el moco de todos estos sitios secretores de mucosa [264]. Por otro lado, la exposición a Pb puede inducir estrés celular [265], siguiendo esta hipótesis, en términos de expresión de *ctsD*, la concentración de 120 mg kg dieta⁻¹ a los 15 días mostró una sobreexpresión, contrariamente a la reducción de la expresión mostrada en las dos concentraciones probadas a los 21 días, lo que sugiere que el Pb modula la expresión de *ctsD* causando estrés celular en el tejido branquial. Con respecto a las expresiones de los genes *tlr3* y *tlr9*, cuya expresión disminuye con el tiempo de exposición y la correlación positiva de *igt* con los genes *ctsD*, *tlr3* y *tlr9*, indicaría que la exposición a Pb podría afectar el reconocimiento preciso y la respuesta inmunitaria mediada por receptores de este tipo [266]. Además, los cambios observados indican una supresión inmunitaria inicial seguida de una respuesta compensatoria. Esto también se refleja en la presencia de una población muy grande de PRR en estos animales, incluidos TLR, los receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, receptor tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), receptor tipo NOD (NLR), los receptores del gen inducible por ácido retinoico I (tipo RIG-I), (RLR) y los receptores de lectina tipo C (CLC), que pueden estar asociados con la capacidad de estas células para adquirir memoria inmunológica [267].

5. CONCLUSIONES.

Este estudio proporciona evidencia detallada del impacto de la dieta con plomo sobre la trucha arcoíris, así las alteraciones de los parámetros hematológicos confirman un efecto tóxico sistémico con repercusiones hematopoyéticas claras. Asimismo, el aumento proporcional de biomarcadores bioquímicos reflejan una disrupción metabólica y hepática progresiva. En términos moleculares, se confirma la alteración de genes de detoxificación e inflamación especialmente en fases tardías de la exposición al Pb (15-21 días), lo cual sugiere una inflamación persistente y posiblemente crónica. Este trabajo también aclara sesgos relacionados a la respuesta inmunitaria de MALT, estas respuestas indican que las inmunoglobulinas mucosales no solo participan en defensa frente a patógenos, sino también ante metales pesados como el Pb, contribuyendo al entendimiento de las vías inmunológicas activadas en contextos no infecciosos.

1. La exposición al Pb, a través de la dieta, produjo alteraciones fisiológicas con impacto en el transporte de oxígeno, revelado por disminución en los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito.
2. La dieta suplementada con Pb causó daño hepático severo en la trucha arcoíris manifestado por el incremento de TGO y la disminución de TGP.
3. En el hígado, el proceso de desintoxicación fue afectado por el Pb observando la sobreexpresión de los genes *mt-a*, *mt-b*, *cyp1a*, *cyp2k1*, *cyp2m1* y *cyp3a27*. Simultáneamente se generó una respuesta inflamatoria severa en el bazo y en riñón cefálico en los animales expuestos, marcada por la sobreexpresión de los genes *il-21*, *tnf-α*, *infl* e *il-6*.
4. La homeostasis de la microbiota intestinal sufrió alteraciones por la dieta con Pb, revelado por la disminución inicial y posterior sobreexpresión de los genes *igm* e *igt*.
5. La piel de la trucha arcoíris tuvo una respuesta inmunológica activa de protección en los animales expuestos, mediante la sobreexpresión temprana de los genes *igm* y *ctsD*.
6. La expresión de genes en branquias estudiada en los animales expuestos evidencia un daño oxidativo a los 15 días, debido a la observación de una respuesta de defensa activa por la sobreexpresión de los genes *igm*, *igt*, *ctsD*, *tlr3*, y *tlr9*.

6. REFERENCIAS.

- [1] A. C. Bosch, B. O'Neill, G. O. Sigge, S. E. Kerwath, y L. C. Hoffman, «Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review», *J Sci Food Agric*, vol. 96, n.º 1, pp. 32-48, ene. 2016, doi: 10.1002/jsfa.7360.
- [2] S. Sharma y S. Chatterjee, «Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review», *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 24, n.º 27, pp. 21530-21547, sep. 2017, doi: 10.1007/s11356-017-9910-8.
- [3] E. Has-Schön, I. Bogut, R. Vuković, D. Galović, A. Bogut, y J. Horvatić, «Distribution and age-related bioaccumulation of lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and European catfish (*Sylurus glanis*) from the Buško Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina)», *Chemosphere*, vol. 135, pp. 289-296, sep. 2015, doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.015.
- [4] J. Guo, Y. Pu, L. Zhong, K. Wang, X. Duan, y D. Chen, «Lead impaired immune function and tissue integrity in yellow catfish (*Peltobargus fulvidraco*) by mediating oxidative stress, inflammatory response and apoptosis», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 226, p. 112857, dic. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112857.
- [5] L. Ai, B. Ma, S. Shao, L. Zhang, y L. Zhang, «Heavy metals in Chinese freshwater fish: Levels, regional distribution, sources and health risk assessment», *Science of The Total Environment*, vol. 853, p. 158455, dic. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158455.
- [6] H. Sheikhzadeh y A. H. Hamidian, «Bioaccumulation of heavy metals in fish species of Iran: a review», *Environ Geochem Health*, vol. 43, n.º 10, pp. 3749-3869, oct. 2021, doi: 10.1007/s10653-021-00883-5.
- [7] H. Liu, S. Zhang, M. Qiu, A. Wang, J. Ye, y S. Fu, «Garlic (*Allium sativum*) and Fu-ling (*Poria cocos*) mitigate lead toxicity by improving antioxidant defense mechanisms and chelating ability in the liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)», *Ecotoxicology*, vol. 30, n.º 5, pp. 885-898, jul. 2021, doi: 10.1007/s10646-021-02405-6.
- [8] S. H. Junejo, J. A. Baig, T. G. Kazi, y H. I. Afridi, «Cadmium and Lead Hazardous Impact Assessment of Pond Fish Species», *Biol Trace Elem Res*, vol. 191, n.º 2, pp. 502-511, oct. 2019, doi: 10.1007/s12011-018-1628-z.

- [9] T. W. Davies, J. P. Duffy, J. Bennie, y K. J. Gaston, «The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution», *Frontiers in Ecology and the Environment*, vol. 12, n.º 6, pp. 347-355, 2014, doi: 10.1890/130281.
- [10] T. Sizmur, J. Canário, S. Edmonds, A. Godfrey, y N. J. O'Driscoll, «The polychaete worm *Nereis diversicolor* increases mercury lability and methylation in intertidal mudflats», *Environ Toxicol Chem*, vol. 32, n.º 8, pp. 1888-1895, ago. 2013, doi: 10.1002/etc.2264.
- [11] L. F. B. Marangoni *et al.*, «Impacts of artificial light at night in marine ecosystems—A review», *Glob Chang Biol*, vol. 28, n.º 18, pp. 5346-5367, sep. 2022, doi: 10.1111/gcb.16264.
- [12] M. Ebrahimi, N. Khalili, S. Razi, M. Keshavarz-Fathi, N. Khalili, y N. Rezaei, «Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression», *J Environ Health Sci Eng*, vol. 18, n.º 1, pp. 335-343, feb. 2020, doi: 10.1007/s40201-020-00455-2.
- [13] Y. Jia, L. Wang, Z. Qu, C. Wang, y Z. Yang, «Effects on heavy metal accumulation in freshwater fishes: species, tissues, and sizes», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 24, n.º 10, pp. 9379-9386, abr. 2017, doi: 10.1007/s11356-017-8606-4.
- [14] D. Alsop, T. Y.-T. Ng, M. J. Chowdhury, y C. M. Wood, «Interactions of waterborne and dietborne Pb in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Bioaccumulation, physiological responses, and chronic toxicity», *Aquatic Toxicology*, vol. 177, pp. 343-354, ago. 2016, doi: 10.1016/j.aquatox.2016.06.007.
- [15] A. Hanano, I. Almousally, M. Shaban, F. Rahman, E. Blee, y D. J. Murphy, «Biochemical, Transcriptional, and Bioinformatic Analysis of Lipid Droplets from Seeds of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Their Use as Potent Sequestration Agents against the Toxic Pollutant, 2,3,7,8-Tetrachlorinated Dibenzo-p-Dioxin», *Front Plant Sci*, vol. 7, p. 836, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00836.
- [16] O. F. Fagbohun, C. R. Gillies, K. P. J. Murphy, y H. P. V. Rupasinghe, «Role of Antioxidant Vitamins and Other Micronutrients on Regulations of Specific Genes and Signaling Pathways in the Prevention and Treatment of Cancer», *Int J Mol Sci*, vol. 24, n.º 7, p. 6092, mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24076092.
- [17] G. Atli, E. G. Canli, A. Eroğlu, Z. Dogan, y M. Canli, «Cadmium and Lead Alter the Antioxidant and Osmoregulation Systems in the Erythrocyte of Fish (*Oreochromis niloticus*)», *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, jun. 2016, Accedido: 17 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Cadmium-and-Lead-Alter-the-Antioxidant-and-Systems-Atli-Canli/5de64ddc1c1677a58d8e6f7e2a6eceb8dd7a214>

- [18] I.-K. Hwang, K.-W. Kim, J.-H. Kim, y J.-C. Kang, «Toxic effects and depuration after the dietary lead(II) exposure on the bioaccumulation and hematological parameters in starry flounder (*Platichthys stellatus*)», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 45, pp. 328-333, jul. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.06.017.
- [19] A. Eroglu, Z. Dogan, E. G. Kanak, G. Atli, y M. Canli, «Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 22, n.º 5, pp. 3229-3237, mar. 2015, doi: 10.1007/s11356-014-2972-y.
- [20] A. Ishaque, S. Ishaque, A. Arif, y H. G. Abbas, «TOXIC EFFECTS OF LEAD ON FISH AND HUMAN», *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, vol. 2020, n.º 1, Art. n.º 1, dic. 2020, doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.47.
- [21] F. Hölker *et al.*, «11 Pressing Research Questions on How Light Pollution Affects Biodiversity», *Front. Ecol. Evol.*, vol. 9, dic. 2021, doi: 10.3389/fevo.2021.767177.
- [22] H. M. Sharaf y A. M. Shehata, «Heavy metals and hydrocarbon concentrations in water, sediments and tissue of *Cyclope neritea* from two sites in Suez Canal, Egypt and histopathological effects», *J Environ Health Sci Eng*, vol. 13, p. 14, 2015, doi: 10.1186/s40201-015-0171-5.
- [23] V. Curcio, R. Macirella, S. Sesti, D. Pellegrino, A. I. M. Ahmed, y E. Brunelli, «Morphological and Molecular Alterations Induced by Lead in Embryos and Larvae of *Danio rerio*», *Applied Sciences*, vol. 11, n.º 16, p. 7464, ago. 2021, doi: 10.3390/app11167464.
- [24] D. Savoca y A. Pace, «Bioaccumulation, Biodistribution, Toxicology and Biomonitoring of Organofluorine Compounds in Aquatic Organisms», *Int J Mol Sci*, vol. 22, n.º 12, p. 6276, jun. 2021, doi: 10.3390/ijms22126276.
- [25] P. de Almeida Rodrigues, R. G. Ferrari, L. S. Kato, R. A. Hauser-Davis, y C. A. Conte-Junior, «A Systematic Review on Metal Dynamics and Marine Toxicity Risk Assessment Using Crustaceans as Bioindicators», *Biol Trace Elem Res*, vol. 200, n.º 2, pp. 881-903, feb. 2022, doi: 10.1007/s12011-021-02685-3.
- [26] D. V. Nguyen, B. S. Malau-Aduli, J. Cavalieri, P. D. Nichols, y A. E. O. Malau-Aduli, «Supplementation with plant-derived oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids for lamb production», *Veterinary and Animal Science*, vol. 6, pp. 29-40, dic. 2018, doi: 10.1016/j.vas.2018.08.001.

- [27] M. J. Zapata, S. M. P. Sullivan, y S. M. Gray, «Artificial Lighting at Night in Estuaries—Implications from Individuals to Ecosystems», *Estuaries and Coasts*, vol. 42, n.º 2, pp. 309-330, mar. 2019, doi: 10.1007/s12237-018-0479-3.
- [28] D. Ramon *et al.*, «A survey of arsenic, mercury, cadmium, and lead residues in seafood (fish, crustaceans, and cephalopods) from the south-eastern Mediterranean Sea», *J Food Sci*, vol. 86, n.º 3, pp. 1153-1161, mar. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15627.
- [29] F. Emon *et al.*, «Bioaccumulation and Bioremediation of Heavy Metals in Fishes-A Review», *Toxics*, vol. 11, p. 510, jun. 2023, doi: 10.3390/toxics11060510.
- [30] L. F. Oya-Silva *et al.*, «Tissue-specific genotoxicity and antioxidant imbalance of titanium dioxide nanoparticles (NPTiO₂) and inorganic lead (PbII) in a neotropical fish species», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 82, p. 103551, feb. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2020.103551.
- [31] H. Ali y E. Khan, «Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health», *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, vol. 25, n.º 6, pp. 1353-1376, ago. 2019, doi: 10.1080/10807039.2018.1469398.
- [32] J. Kim, C. W. Oh, y J. Kang, «Antioxidant Responses, Neurotoxicity, and Metallothionein Gene Expression in Juvenile Korean Rockfish *Sebastes schlegelii* under Dietary Lead Exposure», *J Aqua Anim Hlth*, vol. 29, n.º 2, pp. 112-119, jun. 2017, doi: 10.1080/08997659.2017.1307286.
- [33] N. S. Aljohani *et al.*, «Bioaccumulation of heavy metals in fish collected from the Eastern Coast of Saudi Arabia and Human Health Implications», *Regional Studies in Marine Science*, vol. 62, p. 102986, sep. 2023, doi: 10.1016/j.rsma.2023.102986.
- [34] M. Kumar, S. Singh, A. Jain, S. Yadav, A. Dubey, y S. P. Trivedi, «A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes», *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 83, p. 127377, may 2024, doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127377.
- [35] V. Curcio *et al.*, «Morphological and Functional Alterations Induced by Two Ecologically Relevant Concentrations of Lead on *Danio rerio* Gills», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n.º 16, Art. n.º 16, ene. 2022, doi: 10.3390/ijms23169165.

- [36] Z. O. Ojekunle, A. A. Adeyemi, A. M. Taiwo, S. A. Ganiyu, y M. A. Balogun, «Assessment of physicochemical characteristics of groundwater within selected industrial areas in Ogun State, Nigeria», *Environmental Pollutants and Bioavailability*, vol. 32, n.º 1, pp. 100-113, ene. 2020, doi: 10.1080/26395940.2020.1780157.
- [37] R. A. Hauser-Davis, *Lead, Mercury and Cadmium in the Aquatic Environment: Worldwide Occurrence, Fate and Toxicity*, 1st ed.
- [38] Z. Jiang *et al.*, «Metal concentrations and risk assessment in water, sediment and economic fish species with various habitat preferences and trophic guilds from Lake Caizi, Southeast China», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 157, pp. 1-8, ago. 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.078.
- [39] T. Chouvelon *et al.*, «Patterns of trace metal bioaccumulation and trophic transfer in a phytoplankton-zooplankton-small pelagic fish marine food web», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 146, pp. 1013-1030, sep. 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.07.047.
- [40] Q. Ahmed, S. Benzer, Q. M. Ali, y A. B. Baloch, «Accumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Mn, Cd and Pb) in mullets (Valenciennes, 1836) and (Quoy & Gaimard, 1825) from Damb Harbor, Balochistan, Pakistan», *Oceanological and Hydrobiological Studies*, vol. 49, n.º 2, pp. 140-146, jun. 2020, doi: 10.1515/ohs-2020-0013.
- [41] O. Sarkar, K. K. Dey, S. Islam, y A. Chattopadhyay, «Lead and Aquatic Ecosystems, Biomarkers, and Implications for Humankind», en *Biomarkers in Toxicology*, V. B. Patel, V. R. Preedy, y R. Rajendram, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2023, pp. 961-988. doi: 10.1007/978-3-031-07392-2_58.
- [42] M. Latif *et al.*, «Bioaccumulation of lead in different organs of *Ctenopharyngodon Idella* (grass fish) and *Tor putitora* (Mahseer) fish», *Braz. J. Biol.*, vol. 84, p. e260355, abr. 2022, doi: 10.1590/1519-6984.260355.
- [43] A.-W. A. Abdel-Warith, E.-S. M. I. Younis, N. A. Al-Asgah, A. M. Rady, y H. Y. Allam, «Bioaccumulation of lead nitrate in tissues and its effects on hematological and biochemical parameters of *Clarias gariepinus*», *Saudi J Biol Sci*, vol. 27, n.º 3, pp. 840-845, mar. 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.015.
- [44] J.-H. Kim y J.-C. Kang, «Effects of sub-chronic exposure to lead (Pb) and ascorbic acid in juvenile rockfish: Antioxidant responses, MT gene expression, and neurotransmitters», *Chemosphere*, vol. 171, pp. 520-527, mar. 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.12.094.

- [45] S. P. Lall y S. J. Kaushik, «Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish», *Animals*, vol. 11, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2021, doi: 10.3390/ani11092711.
- [46] K. Renu *et al.*, «Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review», *Chemosphere*, vol. 271, p. 129735, may 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735.
- [47] L. Zhao, Y.-G. Zheng, Y.-H. Feng, M.-Y. Li, G.-Q. Wang, y Y.-F. Ma, «Toxic effects of waterborne lead (Pb) on bioaccumulation, serum biochemistry, oxidative stress and heat shock protein-related genes expression in *Channa argus*», *Chemosphere*, vol. 261, p. 127714, dic. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127714.
- [48] J.-W. Lee *et al.*, «Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 68, pp. 101-108, may 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.010.
- [49] M. Shahjahan, K. Taslima, M. S. Rahman, M. Al-Emran, S. I. Alam, y C. Faggio, «Effects of heavy metals on fish physiology – A review», *Chemosphere*, vol. 300, p. 134519, ago. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134519.
- [50] M. S. Wagh, W. J. Osborne, y S. Sivarajan, «Toxicity assessment of lead, nickel and cadmium on zebra fish augmented with *Bacillus xiamenensis* VITMSJ3: An insight on the defense mechanism against oxidative stress due to heavy metals», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 177, p. 113830, jul. 2023, doi: 10.1016/j.fct.2023.113830.
- [51] A. N. Cordeli (Săvescu), L. Oprea, M. Crețu, L. Dediu, M. T. Coadă, y D.-N. Mînzală, «Bioaccumulation of Metals in Some Fish Species from the Romanian Danube River: A Review», *Fishes*, vol. 8, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2023, doi: 10.3390/fishes8080387.
- [52] Z. Wang *et al.*, «Early-life lead exposure induces long-term toxicity in the central nervous system: From zebrafish larvae to juveniles and adults», *Science of The Total Environment*, vol. 804, p. 150185, ene. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150185.
- [53] J.-H. Kim y J.-C. Kang, «The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 115, pp. 33-39, may 2015, doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.02.009.
- [54] N. Paul y M. Sengupta, «Lead induced overactivation of phagocytes and variation in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in intestinal macrophages of

- <i>Channa punctatus</i>; en *Modern Research in Inflammation*, 2013, pp. 28-35. doi: 10.4236/mri.2013.22004.
- [55] M. Hussain, M. A. Hossain, M. Begum, y N. C. Roy, «Freshwater mussel (*Lamelliedens marginalis*) to reduce the lead (Pb) bioaccumulation in aquaculture of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*», *Journal of Applied Aquaculture*, vol. 35, n.º 3, pp. 605-621, jul. 2023, doi: 10.1080/10454438.2021.2010630.
- [56] A. Khyber *et al.*, «Bioaccumulation of Heavy Metals in Fresh Water Fish, (*Cyprinus carpio*) Netted from Kabul River», nov. 2021.
- [57] J. Yin, L. Wang, Q. Liu, S. Li, J. Li, y X. Zhang, «Metal concentrations in fish from nine lakes of Anhui Province and the health risk assessment», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, n.º 16, pp. 20117-20124, jun. 2020, doi: 10.1007/s11356-020-08368-1.
- [58] M. Pandey, A. K. Pandey, A. Mishra, y B. D. Tripathi, «Assessment of metal bioaccumulation in *Mastacembelus armatus* (eel) and exposure evaluation in human», *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, vol. 7, pp. 103-109, may 2017, doi: 10.1016/j.enmm.2017.02.002.
- [59] Q. Ahmed, S. Benzer, y N. Elahi, «Heavy metal concentration in *Sardinella longiceps* (Valeciennes, 1847) from Balochistan coast.», *Pakistan Journal of Zoology*, 2016, Accedido: 5 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Heavy-metal-concentration-in-Sardinella-longiceps-Ahmed-Benzer/c21b55b02a3954e89881f8a3e2d86db5ccb54773>
- [60] P. Li *et al.*, «Heavy metal bioaccumulation and health hazard assessment for three fish species from Nansi Lake, China», *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 94, n.º 4, pp. 431-436, abr. 2015, doi: 10.1007/s00128-015-1475-y.
- [61] V. Curcio, R. Macirella, S. Sesti, D. Pellegrino, A. I. M. Ahmed, y E. Brunelli, «Morphological and Molecular Alterations Induced by Lead in Embryos and Larvae of *Danio rerio*», *Applied Sciences*, vol. 11, n.º 16, Art. n.º 16, ene. 2021, doi: 10.3390/app11167464.
- [62] H. Liu, S. Fu, S. Zhang, M. Ding, y A. Wang, «Lead induces structural damage, microbiota dysbiosis and cell apoptosis in the intestine of juvenile bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)», *Aquaculture*, vol. 528, p. 735573, nov. 2020, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735573.
- [63] E. Łuszczek-Trojnar, J. Sionkowski, E. Drąg-Kozak, y W. Popek, «Copper and lead accumulation in common carp females during long-term dietary exposure to these

- metals in pond conditions», *Aquaculture Research*, vol. 47, n.º 7, pp. 2334-2348, 2016, doi: 10.1111/are.12689.
- [64] A. O. Abidemi-Iromini, Oluayo. A. Bello-Olusoji, y I. A. Adebayo, «Bioaccumulation of heavy metals in silver catfish (*Chrysichthys nigrodigitatus*) and tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from the brackish and freshwater in South-West, Nigeria», *The Journal of Basic and Applied Zoology*, vol. 83, n.º 1, p. 18, mar. 2022, doi: 10.1186/s41936-022-00272-z.
- [65] Y. Yin *et al.*, «Study of Bioaccumulation, Hematological Parameters, and Antioxidant Responses of *Carassius auratus gibelio* Exposed to Dietary Lead and *Bacillus subtilis*», *Biol Trace Elem Res*, vol. 189, n.º 1, pp. 233-240, may 2019, doi: 10.1007/s12011-018-1447-2.
- [66] C. Song, C. Sun, B. Liu, y P. Xu, «Oxidative Stress in Aquatic Organisms», *Antioxidants*, vol. 12, n.º 6, p. 1223, jun. 2023, doi: 10.3390/antiox12061223.
- [67] J.-W. Lee, A.-H. Jo, D.-C. Lee, C. Y. Choi, J.-C. Kang, y J.-H. Kim, «Review of cadmium toxicity effects on fish: Oxidative stress and immune responses», *Environmental Research*, vol. 236, p. 116600, nov. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116600.
- [68] X.-Q. Gao *et al.*, «Effect of acute exposure to nitrite on physiological parameters, oxidative stress, and apoptosis in *Takifugu rubripes*», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 188, p. 109878, ene. 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109878.
- [69] Z. Yu *et al.*, «Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field», *Nanoscale Res Lett*, vol. 15, p. 115, may 2020, doi: 10.1186/s11671-020-03344-7.
- [70] M. K. Jules Christophe, Y. T. Marlène, N. Valery Jean François, N. N. Merlin, G. Inocent, y N. Mathieu, «Assessment of cooking methods and freezing on the nutritional value and health risks of heavy metals in four fish species consumed in Douala, Cameroon», *Heliyon*, vol. 10, n.º 7, p. e28316, abr. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e28316.
- [71] S. Braz-Mota, D. F. Campos, T. J. MacCormack, R. M. Duarte, A. L. Val, y V. M. F. Almeida-Val, «Mechanisms of toxic action of copper and copper nanoparticles in two Amazon fish species: Dwarf cichlid (*Apistogramma agassizii*) and cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*)», *Science of The Total Environment*, vol. 630, pp. 1168-1180, jul. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.216.

- [72] A. R. Timme-Laragy, R. T. D. Giulio, y J. N. Meyer, «Reactive Oxygen Species and Redox Stress», en *Toxicology of Fishes*, 2.^a ed., CRC Press, 2024.
- [73] J.-H. Kim y J.-C. Kang, «The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As³⁺)», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 39, n.º 2, pp. 668-676, mar. 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.01.012.
- [74] S.-Y. Luo *et al.*, «Scavenging reactive oxygen species is a potential strategy to protect *Larimichthys crocea* against environmental hypoxia by mitigating oxidative stress», *Zool Res*, vol. 42, n.º 5, pp. 592-605, sep. 2021, doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.079.
- [75] O. I. Dar, S. Sharma, K. Singh, A. Sharma, R. Bhardwaj, y A. Kaur, «Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes», *Chemosphere*, vol. 247, p. 125914, may 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125914.
- [76] W. Lin *et al.*, «The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish», *Environmental Pollution*, vol. 235, pp. 197-206, abr. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.059.
- [77] H.-J. Park, I.-K. Hwang, K.-W. Kim, J.-H. Kim, y J.-C. Kang, «Toxic Effects and Depuration on the Antioxidant and Neurotransmitter Responses after Dietary Lead Exposure in Starry Flounder», *J Aquat Anim Health*, vol. 30, n.º 4, pp. 245-252, dic. 2018, doi: 10.1002/aah.10033.
- [78] Y. Yin *et al.*, «Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 161, pp. 755-762, oct. 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.056.
- [79] Z. Xu, J. Cao, X. Qin, W. Qiu, J. Mei, y J. Xie, «Toxic Effects on Bioaccumulation, Hematological Parameters, Oxidative Stress, Immune Responses and Tissue Structure in Fish Exposed to Ammonia Nitrogen: A Review», *Animals (Basel)*, vol. 11, n.º 11, p. 3304, nov. 2021, doi: 10.3390/ani11113304.
- [80] J. D. Biller y L. S. Takahashi, «Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity», *An Acad Bras Cienc*, vol. 90, n.º 4, pp. 3403-3414, 2018, doi: 10.1590/0001-3765201820170730.

- [81] M. Faheem y R. K. Bhandari, «Detrimental Effects of Bisphenol Compounds on Physiology and Reproduction in Fish: A Literature Review», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 81, p. 103497, ene. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2020.103497.
- [82] M. Abdel-Tawwab, M. N. Monier, S. H. Hoseinifar, y C. Faggio, «Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers», *Fish Physiol Biochem*, vol. 45, n.º 3, pp. 997-1013, jun. 2019, doi: 10.1007/s10695-019-00614-9.
- [83] J. K. Das, S. Sarkar, S. U. Hossain, P. Chakraborty, R. K. Das, y S. Bhattacharya, «Diphenylmethyl selenocyanate attenuates malachite green induced oxidative injury through antioxidation & inhibition of DNA damage in mice», *Indian J Med Res*, vol. 137, n.º 6, pp. 1163-1173, jun. 2013.
- [84] M. Strycharz-Dudziak *et al.*, «Total Antioxidant Status (TAS), Superoxide Dismutase (SOD), and Glutathione Peroxidase (GPx) in Oropharyngeal Cancer Associated with EBV Infection», *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2019, p. 5832410, 2019, doi: 10.1155/2019/5832410.
- [85] T. F. Jesus *et al.*, «Different ecophysiological responses of freshwater fish to warming and acidification», *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 216, pp. 34-41, feb. 2018, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.11.007.
- [86] A. Y. Ugya, T. S. Imam, A. Li, J. Ma, y X. Hua, «Antioxidant response mechanism of freshwater microalgae species to reactive oxygen species production: a mini review», *Chemistry and Ecology*, vol. 36, n.º 2, pp. 174-193, feb. 2020, doi: 10.1080/02757540.2019.1688308.
- [87] N. Gopi *et al.*, «Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: Effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune responses», *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 55, pp. 170-179, sep. 2019, doi: 10.1016/j.jtemb.2019.06.011.
- [88] W. Lin *et al.*, «The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish», *Environmental Pollution*, vol. 235, pp. 197-206, abr. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.059.
- [89] S. H. Hoseinifar *et al.*, «Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics», *Reviews in Fisheries Science &*

- Aquaculture*, vol. 29, n.º 2, pp. 198-217, abr. 2021, doi: 10.1080/23308249.2020.1795616.
- [90] K. Mohideen, N. Jeddy, C. Krithika, S. H. Faizee, S. Dhungel, y S. Ghosh, «Assessment of glutathione peroxidase enzyme response and total antioxidant status in oral cancer - Systematic review and meta-analysis», *Cancer Rep (Hoboken)*, vol. 6, n.º 8, p. e1842, ago. 2023, doi: 10.1002/cnr2.1842.
- [91] J. M. Anghinoni *et al.*, «Recent Advances in the Synthesis and Antioxidant Activity of Low Molecular Mass Organoselenium Molecules», *Molecules*, vol. 28, n.º 21, p. 7349, oct. 2023, doi: 10.3390/molecules28217349.
- [92] E. Holzerová y H. Prokisch, «Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?», *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 63, pp. 16-20, jun. 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.021.
- [93] D. Ćupić Miladinović *et al.*, «Recovery of brain cholinesterases and effect on parameters of oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix japonica*) after chlorpyrifos and vitamin B1 administration», *Chemico-Biological Interactions*, vol. 333, p. 109312, ene. 2021, doi: 10.1016/j.cbi.2020.109312.
- [94] J. G. Paithankar, S. Saini, S. Dwivedi, A. Sharma, y D. K. Chowdhuri, «Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction», *Chemosphere*, vol. 262, p. 128350, ene. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128350.
- [95] S. Yilmaz, S. Ergün, M. Yigit, E. Yilmaz, y E. Ahmadifar, «Dietary supplementation of black mulberry (*Morus nigra*) syrup improves the growth performance, innate immune response, antioxidant status, gene expression responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 107, pp. 211-217, dic. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.09.041.
- [96] M. Fatima *et al.*, «*In vivo* induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 176-177, pp. 17-30, oct. 2015, doi: 10.1016/j.cbpc.2015.07.004.
- [97] S. KHAN *et al.*, «Organ-specific antioxidant defenses and FT-IR spectroscopy of muscles in Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental Pb²⁺»,

- Turkish Journal of Biology*, vol. 39, n.º 3, pp. 427-437, ene. 2015, doi: 10.3906/biy-1410-3.
- [98] B. Nunes, R. C. Capela, T. Sérgio, C. Caldeira, F. Gonçalves, y A. T. Correia, «Effects of chronic exposure to lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 21, n.º 8, pp. 5689-5700, abr. 2014, doi: 10.1007/s11356-013-2485-0.
- [99] A. Khalil, A. Jamil, y T. Khan, «Assessment of heavy metal contamination and human health risk with oxidative stress in fish (*Cyprinus carpio*) from Shahpur Dam, Fateh Jang, Pakistan», *Arab J Geosci*, vol. 13, n.º 18, p. 928, sep. 2020, doi: 10.1007/s12517-020-05933-3.
- [100] F. Latif, M. Javed, H. Khan, y K.-U. Rehman, «Lead Induced Oxidative Stress in *Cirrhina mrigala*», *Pakistan Journal of Zoology*, vol. 52, ene. 2020, doi: 10.17582/journal.pjz/20180628120609.
- [101] S. S. Giri *et al.*, «Role of dietary curcumin against waterborne lead toxicity in common carp *Cyprinus carpio*», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 219, p. 112318, ago. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112318.
- [102] J. Dai *et al.*, «Effect of Lead on Antioxidant Ability and Immune Responses of *Crucian Carp*», *Biol Trace Elem Res*, vol. 186, n.º 2, pp. 546-553, dic. 2018, doi: 10.1007/s12011-018-1316-z.
- [103] F. Özkan-Yilmaz, A. Özlüer-Hunt, S. G. Gündüz, M. Berköz, y S. Yalin, «Effects of dietary selenium of organic form against lead toxicity on the antioxidant system in *Cyprinus carpio*», *Fish Physiol Biochem*, vol. 40, n.º 2, pp. 355-363, abr. 2014, doi: 10.1007/s10695-013-9848-9.
- [104] Nosheen, «Toxicological Effects of Heavy Metal (Pb+2) on Peroxidase Activity in Freshwater Fish, *Catla catla*». Accedido: 5 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/337505075_Toxicological_Effects_of_Heavy_Metal_Pb2_on_Peroxidase_Activity_in_Freshwater_Fish_Catla_catla
- [105] L. F. Oya-Silva *et al.*, «Tissue-specific genotoxicity and antioxidant imbalance of titanium dioxide nanoparticles (NPTiO₂) and inorganic lead (PbII) in a neotropical fish species», *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 82, p. 103551, feb. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2020.103551.
- [106] S. and Franklin, «Oxidative Stress Biomarker in Assessing the Lead Induced Toxicity in Commercially Important Fish, *Labeo rohita*». Accedido: 27 de octubre de

2024. [En línea]. Disponible en: <https://researcherslinks.com/current-issues/Oxidative-Stress-Biomarker-in-Assessing/20/1/1138/html>
- [107] C. Kataoka y S. Kashiwada, «Ecological Risks Due to Immunotoxicological Effects on Aquatic Organisms», *IJMS*, vol. 22, n.º 15, p. 8305, ago. 2021, doi: 10.3390/ijms22158305.
- [108] H.-J. Kim *et al.*, «Determination of toxic effects of lead acetate on different sizes of zebra fish (*Danio rerio*) in soft and hard water», *Journal of King Saud University - Science*, vol. 32, n.º 2, pp. 1390-1394, mar. 2020, doi: 10.1016/j.jksus.2019.11.032.
- [109] P. P. S., J. Rajkumar, y K. C., «Hepatotoxic effect of lead and hepatoprotective effect of *Hydrilla verticillata* on hepatic transcriptional and physiological response in edible fish *Labeo rohita*», *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 45, n.º 3, pp. 1276-1283, may 2022, doi: 10.1080/01480545.2020.1815762.
- [110] K. Subramanian Vignesh y G. Deepe Jr., «Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection», *IJMS*, vol. 18, n.º 10, p. 2197, oct. 2017, doi: 10.3390/ijms18102197.
- [111] R. Kalahasthi, R. Nagaraju, R. Balachandar, y B. S. Bagepally, «Association between occupational lead exposure and immunotoxicity markers: A systematic review and meta-analysis», *Toxicology*, vol. 465, p. 153047, ene. 2022, doi: 10.1016/j.tox.2021.153047.
- [112] Z. Dai *et al.*, «Exposure to waterborne cadmium induce oxidative stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in the liver of *Procypris merus*», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 204, p. 111051, nov. 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111051.
- [113] S. Mitra *et al.*, «Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity», *Journal of King Saud University - Science*, vol. 34, n.º 3, p. 101865, abr. 2022, doi: 10.1016/j.jksus.2022.101865.
- [114] E. Metryka *et al.*, «Lead (Pb) Exposure Enhances Expression of Factors Associated with Inflammation», *Int J Mol Sci*, vol. 19, n.º 6, p. 1813, jun. 2018, doi: 10.3390/ijms19061813.
- [115] P. Harshitha, K. Bose, y H. S. Dsouza, «Influence of lead-induced toxicity on the inflammatory cytokines», *Toxicology*, vol. 503, p. 153771, mar. 2024, doi: 10.1016/j.tox.2024.153771.

- [116] C.-Q. Zhou, W. Ka, W.-K. Yuan, y J.-L. Wang, «The effect of acute heat stress on the innate immune function of rainbow trout based on the transcriptome», *Journal of Thermal Biology*, vol. 96, p. 102834, feb. 2021, doi: 10.1016/j.jtherbio.2021.102834.
- [117] M. Cargnello y P. P. Roux, «Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases», *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 75, n.º 1, pp. 50-83, mar. 2011, doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- [118] M. Valko, H. Morris, y M. T. D. Cronin, «Metals, toxicity and oxidative stress», *Curr Med Chem*, vol. 12, n.º 10, pp. 1161-1208, 2005, doi: 10.2174/0929867053764635.
- [119] J.-W. Lee, A.-H. Jo, D.-C. Lee, C. Y. Choi, J.-C. Kang, y J.-H. Kim, «Review of cadmium toxicity effects on fish: Oxidative stress and immune responses», *Environmental Research*, vol. 236, p. 116600, nov. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116600.
- [120] L. Li, W. Li, Y. Liu, X. Jin, Y. Yu, y H. Lin, «TBBPA and lead co-exposure induces grass carp liver cells apoptosis via ROS/JAK2/STAT3 signaling axis», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 142, p. 109100, nov. 2023, doi: 10.1016/j.fsi.2023.109100.
- [121] Y. Zhai *et al.*, «Lead suppresses interferon γ to induce splenomegaly via modification on splenic endothelial cells and lymphoid tissue organizer cells in mice», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 244, p. 114046, oct. 2022, doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114046.
- [122] B. Qian, L. Xue, X. Qi, Y. Bai, y Y. Wu, «Gene networks and toxicity/detoxification pathways in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver induced by acute lead stress», *Genomics*, vol. 112, n.º 1, pp. 20-31, ene. 2020, doi: 10.1016/j.ygeno.2019.06.023.
- [123] A. D. Ishola, O. O. Ogunlaja, O. A. Arojoye, O. O. Nwaechefu, y A. Ogunlaja, «Cadmium, chromium, nickel and lead content of fish and vegetables from selected dams in Osun State, Nigeria», *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 124, p. 105687, dic. 2023, doi: 10.1016/j.jfca.2023.105687.
- [124] C. Bacchetta, J. Cazenave, C. Mora, M. P. Michlig, M. R. Repetti, y A. S. Rossi, «Non-lethal biomarkers as promising tools for fish health assessment: *In situ* exposure to bifenthrin as a case study», *Aquatic Toxicology*, vol. 276, p. 107083, nov. 2024, doi: 10.1016/j.aquatox.2024.107083.

- [125] A. K. Srivastav, R. Rai, N. Suzuki, D. Mishra, y S. K. Srivastav, «Effects of lead on the plasma electrolytes of a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*», *Int Aquat Res*, vol. 5, n.º 1, p. 4, 2013, doi: 10.1186/2008-6970-5-4.
- [126] H. Kaya, M. Akbulut, E. Ş. Çelik, y S. Yılmaz, «Impacts of sublethal lead exposure on the hemato-immunological parameters in tilapia (*Oreochromis mossambicus*)», *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 95, n.º 9, pp. 1554-1564, oct. 2013, doi: 10.1080/02772248.2014.895363.
- [127] S. Rajeshkumar, Y. Liu, J. Ma, H. Y. Duan, y X. Li, «Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L.», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 70, pp. 461-472, nov. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.08.013.
- [128] H. Kalkan, «Assessment of Heavy Metal Bioaccumulation in Some Tissues of *Leuciscus Cephalus* from Karasu River, Erzurum-Turkey», *Austin J Environ Toxicol*. 2015;1(1): 1004., [En línea]. Disponible en: <https://austinpublishinggroup.com/environmental-toxicology/fulltext/ajet-v1-id1004.php>
- [129] F. P. Arantes, L. A. Savassi, H. B. Santos, M. V. T. Gomes, y N. Bazzoli, «Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil», *An. Acad. Bras. Ciênc.*, vol. 88, pp. 137-147, feb. 2016, doi: Hussain.
- [130] J. L. C. Ribas *et al.*, «Co-exposure effects of lead and TiO₂ nanoparticles in primary kidney cell culture from the freshwater fish *Hoplias malabaricus*», *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 101, p. 104187, ago. 2023, doi: 10.1016/j.etap.2023.104187.
- [131] A. N. A. Rahman *et al.*, «Alleviating Effect of a Magnetite (Fe₃O₄) Nanogel against Waterborne-Lead-Induced Physiological Disturbances, Histopathological Changes, and Lead Bioaccumulation in African Catfish», *Gels*, vol. 9, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2023, doi: 10.3390/gels9080641.
- [132] N. Paul, S. Chakraborty, y M. Sengupta, «Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*», *Aquatic Toxicology*, vol. 152, pp. 105-112, jul. 2014, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.017.
- [133] H. Jing, Q. Zhang, S. Li, y X.-J. Gao, «Pb exposure triggers MAPK-dependent inflammation by activating oxidative stress and miRNA-155 expression in carp head kidney», *Fish Shellfish Immunol*, vol. 106, pp. 219-227, nov. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.08.015.

- [134] A. K. Tolkou, D. K. Toubanaki, y G. Z. Kyzas, «Detection of Arsenic, Chromium, Cadmium, Lead, and Mercury in Fish: Effects on the Sustainable and Healthy Development of Aquatic Life and Human Consumers», *Sustainability*, vol. 15, n.º 23, Art. n.º 23, ene. 2023, doi: 10.3390/su152316242.
- [135] S. Naz *et al.*, «A Comprehensive Review on Metallic Trace Elements Toxicity in Fishes and Potential Remedial Measures», *Water*, vol. 15, n.º 16, Art. n.º 16, ene. 2023, doi: 10.3390/w15163017.
- [136] X. Li *et al.*, «Lead Exposure Causes Spinal Curvature during Embryonic Development in Zebrafish», *IJMS*, vol. 23, n.º 17, p. 9571, ago. 2022, doi: 10.3390/ijms23179571.
- [137] N. M. Roy, S. DeWolf, y B. Carneiro, «Evaluation of the developmental toxicity of lead in the *Danio rerio* body», *Aquatic Toxicology*, vol. 158, pp. 138-148, ene. 2015, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.10.026.
- [138] T. F. Mahi, G. Chowdhury, M. A. Hossain, A. K. Baishnab, P. Schneider, y M. M. Iqbal, «Assessment of Lead (Pb) Toxicity in Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*—Growth, Behaviour, Erythrocytes Abnormalities, and Histological Alterations in Vital Organs», *Toxics*, vol. 10, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2022, doi: 10.3390/toxics10120793.
- [139] S. A. A. Ahmed, R. M. Reda, y M. ElHady, «Immunomodulation by Coriandrum sativum seeds (Coriander) and its ameliorative effect on lead-induced immunotoxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)», *Aquaculture Research*, vol. 51, n.º 3, pp. 1077-1088, 2020, doi: 10.1111/are.14454.
- [140] S. Fernández-Trujillo, J. J. López-Perea, M. Jiménez-Moreno, R. C. R. Martín-Doimeadios, y R. Mateo, «Metals and metalloids in freshwater fish from the floodplain of Tablas de Daimiel National Park, Spain», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 208, p. 111602, ene. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111602.
- [141] G. Wang *et al.*, «Sex-specific effects of fluoride and lead exposures on histology, antioxidant physiology, and immune system in the liver of zebrafish (*Danio rerio*)», *Ecotoxicology*, vol. 31, n.º 3, pp. 396-414, abr. 2022, doi: 10.1007/s10646-022-02519-5.
- [142] J. Karjalainen, H. E. Arola, J. Wallin, A. Väisänen, y A. K. Karjalainen, «Condition and Sperm Characteristics of Perch *Perca fluviatilis* inhabiting Boreal Lakes

- Receiving Metal Mining Effluents», *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 79, n.º 2, pp. 270-281, ago. 2020, doi: 10.1007/s00244-020-00752-9.
- [143] C. S. Ferreira, Y. M. Ribeiro, D. P. Moreira, A. L. Paschoalini, N. Bazzoli, y E. Rizzo, «Reproductive toxicity induced by lead exposure: Effects on gametogenesis and sex steroid signaling in teleost fish», *Chemosphere*, vol. 340, p. 139896, nov. 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.139896.
- [144] P. Massányi, M. Massányi, R. Madeddu, R. Stawarz, y N. Lukáč, «Effects of Cadmium, Lead, and Mercury on the Structure and Function of Reproductive Organs», *Toxics*, vol. 8, n.º 4, Art. n.º 4, dic. 2020, doi: 10.3390/toxics8040094.
- [145] A. K. Sinha *et al.*, «Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress», *PLoS One*, vol. 9, n.º 4, p. e95319, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0095319.
- [146] D. A. Monteiro, F. T. Rantin, y A. L. Kalinin, «Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829)», *Ecotoxicology*, vol. 19, n.º 1, pp. 105-123, ene. 2010, doi: 10.1007/s10646-009-0395-1.
- [147] X. Jiang, J. Wang, B. Pan, D. Li, Y. Wang, y X. Liu, «Assessment of heavy metal accumulation in freshwater fish of Dongting Lake, China: Effects of feeding habits, habitat preferences and body size», *Journal of Environmental Sciences*, vol. 112, pp. 355-365, feb. 2022, doi: 10.1016/j.jes.2021.05.004.
- [148] G. Shang *et al.*, «Heavy Metal Pollution in Xinfengjiang River Sediment and the Response of Fish Species Abundance to Heavy Metal Concentrations», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, n.º 17, p. 11087, sep. 2022, doi: 10.3390/ijerph191711087.
- [149] R. Mehmood, U. Imran, A. Ullah, J. L. Ullman, y J. Weidhaas, «Health risks associated with accumulation of heavy metals in fish of Keenjhar Lake, Pakistan», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, n.º 19, pp. 24162-24172, jul. 2020, doi: 10.1007/s11356-020-08705-4.
- [150] A. Haseeb *et al.*, «Ecotoxicological Assessment of Heavy Metal and Its Biochemical Effect in Fishes», *Biomed Res Int*, vol. 2022, p. 3787838, nov. 2022, doi: 10.1155/2022/3787838.
- [151] D. Alsop, T. Y.-T. Ng, M. J. Chowdhury, y C. M. Wood, «Interactions of waterborne and dietborne Pb in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Bioaccumulation,

- physiological responses, and chronic toxicity», *Aquatic Toxicology*, vol. 177, pp. 343-354, ago. 2016, doi: 10.1016/j.aquatox.2016.06.007.
- [152] L. F. Oya-Silva *et al.*, «Tissue-specific genotoxicity and antioxidant imbalance of titanium dioxide nanoparticles (NPTiO₂) and inorganic lead (PbII) in a neotropical fish species», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 82, p. 103551, feb. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2020.103551.
- [153] J.-W. Lee *et al.*, «Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 68, pp. 101-108, may 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.010.
- [154] I. P. Adegbola, B. A. Aborisade, y A. Adetutu, «Health risk assessment and heavy metal accumulation in fish species (*Clarias gariepinus* and *Sarotherodon melanotheron*) from industrially polluted Ogun and Eleyele Rivers, Nigeria», *Toxicology Reports*, vol. 8, pp. 1445-1460, 2021, doi: 10.1016/j.toxrep.2021.07.007.
- [155] M. Ahmed, T. Ahmad, M. Liaquat, K. S. Abbasi, I. B. A. Farid, y M. Jahangir, «Tissue specific metal characterization of selected fish species in Pakistan», *Environ Monit Assess*, vol. 188, n.º 4, p. 212, abr. 2016, doi: 10.1007/s10661-016-5214-6.
- [156] S. Subotić, Ž. Višnjić-Jeftić, V. Đikanović, S. Spasić, J. Krpo-Četković, y M. Lenhardt, «Metal Accumulation in Muscle and Liver of the Common Nase (*Chondrostoma nasus*) and Vimba Bream (*Vimbavimba*) from the Danube River, Serbia: Bioindicative Aspects», *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 103, n.º 2, pp. 261-266, ago. 2019, doi: 10.1007/s00128-019-02657-3.
- [157] M. Stankevičiūtė *et al.*, «Biological effects of multimetal (Ni, Cd, Pb, Cu, Cr, Zn) mixture in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Laboratory exposure and recovery study», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 216, p. 112202, jun. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112202.
- [158] L. Butrimavičienė, R. Nalivaikienė, V. Kalcienė, y A. Rybakovas, «Impact of copper and zinc mixture on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): acute exposure and recovery», *Ecotoxicology*, vol. 30, n.º 5, pp. 873-884, jul. 2021, doi: 10.1007/s10646-021-02404-7.
- [159] L. Butrimavičienė, R. Nalivaikienė, V. Kalcienė, y A. Rybakovas, «Impact of copper and zinc mixture on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): acute exposure and recovery», *Ecotoxicology*, vol. 30, n.º 5, pp. 873-884, jul. 2021, doi: 10.1007/s10646-021-02404-7.

- [160] H. A. M. Soliman, M. Hamed, J.-S. Lee, y A. E.-D. H. Sayed, «Protective effects of a novel pyrazolecarboxamide derivative against lead nitrate induced oxidative stress and DNA damage in *Clarias gariepinus*», *Environmental Pollution*, vol. 247, pp. 678-684, abr. 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.074.
- [161] L. Neeratanaphan, C. Kamollerd, P. Suwannathada, P. Suwannathada, y B. Tengjaroenkul, «Genotoxicity and Oxidative Stress in Experimental Hybrid Catfish Exposed to Heavy Metals in a Municipal Landfill Reservoir», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, n.º 6, p. 1980, mar. 2020, doi: 10.3390/ijerph17061980.
- [162] M. Shabrangharehdasht, A. Mirvaghefi, y H. Farahmand, «Effects of nanosilver on hematologic, histologic and molecular parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 225, p. 105549, ago. 2020, doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105549.
- [163] J.-H. Kim y J.-C. Kang, «Toxic effects on bioaccumulation and hematological parameters of juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* exposed to dietary lead (Pb) and ascorbic acid», *Chemosphere*, vol. 176, pp. 131-140, jun. 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.097.
- [164] A. Ishaque, S. Ishaque, A. Arif, y H. G. Abbas, «TOXIC EFFECTS OF LEAD ON FISH AND HUMAN», *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, vol. 2020, n.º 1, Art. n.º 1, dic. 2020, doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.47.
- [165] F. F. Ahmed I, Zakiya A, «Effects of aquatic heavy metal intoxication on the level of hematocrit and hemoglobin in fishes: A review», doi: doi.org/10.3389/fenvs.2022.919204.
- [166] K. Liu *et al.*, «Toxic effects of two sources of dietborne cadmium on the juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. and tissue-specific accumulation of related minerals», *Aquatic Toxicology*, vol. 165, pp. 120-128, ago. 2015, doi: 10.1016/j.aquatox.2015.05.013.
- [167] C. Haux y Å. Larsson, «Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 6, n.º 1, pp. 28-34, feb. 1982, doi: 10.1016/0147-6513(82)90077-X.
- [168] R. T. A. Elbeshti, N. M. Elderwish, K. M. K. Abdelali, y Y. Taştan, «Effects of Heavy Metals on Fish», vol. 4.

- [169] H. Y. Coğun y M. ŞahiN, «The Effect of Zeolite on Reduction of Lead Toxicity in Nil Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)», *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2009, doi: 10.9775/kvfd.2011.5170.
- [170] K. Shekh, S. Tang, V. Kodzhahinchev, S. Niyogi, y M. Hecker, «Species and life-stage specific differences in cadmium accumulation and cadmium induced oxidative stress, metallothionein and heat shock protein responses in white sturgeon and rainbow trout», *Science of The Total Environment*, vol. 673, pp. 318-326, jul. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.083.
- [171] S. J. Clearwater, A. M. Farag, y J. S. Meyer, «Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 132, n.º 3, pp. 269-313, jul. 2002, doi: 10.1016/S1532-0456(02)00078-9.
- [172] A.-K. Loerracher y T. Braunbeck, «Cytochrome P450-dependent biotransformation capacities in embryonic, juvenile and adult stages of zebrafish (*Danio rerio*)—a state-of-the-art review», *Arch Toxicol*, vol. 95, n.º 7, pp. 2299-2334, 2021, doi: 10.1007/s00204-021-03071-7.
- [173] S. J. Woo y J. K. Chung, «Cytochrome P450 1 enzymes in black rockfish, *Sebastes schlegelii*: Molecular characterization and expression patterns after exposure to benzo[a]pyrene», *Aquatic Toxicology*, vol. 226, p. 105566, sep. 2020, doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105566.
- [174] A. Vazirzadeh, H. Roosta, H. Masoumi, A. Farhadi, y A. Jeffs, «Long-term effects of three probiotics, singular or combined, on serum innate immune parameters and expressions of cytokine genes in rainbow trout during grow-out», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 98, pp. 748-757, mar. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2019.11.023.
- [175] M. J. Lawrence *et al.*, «Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature», *J Fish Biol*, vol. 97, n.º 1, pp. 4-15, jul. 2020, doi: 10.1111/jfb.14339.
- [176] F. A. Guardiola *et al.*, «Immunotoxicological effects of inorganic arsenic on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)», *Aquatic Toxicology*, vol. 134-135, pp. 112-119, jun. 2013, doi: 10.1016/j.aquatox.2013.03.015.
- [177] K. R. Grant, «Fish Hematology and Associated Disorders», *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, vol. 18, n.º 1, pp. 83-103, ene. 2015, doi: 10.1016/j.cvex.2014.09.007.

- [178] T. Mohammadian *et al.*, «Effect of Encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on Innate Immune System and Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Post-Administration of Pb», *Probiotics & Antimicro. Prot.*, vol. 12, n.º 2, pp. 375-388, jun. 2020, doi: 10.1007/s12602-019-09544-7.
- [179] «Method Evaluation Laboratory Standards - CLSI Shop», Clinical & Laboratory Standards Institute. Accedido: 5 de febrero de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/method-evaluation/>
- [180] F. A. Guardiola *et al.*, «Immunotoxicological effects of inorganic arsenic on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)», *Aquatic Toxicology*, vol. 134-135, pp. 112-119, jun. 2013, doi: 10.1016/j.aquatox.2013.03.015.
- [181] S. V. Koopsamy Naidoo, M. J. Bester, S. Arbi, C. Venter, P. Dhanraj, y H. M. Oberholzer, «Oral exposure to cadmium and mercury alone and in combination causes damage to the lung tissue of Sprague-Dawley rats», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 69, pp. 86-94, jul. 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.021.
- [182] R. R. Nalage, S. T. Thorat, K. Chandramore, K. S. Reddy, y N. Kumar, «Dietary manganese nano-particles improves gene regulation and biochemical attributes for mitigation of lead and ammonia toxicity in fish», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 276, p. 109818, feb. 2024, doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109818.
- [183] D. Alsop, T. Y.-T. Ng, M. J. Chowdhury, y C. M. Wood, «Interactions of waterborne and dietborne Pb in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Bioaccumulation, physiological responses, and chronic toxicity», *Aquatic Toxicology*, vol. 177, pp. 343-354, ago. 2016, doi: 10.1016/j.aquatox.2016.06.007.
- [184] N. Paul, S. Chakraborty, y M. Sengupta, «Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*», *Aquatic Toxicology*, vol. 152, pp. 105-112, jul. 2014, doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.017.
- [185] F. A. Guardiola *et al.*, «Mercury Accumulation, Structural Damages, and Antioxidant and Immune Status Changes in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Exposed to Methylmercury», *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 70, n.º 4, pp. 734-746, may 2016, doi: 10.1007/s00244-016-0268-6.
- [186] F. A. Guardiola *et al.*, «Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*)», *Fish*

- & *Shellfish Immunology*, vol. 45, n.º 1, pp. 112-123, jul. 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.010.
- [187] «Mucosal immunoglobulin response in *Epinephelus coioides* after *Cryptocaryon irritans* infection | Elsevier Enhanced Reader». Accedido: 15 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S105046482200479X?token=DE4768361A1FCD508F4F4974B7F2B0484A489D5F4ACD1F231CF91270D0BA019A15C2B62318FCDFCDA2F5A45459C0BEDC&originRegion=us-east-1&originCreation=20230316000033>
- [188] S. Benhamed, F. A. Guardiola, M. Mars, y M. Á. Esteban, «Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes», *Veterinary Microbiology*, vol. 171, n.º 1-2, pp. 1-12, jun. 2014, doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.008.
- [189] «Mucosal immunology in fish | Elsevier Enhanced Reader». Accedido: 20 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780128222737000021?token=4D9EC06639060CA47B63A38EE2187890B37D0C71752E3959EA426E7B1CD0966D89C6E8663E85D0ED0FDA1AFB96F7F345&originRegion=us-east-1&originCreation=20230320231342>
- [190] D. Porter, D. Peggs, C. McGurk, y S. A. M. Martin, «Immune responses to prebiotics in farmed salmonid fish: How transcriptomic approaches help interpret responses», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 127, pp. 35-47, ago. 2022, doi: 10.1016/j.fsi.2022.05.055.
- [191] I. Salinas, «The Mucosal Immune System of Teleost Fish», *Biology*, vol. 4, n.º 3, pp. 525-539, ago. 2015, doi: 10.3390/biology4030525.
- [192] E. R. Lauriano *et al.*, «Immunohistochemistry of the Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) in African Bonytongue (*Heterotis niloticus*, Cuvier 1829)», *Int J Mol Sci*, vol. 24, n.º 3, p. 2316, ene. 2023, doi: 10.3390/ijms24032316.
- [193] A. Attaya, C. J. Secombes, y T. Wang, «Effective isolation of GALT cells: Insights into the intestine immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different bacterin vaccine preparations», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 105, pp. 378-392, oct. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.06.051.
- [194] Z. Xu *et al.*, «Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, n.º 32, pp. 13097-13102, ago. 2013, doi: 10.1073/pnas.1304319110.

- [195] M. Clinton *et al.*, «Gill Transcriptomic Responses to Toxin-producing Alga *Prymnesium parvum* in Rainbow Trout», *Front Immunol*, vol. 12, p. 794593, dic. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.794593.
- [196] Y. Saibu, S. Kumar, A. Jamwal, D. Peak, y S. Niyogi, «A FTIRM study of the interactive effects of metals (zinc, copper and cadmium) in binary mixtures on the biochemical constituents of the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 211, pp. 48-56, sep. 2018, doi: 10.1016/j.cbpc.2018.05.009.
- [197] «Research advances in the structure, function, and regulation of the gill barrier in teleost fish | Elsevier Enhanced Reader». Accedido: 20 de marzo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2772735123000069?token=EF6895A4202CE83B1859D28504F4DC39C933B13414B0016E52B09654ED66CC3E1C2D0DBFD7C72601DA5F15BB23F5682C&originRegion=us-east-1&originCreation=20230320210108>
- [198] A. G. M. Osman, S. Wuertz, y K. Mohammed-Geba, «Lead-induced heat shock protein (HSP70) and metallothionein (MT) gene expression in the embryos of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)», *Scientific African*, vol. 3, p. e00056, may 2019, doi: 10.1016/j.sciaf.2019.e00056.
- [199] I. Salinas, Á. Fernández-Montero, Y. Ding, y J. O. Sunyer, «Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 121, p. 104079, ago. 2021, doi: 10.1016/j.dci.2021.104079.
- [200] M. Stankevičiūtė *et al.*, «Biological effects of multimetal (Ni, Cd, Pb, Cu, Cr, Zn) mixture in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Laboratory exposure and recovery study», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 216, p. 112202, jun. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112202.
- [201] B. Abós, R. Castro, J. Pignatelli, A. Luque, L. González, y C. Tafalla, «Transcriptional Heterogeneity of IgM⁺ Cells in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues», *PLoS ONE*, vol. 8, n.º 12, p. e82737, dic. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082737.
- [202] B. A. Keyt, R. Baliga, A. M. Sinclair, S. F. Carroll, y M. S. Peterson, «Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies», *Antibodies*, vol. 9, n.º 4, p. 53, oct. 2020, doi: 10.3390/antib9040053.

- [203] T. Leya, R. K. Valappil, G. Tripathi, P. P. Kurcheti, y M. K. Bedekar, «Expression of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) and immunoglobulin (IgM) gene in mucosal-associated lymphoid tissues (MALT) of *Labeo rohita* fingerlings immunized with pDNA (pGPD-IFN) vaccine», *Aquaculture*, vol. 535, p. 736343, mar. 2021, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736343.
- [204] J. Ji *et al.*, «Differential immune responses of immunoglobulin Z subclass members in antibacterial immunity in a zebrafish model», *Immunology*, vol. 162, n.º 1, pp. 105-120, ene. 2021, doi: 10.1111/imm.13269.
- [205] S. Kitiyodom *et al.*, «Modulation of the mucosal immune response of red tilapia (*Oreochromis sp.*) against columnaris disease using a biomimetic-mucoadhesive nanovaccine», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 112, pp. 81-91, may 2021, doi: 10.1016/j.fsi.2021.02.017.
- [206] R. Vidal, R. González, y F. Gil, «Characterization and expression analysis of Toll-like receptor 3 cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*)», *Genet. Mol. Res.*, vol. 14, n.º 2, pp. 6073-6083, 2015, doi: 10.4238/2015.June.8.5.
- [207] B. R. Sahoo, «Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR)», *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 161, pp. 1602-1617, oct. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.293.
- [208] Y. Dang *et al.*, «Effects of probiotics on growth, the toll-like receptor mediated immune response and susceptibility to *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*», *Aquaculture*, vol. 561, p. 738668, dic. 2022, doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738668.
- [209] W. K. Elfeil *et al.*, «Molecular characterization of Toll-like receptor type-3 in mallard duck and its response to Newcastle disease virus infection», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, n.º 39, pp. 55786-55795, oct. 2021, doi: 10.1007/s11356-021-14759-9.
- [210] F. F.-Y. Lee, H.-C. Chuang, N.-Y. Chen, G. Nagarajan, y P. P. Chiou, «Toll-Like Receptor 9 Alternatively Spliced Isoform Negatively Regulates TLR9 Signaling in Teleost Fish», *PLoS ONE*, vol. 10, n.º 5, p. e0126388, may 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126388.
- [211] S. Brooks, C. R. Tyler, O. Carnevali, K. Coward, y J. P. Sumpter, «Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*», *Gene*, vol. 201, n.º 1, pp. 45-54, nov. 1997, doi: 10.1016/S0378-1119(97)00426-5.

- [212] A. Jia y X.-H. Zhang, «Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus*», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 26, n.º 4, pp. 606-613, abr. 2009, doi: 10.1016/j.fsi.2008.09.011.
- [213] M. S. Heydarnejad, M. Khosravian-Hemamai, y A. Nematollahi, «Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Ir Vet J*, vol. 66, n.º 1, p. 11, dic. 2013, doi: 10.1186/2046-0481-66-11.
- [214] Z.-H. Li *et al.*, «Multiple biomarkers responses in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after acute exposure to a fungicide propiconazole», *Environ. Toxicol.*, vol. 28, n.º 3, pp. 119-126, mar. 2013, doi: 10.1002/tox.20701.
- [215] A. Ucar *et al.*, «The effect of N-acetylcysteine supplementation on the oxidative stress levels, apoptosis, DNA damage, and hematopoietic effect in pesticide-exposed fish blood», *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 33, n.º 6, jun. 2019, doi: 10.1002/jbt.22311.
- [216] M. Palikova *et al.*, «Effect of arsenic and cyanobacterial co-exposure on pathological, haematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», 2015.
- [217] B. Ates, I. Orun, Z. S. Talas, G. Durmaz, y I. Yilmaz, «Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺ and Cu²⁺», *Fish Physiol Biochem*, vol. 34, n.º 1, pp. 53-59, mar. 2008, doi: 10.1007/s10695-007-9146-5.
- [218] V. Parlak *et al.*, «Hematotoxic, oxidative and genotoxic damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to 3-benzoylpyridine», *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 32, n.º 7, pp. 501-509, sep. 2022, doi: 10.1080/15376516.2022.2049413.
- [219] M. Manera, «Exploratory Factor Analysis of Rainbow Trout Serum Chemistry Variables», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 18, n.º 4, p. 1537, feb. 2021, doi: 10.3390/ijerph18041537.
- [220] F. Fazio *et al.*, «Intra-variability of some biochemical parameters and serum electrolytes in rainbow trout (Walbaum, 1792) bred using a flow-through system», *Heliyon*, vol. 7, n.º 2, p. e06361, feb. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06361.
- [221] C. D. Ricketts, W. R. Bates, y S. D. Reid, «The Effects of Acute Waterborne Exposure to Sublethal Concentrations of Molybdenum on the Stress Response in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*», *PLoS ONE*, vol. 10, n.º 1, p. e0115334, ene. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0115334.

- [222] F. Nasri, M. S. Heydarnejad, y A. Nematollahi, «Toxicidad de zinc por exposición subletal en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)», *Ces. Med. Vet. Zootec.*, vol. 15, n.º 1, pp. 9-21, may 2020, doi: 10.21615/cesmvz.15.1.1.
- [223] K. Renu *et al.*, «Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review», *Chemosphere*, vol. 271, p. 129735, may 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735.
- [224] S. Ullah *et al.*, «Heavy metals bioaccumulation and subsequent multiple biomarkers based appraisal of toxicity in the critically endangered *Tor putitora*», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 228, p. 113032, dic. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.113032.
- [225] Z. Hossain, Md. S. Hossain, N. S. Ema, y A. Omri, «Heavy metal toxicity in Buriganga river alters the immunology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)», *Heliyon*, vol. 7, n.º 11, p. e08285, oct. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08285.
- [226] S. K. Annamalai y K. D. Arunachalam, «Uranium (²³⁸ U) bioaccumulation and its persuaded alterations on hematological, serological and histological parameters in freshwater fish *Pangasius sutchi*», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 52, pp. 262-275, jun. 2017, doi: 10.1016/j.etap.2017.03.022.
- [227] G. Magara *et al.*, «Metal load and oxidative stress driven by organotin compounds on rainbow trout», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, n.º 26, pp. 35012-35022, jul. 2021, doi: 10.1007/s11356-021-12984-w.
- [228] T. Uno, M. Ishizuka, y T. Itakura, «Cytochrome P450 (CYP) in fish», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 34, n.º 1, pp. 1-13, jul. 2012, doi: 10.1016/j.etap.2012.02.004.
- [229] S. W. Santos, J. Cachot, P.-Y. Gourves, C. Clérandeau, B. Morin, y P. Gonzalez, «Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 170, pp. 778-788, abr. 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.045.
- [230] K. Shekh, A. J. Alcaraz, S. Niyogi, y M. Hecker, «Comparative analyses of oxidative stress response and metallothionein induction in white sturgeon and rainbow trout during acute waterborne copper exposure», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 231, p. 108723, may 2020, doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108723.

- [231] Y. Yang, X. Ye, B. He, y J. Liu, «Cadmium potentiates toxicity of cypermethrin in zebrafish: Cadmium potentiates cypermethrin toxicity in zebrafish», *Environ Toxicol Chem*, vol. 35, n.º 2, pp. 435-445, feb. 2016, doi: 10.1002/etc.3200.
- [232] Y. Yang, D. Ji, X. Huang, J. Zhang, y J. Liu, «Effects of metals on enantioselective toxicity and biotransformation of *cis* -bifenthrin in zebrafish: Metals affect toxicity and biotransformation of bifenthrin», *Environ Toxicol Chem*, vol. 36, n.º 8, pp. 2139-2146, ago. 2017, doi: 10.1002/etc.3747.
- [233] G. Liu, J. Tian, H. Yin, J. Yin, y Y. Tang, «Self-protective transcriptional alterations in ZF4 cells exposed to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and AgNO_3 », *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 33, n.º 12, dic. 2019, doi: 10.1002/jbt.22408.
- [234] H. Zhang, W. Fang, D. Wang, N. Gao, Y. Ding, y C. Chen, «The role of interleukin family in perfluorooctanoic acid (PFOA)-induced immunotoxicity», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 280, pp. 552-560, sep. 2014, doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.043.
- [235] M. Levin *et al.*, «Methyl mercury (MeHg) in vitro exposure alters mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine expression in Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) pups», *Science of The Total Environment*, vol. 725, p. 138308, jul. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138308.
- [236] R. Lulijwa, A. C. Alfaro, F. Merien, J. Meyer, y T. Young, «Advances in salmonid fish immunology: A review of methods and techniques for lymphoid tissue and peripheral blood leucocyte isolation and application», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 95, pp. 44-80, dic. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.10.006.
- [237] A. Zhang, X. Jian, D. Wang, J. Ren, X. Wang, y H. Zhou, «Characterization and bioactivity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) interleukin-21: Inducible production and involvement in inflammatory regulation», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 99, pp. 19-26, abr. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.01.059.
- [238] Y. Zhang, Q. Liu, H. Yin, y S. Li, «Cadmium exposure induces pyroptosis of lymphocytes in carp pronephros and spleens by activating NLRP3», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 202, p. 110903, oct. 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110903.
- [239] T. Wang *et al.*, «Functional Characterization of a Nonmammalian IL-21: Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* IL-21 Upregulates the Expression of the Th Cell Signature Cytokines IFN- γ , IL-10, and IL-22», *J.I.*, vol. 186, n.º 2, pp. 708-721, ene. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1001203.

- [240] L. C. Alves y C. M. Wood, «The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets», *Aquatic Toxicology*, vol. 78, n.º 3, pp. 217-232, jun. 2006, doi: 10.1016/j.aquatox.2006.03.005.
- [241] M. Ibrahim, D. Oldham, y M. Minghetti, «Role of metal speciation in the exposure medium on the toxicity, bioavailability and bio-reactivity of copper, silver, cadmium and zinc in the rainbow trout gut cell line (RTgutGC)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 236, p. 108816, oct. 2020, doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108816.
- [242] M. Conlon y A. Bird, «The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health», *Nutrients*, vol. 7, n.º 1, pp. 17-44, dic. 2014, doi: 10.3390/nu7010017.
- [243] Y. Ding *et al.*, «Secretory IgM (sIgM) is an ancient master regulator of microbiota homeostasis and metabolism», 27 de febrero de 2023, *bioRxiv*. doi: 10.1101/2023.02.26.530119.
- [244] K.-M. Choi *et al.*, «Cloning, characterisation, and expression analysis of the cathepsin D gene from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*)», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 40, n.º 1, pp. 253-258, sep. 2014, doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.013.
- [245] J. H. Cho, I. Y. Park, H. S. Kim, W. T. Lee, M. S. Kim, y S. C. Kim, «Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish», *FASEB j.*, vol. 16, n.º 3, pp. 429-431, mar. 2002, doi: 10.1096/fj.01-0736fje.
- [246] L. Zhu, L. Nie, G. Zhu, L. Xiang, y J. Shao, «Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 39, n.º 1-2, pp. 39-62, ene. 2013, doi: 10.1016/j.dci.2012.04.001.
- [247] H. Lu, P. Li, X. Huang, C. H. Wang, M. Li, y Z. Z. Xu, «Zebrafish model for human gut microbiome-related studies: advantages and limitations», *Medicine in Microecology*, vol. 8, p. 100042, jun. 2021, doi: 10.1016/j.medmic.2021.100042.
- [248] E. De Mercado, A. M. Larrán, J. Pinedo, y C. Tomás-Almenar, «Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout», *Aquaculture*, vol. 484, pp. 90-97, feb. 2018, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.031.
- [249] J. B. Alexander y G. A. Ingram, «Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish», *Annual Review of Fish Diseases*, vol. 2, pp. 249-279, 1992, doi: 10.1016/0959-8030(92)90066-7.

- [250] W. Kong *et al.*, «Pharyngeal Immunity in Early Vertebrates Provides Functional and Evolutionary Insight into Mucosal Homeostasis», *The Journal of Immunology*, vol. 203, n.º 11, pp. 3054-3067, dic. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1900863.
- [251] D. Gomez, J. O. Sunyer, y I. Salinas, «The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens», *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, n.º 6, pp. 1729-1739, dic. 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032.
- [252] Y. Wang *et al.*, «Functional Analysis of the Cathepsin D Gene Response to SGIV Infection in the Orange-Spotted Grouper, *Epinephelus coioides*», *Viruses*, vol. 14, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2022, doi: 10.3390/v14081680.
- [253] Y. Ren, H. Zhao, B. Su, E. Peatman, y C. Li, «Expression profiling analysis of immune-related genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin mucus following *Flavobacterium columnare* challenge», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 46, n.º 2, pp. 537-542, oct. 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.07.021.
- [254] W. B. Van Muiswinkel y M. Nakao, «A short history of research on immunity to infectious diseases in fish», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 43, n.º 2, pp. 130-150, abr. 2014, doi: 10.1016/j.dci.2013.08.016.
- [255] R. Medzhitov y C. A. Janeway, «Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition», *Cell*, vol. 91, n.º 3, pp. 295-298, oct. 1997, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80412-2.
- [256] K.-L. Wang *et al.*, «Molecular characterization and expression analysis of three TLR genes in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Responses to stimulation of *Aeromonas hydrophila* and TLR ligands», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 66, pp. 466-479, jul. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.056.
- [257] V. Cornet *et al.*, «Environmentally-realistic concentration of cadmium combined with polyunsaturated fatty acids enriched diets modulated non-specific immunity in rainbow trout», *Aquatic Toxicology*, vol. 196, pp. 104-116, mar. 2018, doi: 10.1016/j.aquatox.2018.01.012.
- [258] Q. Wang, Y. Yu, X. Zhang, y Z. Xu, «Immune responses of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich): A model for understanding immunity against protozoan parasites», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 93, pp. 93-102, abr. 2019, doi: 10.1016/j.dci.2019.01.002.
- [259] L. Christie *et al.*, «The skin immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with puffy skin disease (PSD)», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 78, pp. 355-363, jul. 2018, doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.053.

- [260] J.-W. Lee *et al.*, «Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 68, pp. 101-108, may 2019, doi: 10.1016/j.etap.2019.03.010.
- [261] S. Wu *et al.*, «Interleukin-10 (IL-10) participates in host defense against bacterial pathogens and promotes IgM antibody production in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)», *Aquaculture*, vol. 531, p. 735829, ene. 2021, doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735829.
- [262] Y. Yu, Q. Wang, Z. Huang, L. Ding, y Z. Xu, «Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish», *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 567941, oct. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.567941.
- [263] Z. Xu *et al.*, «Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution», *Sci. Immunol.*, vol. 5, n.º 44, p. eaay3254, feb. 2020, doi: 10.1126/sciimmunol.aay3254.
- [264] Y.-Y. Yu *et al.*, «Mucosal immunoglobulins protect the olfactory organ of teleost fish against parasitic infection», *PLoS Pathog*, vol. 14, n.º 11, p. e1007251, nov. 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007251.
- [265] H. Lu *et al.*, «Arsenic (III) induces oxidative stress and inflammation in the gills of common carp, which is ameliorated by zinc (II)», *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 225, p. 111617, dic. 2021, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2021.111617.
- [266] K. L. Wang, S. N. Chen, H. J. Huo, y P. Nie, «Identification and expression analysis of sixteen Toll-like receptor genes, TLR1, TLR2a, TLR2b, TLR3, TLR5M, TLR5S, TLR7–9, TLR13a–c, TLR14, TLR21–23 in mandarin fish *Siniperca chuatsi*», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 121, p. 104100, ago. 2021, doi: 10.1016/j.dci.2021.104100.
- [267] M. Stosik, B. Tokarz-Deptuła, y W. Deptuła, «Immunological memory in teleost fish», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 115, pp. 95-103, ago. 2021, doi: 10.1016/j.fsi.2021.05.022.
- [268] B. Nunes, F. Brandão, T. Sérgio, S. Rodrigues, F. Gonçalves, y A. T. Correia, «Effects of environmentally relevant concentrations of metallic compounds on the flatfish *Scophthalmus maximus*: biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress and metabolism», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 21, n.º 12, pp. 7501-7511, jun. 2014, doi: 10.1007/s11356-014-2630-4.

- [269] S. A. A. Ahmed, R. M. Reda, y M. ElHady, «Immunomodulation by *Coriandrum sativum* seeds (Coriander) and its ameliorative effect on lead-induced immunotoxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L), *Aquac Res*, vol. 51, n.º 3, pp. 1077-1088, mar. 2020, doi: 10.1111/are.14454.