



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

T E S I S

**“Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de
daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta
ambiental”**

para obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

presentada por

Xochitl Guzmán García

Dr. Alfonso Vázquez Botello - Codirector

Dr. Humberto González Márquez - Codirector

Dra. Laura Martínez Tabche - Asesora

México, D. F., Diciembre de 2007.

Comité Tutorial de la Tesis

**“Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de
daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta
ambiental”**

Realizada por

Xochitl Guzmán García

el día 14 de Diciembre del 2007 en las Instalaciones de la Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dr. Alfonso Vázquez Botello

Laboratorio de Contaminación Marina
Instituto de Ciencias del Mar y Limología, UNAM.
Vazquez_Botello@icmyl.unam.mx

Dr. Humberto González Márquez

Laboratorio de Expresión Génica
Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
hgm@xanum.uam.mx

Dra. Laura Martínez Tabche

Laboratorio De Toxicología Acuática
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional
ENCB. IPN. lautabche45@yahoo.com

Los miembros del Jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental**” realizada por la alumna **Xochitl Guzmán García** y se realizó la disertación publica el día 14 de diciembre de 2007 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa”

PRESIDENTE

Dra. Patricia Ramírez Romero
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

SECRETARIA

Dra. Guadalupe Barrera Escorcía
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

VOCAL

Dra. Marcela Galar Martínez
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional

VOCAL

Dra. Irma Jiménez Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 0904-0) está incluida en el padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), contando con el apoyo del mismo consejo, mediante el programa PNP-CONACyT- SEP por medio del convenio número 309-0 y la clave del programa C/PFPN-2002-35-32.

Agradezco al CONACYT el apoyo que me brindó para poder realizar este proyecto con el número de registro 124713.

Este proyecto se desarrolló en el Lab. de Ecotoxicología del Depto de Hidrobiología en colaboración con el Laboratorio de Expresión Génica del Departamento de Ciencias de la Salud en la UAM-Iztapalapa, en vinculación con el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM. Con apoyo PROMEP-SEP.

Esta Tesis forma parte del proyecto: Biomarcadores en organismos acuáticos para el monitoreo ambiental. Apoyado por la UAM-I.

Dedicatoria

A Lucio:

Difícil es, con palabras agradecer las muestras de apoyo, el estímulo de superación, el agrado de compartir juntos cada meta, con profundo amor a quien lo motiva cada día.

A Meztli

Por las horas, días, semanas...etc, de trabajo, amena compañía y por tu solidaridad en las horas más pesadas de trabajo.

A Fernando

Por su paciente espera y por invitarme al juego hermosos de la vida.

A mi Madre

Por su apoyo, su temple y por inducirnos siempre a mejorar nuestras expectativas.

Con especial cariño a mis hermanos y ahijados.

Agradecimientos

Agradezco de manera especial el gran apoyo de mis tutores Dr. Alfonso Vázquez Botello, Dr. Humberto González Márquez y la Dra. Laura Martínez Tabche por darme la oportunidad de formarme académicamente amparada por su profesionalismo, su entrega a la investigación y por brindarme su apoyo siempre incondicional con la calidad humana que les caracteriza.

A la Dra. Guadalupe Barrera E., Dra. Patricia Ramírez R., Dra. Marcela Galar e Irma Jiménez por aceptar ser miembros de mi jurado, la revisión de esta tesis y sus acertadas observaciones para mejorar la presentación de este trabajo.

Dr. Damian Matzumura y Dra. Mina Königsberg Fainstein, Coordinadores del Doctorado en Biología Experimental, así como a los miembros de la comisión por mantener con su experiencia la calidad del posgrado.

A la Dra. Socorro Sobrino Figueroa responsable del Proyecto: “Biomarcadores en organismos acuáticos mexicanos para monitoreo ambiental” del que forma parte este trabajo.

Al Dr. Miguel Betancourt por su gran apoyo durante mi ingreso al doctorado.

A mis amigas y compañeras de trabajo del Lab. de Ecotoxicología: Irma, Patt, Coco y Gu a quienes agradezco su apoyo profesional y su amistad.

A los estudiantes por su entusiasta colaboración al desarrollar su servicio social, vinculados a este proyecto: Alejandro Martínez, Lizan A. Rodríguez, Cristian García y Sonia Rojas.

A Sonia González Rebollar por su apoyo incondicional, palabras de aliento y confianza.

A Edith Viruela Villareal por su invaluable ayuda en la fase final de captura de datos.

Al personal del Laboratorio de Contaminación del ICMYL, UNAM de manera especial a Susana Villanueva y Gabriel por su ayuda en la determinación de metales.

Al personal del Laboratorio de Expresión Génica: a la M. en Biol. Exp. Mayra Sanchez Vicencio y a Dra. Irma Jiménez por su apoyo en la determinación de proteínas.

A Jorge Lodigiani por la digitalización de geles.

Ricardo Rosas del Depto. Ingeniería Química, DCBI, UAMI Laboratorio de Hidráulica por su apoyo con el EAA.

A mi muy querida Maestra Olga Arciniega Ruiz de E. del IPN por nutrirme de su experiencia y guiarme en el camino de la Histología.

Al personal de la PExPa, en especial al Dr. José Luís Arredondo Figueroa, por permitirme el uso de microscopio-cámara para la toma de Fotografías y a la Dra. Irene Barriga Sosa por sus palabras de aliento y apoyo.

Agradezco al personal del restaurante el típico de Mandinga y a la cooperativa del lugar por su apoyo durante la colecta.

Al Centro Medico Siglo XXI, al personal del laboratorio de Patología de manera especial a mi muy querida compañera, amiga y comadre Irma Hernández, a Paco por su dinamismo, a Oscar y Paty por su apoyo.

A las autoridades de la Instituciones: UAM, UNAM, IPN y Centro Medico siglo XXI, que me permitieron desarrollar este trabajo.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
2.1. Uso de moluscos como indicadores biológicos	2
2.2. Ostión <i>Crassostrea virginica</i>	3
2.2.1. Toxicocinética	4
2.2.2. Metales pesados en <i>C. virginica</i>	5
2.3. Biomarcadores	9
2.4. Biomarcadores en ostión.....	11
2.5. Área de estudio	12
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivo General	18
5.1. Particulares	18
6. Materiales y Métodos	19
6.1. Trabajo de campo	19
6.2. Trabajo de laboratorio	19
6.2.1. Cultivo de Algas	20
6.2.2. Morfometría.....	20
6.2.3. Fase de desintoxicación	21
6.2.4. Bioensayo de intoxicación-desintoxicación con cadmio.....	21
6.2.5. Determinación de Pb, Cr y Cd por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA).....	21
6.2.6. Histopatología	23

6.2.7.	Tinciones especiales: Histoquímica	24
6.2.8.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de proteínas solubles totales de <i>C. virginica</i>	27
6.2.9.	Análisis Estadístico	29
7.	Resultados	30
7.1.	Parámetros Físicoquímicos y morfométricos.....	30
7.2.	Determinación de Metales Cd, Cr y Pb	35
7.2.1.	Metales en agua	36
7.2.2.	Metales en sedimento.....	37
7.2.3.	Metales en ostión.....	37
7.2.4.	Determinación de metales durante la depuración en el laboratorio.	39
7.2.5.	Bioensayo: Concentraciones de Cadmio	41
7.2.6.	Factor de captación (FC)	43
7.2.7.	Correlación de metales con variables biométricas.....	43
7.3.	Histopatología	44
7.3.1.	Organismos de campo y desintoxicados	44
7.3.2.	Bioensayo	53
7.4.	Biomarcadores específicos	60
7.4.1.	Histoquímica	60
7.4.2.	Tricrómica de Masson.....	60
7.4.3.	Azul-Alcian	62
7.4.4.	Ácido Peryódico-Schiff (PAS)	65
7.4.5.	Inmuhistoquímicas; CD45; PAP; CD68.....	67
7.5.	Estudio de las proteínas solubles totales de <i>C. virginica</i> por electroforesis en presencia de SDS.....	72

7.5.1. Extracción de proteínas.	72
7.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) de las proteínas de <i>C. virginica</i>	72
7.6. Correlación de las concentraciones de metales, parámetros fisicoquímicos y las variables biométricas.....	75
8. Discusión.....	78
9. Conclusiones.....	87
10. Referencias Bibliográficas.	90

Índice de figuras

- Figura 1. Anatomía del Ostión *Crassostrea virginica*
- Figura 2. Mapa de la Laguna de Mandinga, y la ubicación de las zonas de colecta.
- Figura 3. Concentración de Metales determinados por EAA en el agua de la laguna de Mandinga, Ver.
- Figura 4. Concentración de Metales determinados por EAA en el sedimento de la laguna de Mandinga, Ver.
- Figura 5. Concentración de Metales determinados por EAA en el ostión de la laguna de Mandinga, Ver.
- Figura 6. Niveles de metales en sedimento, agua y ostión.
- Figura 7. Niveles de metales en organismos sujetos a depuración.
- Figura 8. Aspecto de tracto digestivo mostrando restos de alimento (a) y degeneración de los epitelios (e) que lo recubren en ostión con Cd ($1.2 \mu\text{g g}^{-1}$) y cromo ($61 \mu\text{g g}^{-1}$). Tinción H-E.
- Figura 9. Túbulos de la glándula digestiva en ostión, la luz (L) de los túbulos presentan diferentes radios también se observan restos de la gónada (g). Tinción H-E.
- Figura 10. Organismo analizado con niveles de $50 \mu\text{g g}^{-1}$ de cromo se observa disrupción del epitelio (De) que recubre el intestino y edema en el tejido conectivo también llamado tejido de Leydig en *C. virginica* (TL), sugiriendo lesiones subletales. Tinción H-E.
- Figura 11. Corte longitudinal de los palpos labiales (PL) se muestra las crestas del epitelio y la presencia de vesículas cafés (cc) con la granulación característica del estado fagocítico de este mecanismo de desintoxicación (ostión con $6 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd). Tinción H-E.

Figura 12. Infiltración de hemocitos (h) en tejido conectivo e ostiones con niveles de 29 μg gps-1 de cromo. Tinción H-E.

Figura 13. En A se observan los túbulos de la glándula digestiva (T), en B un acercamiento de las células cafés y en C, el epitelio de recubrimiento interno de los túbulos con edema (ED). Tinción H-E.

Figura 14. Aspecto de lesión subletal en organismos intoxicados con Cromo. Se aprecia en A el aspecto hialino, en B incremento de hemocitos como mecanismo de defensa, en C edema y en D epitelio del esófago dañado. Tinción H-E.

Figura 15. Túbulos (T) de la glándula digestiva en ostión. Se observan los epitelios internos en los túbulos y células basofílicas (cb). Tinción H-E.

Figura 16. Aspecto de las laminillas branquiales (LB) en aumentos progresivos (de A-C), donde se aprecian los efectos inflamatorios en los tubos de agua (TA) persistentes durante la depuración. Tinción H-E T4.

Figura 17. Aspecto de los túbulos durante la desintoxicación, en A se observan los túbulos (T) y la gónada de *C. virginica*, en B la luz de los túbulos con apariencia estrecha y en C observe las células basofílicas (cb) en la base de los túbulos. Tinción H-E T8.

Figura 18. Epitelio del tracto digestivo (TD) durante la desintoxicación (216 h) se observan restos de alimento (a). Tinción H-E.

Figura 19. Tejidos del ostión *Crassostrea virginica* durante la exposición a cadmio (izquierda) y durante la fase de desintoxicación (derecha). En el esófago (A, a) se observa tinción basófila (tb) en los epitelios; en el intestino (B, b) se observa un aspecto degenerativo (de) del epitelio que lo recubre; en la glándula digestiva (C, c) se advierte edema (ED); dentro del tejido conjuntivo se observan algunas células cafés (cc). Tinción H-E.

Figura 20. Tejido branquial y del manto del ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) la branquia muestra basofilia en el epitelio de la región apical; B, b) aspecto de

los lóbulos sensitivos del manto en b) el aspecto es más hialino. Tinción H-E.

Figura 21. Tejido conjuntivo y canales de hemolinfa del ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) células cafés en diferentes tamaños (cc); B, b) hemocitos en aparente migración e incremento. Tinción H-E.

Figura 22. Aspecto de los túbulos durante la depuración con diferente radio interno en la luz (L) de los túbulos. Tinción H-E.

Figura 23. Células cafés en el ostión *Crassostrea virginica*. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva y D) manto.

Figura 24. Hemocitos en tejidos del ostión *Crassostrea virginica*. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva, D) manto y E) branquia

Figura 25. Fibras (F) teñidas en rojo en la base del epitelio de los túbulos y tracto digestivo (A a C) y la presencia de colágeno en las branquias (D). Tricrómica de Masson.

Figura 26. Aspecto de la glándula digestiva en ostión *C. virginica* de Mandinga, Ver. En A se observa el intestino (I) rodeado de tejido de Leydig (TL); en B un aspecto de la luz de los túbulos; en C y D, presencia de células esféricas posiblemente hemocitos; en F presencia de colágena (C) en un organismo intoxicado y posteriormente depurado por 72 h. Tricrómica de Masson.

Figura 27. Presencia de mucinas ácidas (MA) en la parte apical de los epitelios del tracto digestivo, en tejido conectivo y en branquia (A a D), y el contraste de coloración en organismos sometidos a depuración por 24 h, en E aspecto de la luz (L) de los túbulos y en F tracto digestivo (TD) con lesiones. Tinción azul-alcian.

Figura 28. Coloración típica de mucopolisacáridos de tipo ácido en organismos sujetos a depuración por espacio de 15 días. En A a C presencia de células cafés (cc); en D a F, secreción (S) en los borde del manto así como la

tinción hialina observada en organismos del bioensayo de exposición a cadmio y desintoxicados por 9 días. Tinción azul-alcian.

Figura 29. Aspecto de los túbulos (T) de la glándula digestiva (A) organismos intoxicados con Cd y (B), ostiones depurado por 9 días. Tinción azul-alcian.

Figura 30. En A se observa fibras de colágena (rosa) en el tejido conjuntivo ó de leyding. En B la tinción rosa sugiere la presencia de carbohidratos de la membrana basal de los túbulos de la glándula digestiva. En C otro aspecto de la tinción de carbohidratos den la membrana basal del intestino. En D se muestra un aspecto de la secreción (S) de mucopolisacaridos en tracto digestivo y en la luz de los túbulos de organismos intoxicados. Tinción PAS.

Figura 31. Aspecto de mucopolisacaridos neutros en organismos desintoxicados después de la exposición a cadmio. En A observe los túbulos (T) de organismos desintoxicados (24 h); en B a D se nota el radio de los túbulos mas estrecho en organismos depurados 7 días. Tinción: PAS.

Figura 32. Tinción de CD45 en la periferia de los túbulos (T) de la glándula digestiva y gónada (g) y en la porción apical de los cilios del tracto digestivo (TD).

Figura 33. En A Inmunohistoquímica positiva con CD45 en tracto digestivo (TD) de *C. virginica* la tinción fue negativa en lo que aparenta ser el músculo y tejido conectivo (B a D).

Figura 34. PAP evidenció actividad en los túbulos (T) de la glándula y en el tracto digestivo (TD), no se observó en las branquias (C a D).

Figura 35. Respuesta con CD68 en los túbulos de la glándula digestiva del ostión y presencia de macrófagos (Ma) en testigo positivo de ganglio linfático.

Figura 36. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del Ostión *Crassostrea virginica*. (M1= dilución 1:100 y M2= dilución 1:50).

Figura 37. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica*. En 1 Marcadores de peso molecular; de 2 a 4 glándula digestiva y de 5 a 8 proteínas en la branquia del ostión.

Figura 38. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica* de Laguna chica (102 a 105) y la Boca (150 a 151) en Mandinga, Ver., con altas concentraciones de proteínas en cada carril.

Figura 39. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica* de la Laguna de Mandinga, Ver. (Laguna Chica; 102 a 105; La Boca; 150 a 154).

Índice de Tablas

- Tabla 1. Niveles promedio de metales en agua, sedimento y ostión registrados en la Laguna de Mandinga, Veracruz.
- Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos registrados en la laguna de Mandinga, Ver., y durante las pruebas de laboratorio (desintoxicación y bioensayo de toxicidad a cadmio).
- Tabla 3. Datos morfométricos e índice de condición de los ostiones colectados en Mandinga, Ver. (Promedio \pm desviación estándar).
- Tabla 4. Peso seco de *C. virginica* sujetos a desintoxicación por 502 h
- Tabla 5. Datos morfométricos de *C. virginica* intoxicados (72 horas) con cadmio y sujetos a desintoxicación (216 h).
- Tabla 6. Metales en la laguna de Mandinga, Ver.
- Tabla 7. Niveles de metal en *C. virginica* sujetos a depuración
- Tabla 8. Niveles de cadmio en organismos intoxicados y desintoxicados en el laboratorio
- Tabla 9. Correlación de variables biométricas, parámetros fisicoquímicos y concentración de metales
- Tabla 10. Concentración de metal y presencia de lesiones en ostiones de Mandinga y desintoxicados
- Tabla 11. Matriz de correlación en organismos de campo

Resumen

La presencia de contaminantes, como los metales, han afectado a los tejidos del ostión proveniente de la laguna de Mandinga, Veracruz, México. El objetivo de este estudio fue evaluar con biomarcadores, el efecto de la exposición a metales (Cr, Cd y Pb) en el ostión *Crassostrea virginica*, en la laguna antes citada, después de un proceso de desintoxicación en el laboratorio y durante un bioensayo de intoxicación-desintoxicación con cadmio. Muestras de agua, sedimento y ostiones fueron colectadas en marzo, junio y octubre del 2003 y en enero y mayo del 2004. En el laboratorio los ostiones fueron colocados en acuarios con agua libre de metal por 21 días con muestreos cada 72 h. También se analizaron ostiones expuestos a 100 µg/L de cadmio por 72 h y desintoxicados por 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 230 h. Se realizó la determinación de metales cadmio, cromo y plomo en agua, sedimento y ostión por EAA. Los biomarcadores utilizados fueron: índice de condición, respuestas histopatológicas, histoquímicas e inmunocitoquímicas, y el patrón electroforético de las proteínas solubles totales. En el agua de la laguna se registraron concentraciones de todos los metales dentro del límite que establece la legislación mexicana. En el sedimento se registraron valores que no producen efectos biológicos (ERL) de acuerdo al límite propuesto por Long *et al.*, 1995. En los ostiones, las concentraciones más elevadas correspondieron al plomo y fueron mayores de 13 µg g⁻¹, el cadmio se registró en niveles promedio de 2.23 µg g⁻¹ y el plomo arriba de 5 µg g⁻¹. Los niveles de metal detectados en ostión, superaron los límites máximos permitidos (LMP) de Cd y Pb que establece la legislación mexicana. Los ostiones no fueron capaces de eliminar el metal bioacumulado a concentraciones menores del LMP durante la fase de desintoxicación; los expuestos a cadmio en el laboratorio tampoco eliminaron el metal después de 384 h. El análisis histopatológico reveló lesiones en la glándula digestiva; edema, atrofia de los epitelios en la luz de los túbulos del tracto digestivo, presencia de vesículas cafés, reacción hemocítica y necrosis. Durante la desintoxicación se observó mayor número de epitelios en los túbulos, e incremento de las vesículas cafés y de la reacción hemocítica. Relaciones estadísticamente significativas se establecieron entre la concentración de contaminantes en los tejidos de los ostiones con las concentraciones de cadmio y cromo determinadas en el sedimento ($r = 0.64$ y 0.80 respectivamente). Sobre el promedio, 47% de los ostiones presentaron lesiones histopatológicas que pueden relacionarse con las concentraciones de metales. El patrón electroforético demostró un incremento de proteínas con Mr de 70, 45 y 15 kDa que sugieren la sobre-expresión de proteínas chaperonas y metalotioneínas. Es importante continuar con el monitoreo con los biomarcadores estudiados en este trabajo, así como detectar las fuentes de contaminación y la evaluación de efectos en organismos a fin de que se cuente con criterios para la selección de áreas de cultivo, y la explotación de tan importante recurso pesquero a nivel nacional.

Abstract

The presence of pollutants, such as toxic metals, is affecting the tissues of the oyster from the Mandinga Lagoon, State of Veracruz, Mexico. The objective of this study was to assess, with biomarkers, the effects of exposure to metals (Cr, Cd y Pb) on the oyster *Crassostrea virginica* in the cited lagoon; after a depuration process in the laboratory and during a cadmium intoxication-depuration bioassay. Samples of water, sediment, and oysters were collected in March, June, and October 2003 and in January and May 2004. In the laboratory, the oysters were kept in aquariums with metals free water for 21 days sampling every 72 h. Oysters were exposed to 100 µg/l of cadmium for 72 h and depurated (for 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, and 230 h). Metal concentrations were determined in water, soil and oyster tissue in fresh and detoxified *Crassostrea virginica* by EAA. The biomarkers used were: condition index, histopathological responses as histochemistry and immunohistochemistry, and analysis of the electrophoretic pattern. Metal concentrations in the lagoon water were within the permissible limits established by Mexican legislation. The values in sediments correspond to those not producing biological effects (ERL) according to the limit proposed by Long *et al.*, (1995). In the oysters, the highest concentrations corresponded to Pb and were above 5.84 µgg-1 dry weight (d.w.), Cd was recorded at average values of 2.23 µgg-1 d.w., and Cr values were above 6 µgg-1 d.w. The metal levels detected in oysters exceeded the maximum permissible limits (MPL) for Cd and Pb as established by Mexican legislation. Oysters were unable to eliminate the concentrations of bioaccumulated metals during the detoxification stage. Oysters exposed to cadmium in the laboratory did not eliminate the metal after 384 h. The histopathological analysis revealed lesions in the digestive gland, edema, and atrophy of epithelia in the digestive tubules, presence of brown vesicles, hemocytic reaction, and necrosis. During detoxification, a higher number of epithelia were observed in the tubules, as well as an increment in brown cell vesicles and hemocytic reaction. Statistically significant correlations were established between the concentration of contaminants in oyster tissues and the concentrations of Cd and Cr in sediments ($r = 0.64$ and 0.80 , respectively). Forty seven percent of oysters presented histopathological lesions related with the metal concentrations. The electrophoretic pattern showed an increased of 70, 45 and 15 kDa proteins, this suggests the over-expression of chaperone and metalotionein proteins. It is important to continue monitoring the biomarkers studied in this work and to detect the sources of pollution, as well as to evaluate the effects on the organisms to be able to select culture areas and establish adequate criteria for the exploitation of such an important fishery resource at the national level.

Key works: Oyster, *Crassostrea virginica*, metals, histopathological.

1. Introducción

En México existen grandes problemas de manejo en la zona costera. Éstos son derivados, en gran parte, por el vertimiento de desechos industriales y domésticos, potencialmente tóxicos para los organismos acuáticos.

En el Golfo de México se han encontrado diferentes tipos de contaminantes, entre los que destacan los metales pesados (cadmio, cromo, plomo, mercurio, níquel y zinc), hidrocarburos y pesticidas. Estos contaminantes son derivados, principalmente, de las actividades industriales, petroleras, metalúrgicas y de producción y uso de fertilizantes (Villanueva y Botello, 1998).

Las fuentes principales de metales en ambientes acuáticos se originan en el lavado de los suelos agrícolas donde se han depositado altas cantidades de agroquímicos provenientes de monocultivos (UNEP, 1985) así como de impurezas provenientes de aleaciones con plomo, cobre, plata, aluminio, níquel, cerámica, pigmentación fotográfica y reactores nucleares (Pringle y Shuster, 1977).

Los análisis en agua, sedimento y organismos proveen una información integral para el estudio de la dinámica de los contaminantes. En diversos estudios se ha señalado la importancia de utilizar organismos bentónicos por la relación que guardan con los sedimentos y el agua del lugar en donde se desarrollan (Villanueva y Botello, 1998, Luna *et al.*, 2002). Este es el caso del ostión *Crassostrea virginica*, que también representa un recurso de gran importancia comercial en la zona costera del Golfo de México.

C. virginica ha sido objeto de diferentes estudios para determinar: Niveles de contaminantes, evaluación de procesos de bioacumulación y biomagnificación, estudios de letalidad y de subletalidad; y, en años recientes, respuestas fisiológicas ante agentes tóxicos (Pringle y Shuster, 1977, Greig y Wenzloff, 1978, Frazier, 1979, Zarogian y Morrison, 1981, Hetzel y Wright, 1983, Palmer *et al.*, 1993, Gold-Bouchot *et al.*, 1997, Roesijadi *et al.*, 1997, Barrera, 2006).

Cuando la tasa de captación de contaminantes supera su tasa de eliminación los procesos fisiológicos cambian. Las respuestas biológicas y ecológicas que se producen en presencia de contaminantes (orgánicos e inorgánicos) varían desde modificaciones a nivel poblacional/comunidades, a nivel orgánico/tisular e, incluso, a nivel molecular (Chavin, 1973).

En México, la carencia de infraestructura y normatividad para el manejo de desechos, entre otros factores, hace necesario realizar estudios para identificar los principales contaminantes y sus efectos en las poblaciones acuáticas, así como biomonitoreo para la implantación de medidas correctivas y favorecer el buen uso de los recursos (CENICA-SEMARNAT-.PLANAME, 2002).

2. Antecedentes

2.1. Uso de moluscos como indicadores biológicos

Los bivalvos constituyen un amplio grupo de organismos, en términos de biomasa o como organismos filtradores en muchos ecosistemas, son organismos sésiles, bentónicos y consumidores primarios. Los estudios con bivalvos se han utilizado ampliamente en la detección de sustancias contaminantes, estudios experimentales, fisiológicos, bioquímicos, genéticas e investigaciones toxicológicas (Salazar y Salazar, 1991). El uso de estos organismos como “biomonitores” de contaminación se deriva de los siguientes atributos: son sedentarios, con rutas de exposición variables y de relativa tolerancia, sin embargo también son capaces de cerrar sus valvas en condiciones no favorables y su potencial de biotransformación es claramente menor que en otros grupos (ejem. vertebrados) por lo que han sido seleccionados como organismos centinelas para el estudio de la contaminación (Farris y Van Hassel, 2007).

Existen programas internacionales de biomonitoreo como “Mussel match” (Goldberg y Bertine, 2000), MEDPOL (Gabrieldes, 1997) OSPAR, BIOMAR (Banni *et al.*, 2005, Narbonne *et al.*, 2005), algunos programas tienen como propósito la evaluación del riesgo ecológico a través de la extrapolación de datos químicos

mientras que otros proponen el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes a través del uso de biomarcadores (Dondero *et al.*, 2006). El género *Crassostrea* ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de la contaminación en diferentes ecosistemas (Rebelo *et al.*, 2003).

2.2. Ostión *Crassostrea virginica*

El ostión es un molusco bivalvo que habita en ambientes salobres; es bentónico y sésil. Presenta dos estructuras calcáreas (valvas), controladas por un músculo abductor, además de tejido y órganos internos entre los que destacan: el manto con función sensorial; las branquias, que participan en la respiración y alimentación; y un sistema digestivo sencillo que junto con numerosos ductos primarios y secundarios forman la glándula digestiva (Roesijadi *et al.*, 1997, Palacios Fest y Vargas Rangel, 2002) (Figura 1).

El sistema excretor se deriva del mesodermo, la glándula pericardial, parte del sistema excretor de los bivalvos, esta reducida en *C. virginica* a células mesoteliales granulares de la línea de células pericardiales. Existen varios tipos de células, algunas de ellas contienen muchos gránulos (diámetro de 1µm) que se tiñen de amarillo a café con hematoxilina-eosina (Eble y Scro, 1996).

En el sistema circulatorio la hemolinfa circula a través de la masa visceral y posteriormente por las branquias antes de retornar al corazón. El sistema es abierto, es decir el suero y los hemocitos no están en el interior del corazón y vasos, sino que se encuentran en senos y tejidos. Las funciones de los hemocitos son; reparación de la concha, digestión, transporte, excreción y mecanismos de defensa. Los hemocitos pueden diferenciarse dependiendo de las necesidades en granulocitos basófilos, acidófilos, fibroblastos, mioblastos y células pigmentadas; los granulocitos basófilos y las células pigmentadas, se relacionan con los mecanismos de defensa. Los cuales en ostión se han clasificado en dos tipos; respuestas celular mediada (fagocitosis y encapsulación) y factores humorales (enzimas) (Cheng, 1996, Eble, 1996).

Su alimentación por filtración de agua es favorecida por secreciones mucoides del manto cuya composición depende del tipo de partícula a transportar (Beninger y St-jean, 1997), este hábito alimenticio permite concentrar metales y otros agentes xenobióticos en los tejidos blandos (Rand y Petrocelli, 1985).

2.2.1. Toxicocinética

La relación entre la concentración de contaminantes inorgánicos, tales como metales en el medio acuático y la concentración en el tejido de ostión, así como su potencial efecto tóxico depende del entendimiento de la cinética de incorporación, distribución y eliminación de contaminantes.

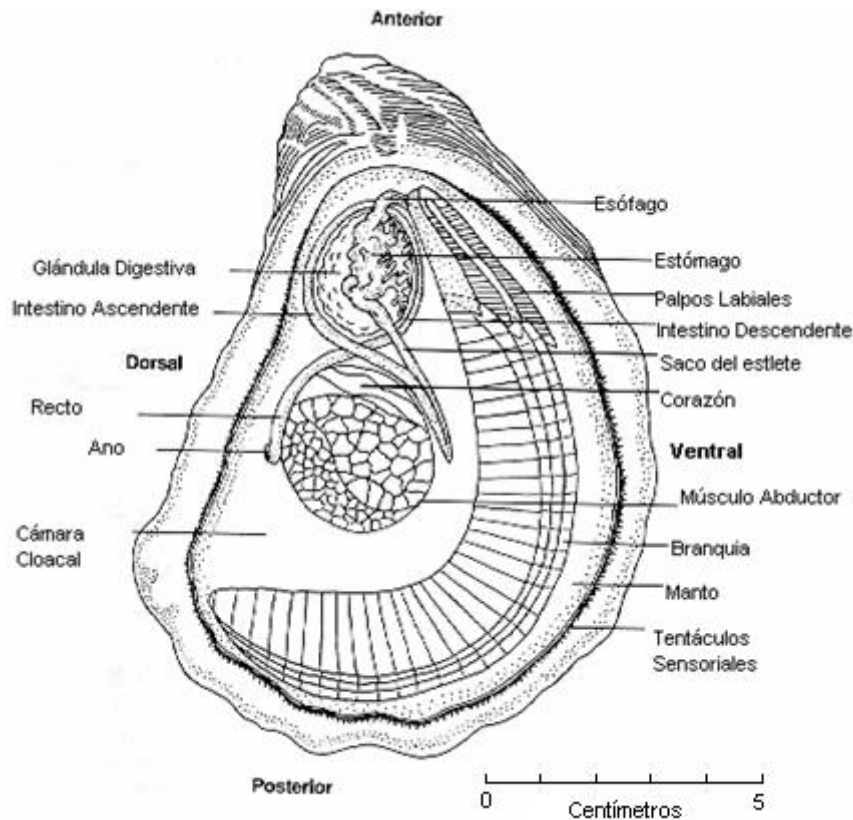


Figura 1. Anatomía del Ostión *Crassostrea virginica* (Kennedy y Newell, 1996).

Diversos estudios han demostrado que las partículas suspendidas son la principal ruta de incorporación de metales (Lacerda *et al.*, 1987). Las vías principales de incorporación de xenobióticos disueltos en el agua pueden ser: a través del manto, las branquias y/o el tracto digestivo de *C. virginica*. Una vez adentro pueden

interactuar con sus procesos fisiológicos. La incorporación de contaminantes a través de los mecanismos primarios de alimentación y de respiración implican mecanismos pasivos y activos. En el caso de los metales, mecanismos de difusión facilitada, transporte activo o endocitosis (Marygomez *et al.*, 2002).

La acumulación de contaminantes desde la columna de agua se conoce como “bioconcentración” y se da cuando la tasa de incorporación supera la de eliminación. Los moluscos bivalvos a pesar de ser filtradores, usualmente no alcanzan el estado de equilibrio dinámico, donde la concentración de un químico en tejido permanece esencialmente constante durante la exposición, por lo que la magnitud de la concentración puede ser el principal factor que determine el factor de bioacumulación (EPA (Environmental Protection Agency), 1984).

Algunos estudios sugieren que la bioacumulación de metales en ostión muestra una cinética monocompartamental de primer orden, lo cual puede sugerir un proceso homogéneo de distribución de contaminantes. Walsh y O'Halloran (1998), reportaron un patrón de acumulación de metales en este orden: branquias, riñón, glándula digestiva, manto y músculo abductor, presentando alta correlación entre algunos tejidos como son: glándula digestiva-riñón, branquia-músculo abductor.

En el ostión, una parte de los metales se acumulan en la fracción no soluble, probablemente se asocian a gránulos amorfos (Cooms, 1974). Recientemente, se ha demostrado que la incorporación puede requerir grandes periodos para llegar al equilibrio dinámico y la depuración es relativamente baja (Wallner-Kersanach *et al.*, 2000) por lo que se ha cuestionado el uso del ostión como organismo centinela (Rebelo *et al.*, 2003).

2.2.2. Metales pesados en *C. virginica*

A diferencia de otros contaminantes, los metales son elementos químicos que el hombre no crea ni destruye, el hombre introduce en el medio ambiente estos elementos como consecuencia de las distintas actividades humanas y, por otra, altera la forma química o bioquímica en que se encuentran (Moreno, 2003).

Los ambientes acuáticos son afectados por esta movilización antropogénica de metales. Muchos metales son constituyentes naturales del medio y son esenciales en la función celular. Diversos procesos que controlan la bioacumulación y distribución intracelular son responsables de la concentración en los tejidos de los organismos. Estos procesos incluyen eventos químicos que resultan en la presencia de especies metálicas biodisponibles y procesos biológicos que controlan el metabolismo de metales (Neff, 2002).

Se ha reportado la presencia de metales como el cadmio, plomo y cromo en tejidos de ostión. La importancia relativa de las alteraciones o daños causados por metales dependen tanto de sus propiedades químicas como de las posibilidades de excreción, interacción con proteínas, secuestro e, incluso, de su acumulación a través de las cadenas tróficas de los organismos acuáticos (Kennedy y Newell, 1996).

Cadmio (Cd)

El cadmio (Grupo II B, con valencia 2^+) en forma biodisponible es uno de los metales más tóxicos, puede ser mutagénico o carcinogénico, afecta el crecimiento, la tasa de respiración, la actividad enzimática y la contracción muscular (Eisler, 1985).

La incorporación de cadmio a través de las branquias de invertebrados marinos es inversamente proporcional a la concentración de calcio en el agua, sugiriendo que el calcio y el cadmio compiten por los sitios activos, sin embargo la mayor parte del cadmio es captado de forma pasiva, a través de difusión simple por la membrana biológica, o por adsorción desde la superficie de los epitelios (Neff, 2002).

La bioacumulación de cadmio y otros metales induce la producción de proteínas con afinidad a estos iones metálicos, como es el caso de las metalotioneínas. Estas metalotioneínas inmovilizan este metal, manteniendo concentraciones de cadmio libre, disuelto ó iónico muy bajas en el citoplasma de la célula. Algunos otros compuestos orgánicos, tales como glutatión, también participan en la

inmovilización del metal (Neff, 2002). En algunos estudios subletales se ha evaluado la acumulación de metales y los resultados han sido contradictorios. Zarogian (1979), mostró que *C. virginica* presenta gran resistencia y bajas tasas de mortalidad cuando se sometió por 40 semanas a intoxicación con cadmio, alcanzando niveles de hasta $274 \mu\text{g g}^{-1}$. Contrariamente, Guzmán-García (2001), en condiciones experimentales similares observó lesiones al parecer irreversibles cuando *C. virginica* acumuló cadmio a sólo $20 \mu\text{g g}^{-1}$.

La acumulación de cadmio puede llevarse a cabo a través de transporte pasivo o activo en un intervalo que va de 0.003 a $270 \mu\text{g g}^{-1}$ (Neff, 2002). La incorporación de este metal depende de la concentración, duración de la exposición, longitud del organismo y los mecanismos de desintoxicación, por lo tanto se observa una gran variación.

Se ha determinado un factor de captación de 140 para organismos en condiciones experimentales y de 149 al exponer *Crassostrea virginica* por 21 días a cloruro de cadmio (Eisler, 1972). Se ha estimado una vida media en condiciones experimentales de 123 h para cadmio (Guzmán-García, 2001), sin embargo (Engel, 1999) reportó que en exposiciones controladas en el laboratorio *C. virginica* no presentó capacidad de depuración para Cd, Cu o Zn.

Plomo (Pb)

El plomo (Grupo IV A, con valencia 4, 2^+) es un metal muy distribuido en la naturaleza. Se utilizan compuestos de plomo como pigmentos, cosméticos, para la fabricación de baterías para automóviles, en la industria televisora, etc. Este metal afecta el sistema nervioso, tiene efectos hematológicos, renales, en la reproducción y está clasificado junto con sus compuestos por la IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) en el grupo 2B de agentes cancerígenos (Moreno, 2003).

El plomo es incorporado principalmente en las células epiteliales del tracto digestivo y posiblemente en otros tejidos como el manto y las branquias, en los moluscos (George *et al.*, 1979). La presencia de plomo en ostiones de ambientes

naturales se ha estimado en niveles que van de 0.06 a 3.15 (NOAA, 1983) y en el Golfo de México de 0.5 a 12.4 $\mu\text{g g}^{-1}$. Estudios experimentales han reportado concentraciones de 6.517 ppm y se ha estimado una CL_{50} de 0.47 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el bivalvo *Mytilus edulis* (Luna *et al.*, 2002).

Se han reportado altos factores de bioconcentración de 536 para *C. virginica*, la eliminación del plomo se ha descrito como bifásica con una vida media de 1.4 días y una pérdida secundaria de 2.5 meses (Boisson *et al.*, 1998).

El plomo reduce la capacidad reproductora, inhibe la actividad de la Na-K ATPasa, altera los sistemas de reparación de ADN, incrementa la producción de radicales libres y es neurotóxico (Ewers y Schlikoter, 1991).

Cromo (Cr)

El cromo (grupo VI, con valencia, +2,+3 y +6) puede encontrarse en distintos estados de oxidación, sus aplicaciones son múltiples, obtención de acero, recubrimiento electrolítico de superficies metálicas o plásticos y la fabricación de materiales cerámicos. El cromo trivalente es un nutriente esencial para todos los vertebrados, debido al papel que desempeña en el mantenimiento de la tolerancia a la glucosa; el cromo hexavalente cruza rápidamente las membranas biológicas, los efectos agudos son lesiones renales, en glomérulos y túbulos. El cromo (VI) está clasificado como agente cancerígeno del Grupo I por la IARC (Moreno, 2003).

La concentración de cromo en organismos marinos se ha registrado de 0.06 a 3.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ (NOAA, 1995) y de 0.89 a 4.60 $\mu\text{g g}^{-1}$ en costas mexicanas (Rosas *et al.*, 1983). Las concentraciones de cromo en tejidos de moluscos bivalvos usualmente son inferiores de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Neff, 2002).

El cromo es moderadamente tóxico para los organismos marinos y es genotóxico en su forma de cromo hexavalente Cr^{+6} e induce aberraciones cromosómicas (Gauhlhofer y Bianchini, 1991).

Mecanismos de desintoxicación.

La depuración de metales en moluscos bivalvos no se efectúa al 100% en un medio libre de metal y el porcentaje de eliminación varía para cada metal de acuerdo con Lakshmanan y Nambisan (Lakshmanan y Nambisan, 1989).

Múltiples mecanismos de desintoxicación pueden influenciar la incorporación, distribución y eliminación de metales. Los mecanismos de desintoxicación incluyen acciones simples como el cierre de las valvas, el decremento de la tasa de filtración o la inducción de proteínas de bajo peso molecular (metalotioneínas). Los metales como el cadmio, plomo y el cromo demuestran afinidad por ligandos del azufre y nitrógeno. Sin embargo metales como el cadmio y el plomo también pueden formar gránulos (de calcio o fosfato, quizá como $PbCO_3$) (Luoma, 1986).

La importancia relativa de las alteraciones o daños causados por metales depende tanto de sus propiedades químicas como de las posibilidades de excreción, interacción con proteínas, inmovilización e, incluso, de su acumulación a través de las cadenas tróficas de los organismos acuáticos. Las respuestas biológicas se han utilizado para evaluar la exposición a tóxicos a través de biomarcadores.

2.3. Biomarcadores

Un biomarcador es un cambio en una respuesta biológica (a nivel molecular, celular, bioquímica, fisiológico o de la conducta) que puede ser relacionado con la exposición, o el efecto de un tóxico o químico ambiental (Peakall, 1994).

Los biomarcadores o indicadores biológicos se definen como señales identificables evaluadas por cambios en fluidos corporales, células y tejidos, que proporcionan advertencias tempranas del daño provocado por agentes tóxicos o contaminantes (Koeman, 1991).

Los biomarcadores son característicos de las respuestas biológicas de los organismos que han sido expuestos, ó afectados por agentes xenobióticos (de *xenos*= extranjero y *bióticos*= relativo a la vida). Las señales pueden incluir cambios bioquímicos, histológicos, morfológicos, fisiológicos o de expresión

genética (RNA y proteínas) y pueden ser observadas en cualquier parte del organismo (Ryan y Hightwer, 1996).

Los cambios histológicos e histopatológicos producidos por los contaminantes en órganos/tejidos pueden presentarse antes de que se produzcan efectos irreversibles a niveles de organización más elevados. Un “sistema de alarma” de gran importancia para la sobrevivencia de las especies, así como para la protección del medio ambiente, es la utilización de biomarcadores en combinación con otros parámetros, como es la cuantificación de metales (Ortiz, 1999).

La ventaja del estudio de las respuestas fisiológicas tempranas a la contaminación, radica en la detección desde las primeras fases de daño biológico. El uso de bioensayos de laboratorio para la determinación de los efectos de la contaminación se ha convertido en una herramienta estandarizada de gran valor. Sin bien, éstos pueden no ser representativos de lo que sucede en ambientes naturales. Es por esto que es ampliamente recomendable realizar los análisis físico-químicos de muestras ambientales complementados con las pruebas biológicas para determinar el grado de riesgo biológico.

Los biomarcadores pueden clasificarse en diferentes categorías dependiendo del nivel de organización biológica: 1) enzimas de biotransformación (que participan en la desintoxicación de xenobioticos y sus metabolitos); 2) productos de biotransformación, 3) aminoácidos y proteínas, 4) hematológicos, 5) inmunológicos, 6) reproductivos y endocrinos, 7) neuromusculares, 8) genotóxicos y 9) fisiológicos y morfológicos (Farris y Van Hassel, 2007).

Los cambios en la fisiología tanto a nivel celular, como de los organismos completos, se han clasificado en: Respuestas adaptativas, que prevén el daño; respuestas de daño subletal y respuestas de daño letal (Ryan y Hightwer, 1996).

Las respuestas adaptativas y de daño subletal se pueden evaluar a través de biomarcadores de efecto y biomarcadores de exposición (Sanders *et al.*, 1990). Los biomarcadores de efecto forman parte de las respuestas que previenen el daño celular mediante mecanismos de desintoxicación que ligan o excretan el agente tóxico; en tanto que los biomarcadores de exposición revelan las lesiones

subletales que se originan por la incapacidad de las defensas ante el agente estresor. Por último, las respuestas letales implican necrosis o apoptosis cuando los mecanismos de protección y corrección son rebasados.

Los biomarcadores se utilizan para: detectar la presencia de exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población, para fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (McCarthy y Shugart, 1990).

2.4. Biomarcadores en ostión

Las enfermedades, el estrés y el estado de ayuno modifican la apariencia de los túbulos digestivos del ostión, presentando bajo epitelio de absorción entre otras anomalías histológicas de la glándula, las que se han recomendado como indicadores de la condición fisiológica general de los bivalvos (Lowe *et al.*, 1981).

En el ostión se ha reportado la presencia de células con vesículas, que presentan un alto contenido de glutatión reductasa, fosfatasa ácida y lisozimas, llamadas “células cafés” (llamadas así, porque presentan vesículas con tinción café al aplicar hematoxilina-eosina). Estas células pueden participar potencialmente en los procesos degradativos y de desintoxicación (Zaroogian y Yevich, 1994).

La presencia de glutatión en los moluscos bivalvos promueve reacciones de conjugación y juega un papel importante durante el proceso de desintoxicación, por ello, es un biomarcador utilizado en algunos estudios de biomonitorio, y su decremento se asocia con el incremento de la toxicidad de metales (Ringwood y Conners, 2000).

Roesijadi *et al.*, (1997) ha demostrado que hemocitos de *C. virginica* expuestos a bajas concentraciones (5-10 μM) de cadmio inducen la formación de metalotioneínas y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), en tanto que a concentraciones altas (36-356 μM) decrecen las metalotioneínas y

disminuye la producción de especies oxígeno reactivas (ROS por sus siglas en ingles) probablemente como respuestas a la citotoxicidad del cadmio.

Una veintena de proteínas se inducen como una respuesta a algunos agentes tóxicos como mecanismo preventivo y de reparación de los daños. Estas son conocidas como proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en ingles) o proteínas de estrés. Se ha reportado la inducción de la proteína Hsp70 como resultado de la exposición a sedimentos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y policíclicos bifenilos (PCBs)(Cruz-Rodriguez *et al.*, 2000, Cruz-Rodriguez y Chu, 2002).

La proteína de estrés Hsp70 es un biomarcador que se presenta en concentraciones elevadas en organismos expuestos a metales pesados. Estos resultados se han utilizado junto con otros biomarcadores para evaluar la salud de moluscos (Werner *et al.*, 2004).

2.5. Área de estudio

México ocupó el cuarto lugar antes de 1980, en la producción ostrícola mundial y actualmente contribuye con cerca de 5 %. Los países con mayor contribución dependen de la ostricultura, mientras que en nuestro país la extracción de ostión es silvestre (Palacios Fest y Vargas Rangel, 2002).

A escala nacional el ostión ocupa por volumen el sexto lugar de los productos pesqueros y el estado de Veracruz es el primer productor. Entre las principales regiones productoras de ostión en el estado se encuentra La laguna de Mandinga, ubicada en la región sur junto con la laguna de Alvarado, la Mancha, Grande y el estuario de Tecolutla. Estos cuerpos de agua tienen una superficie de más de 9000 ha y aportan el 32% de la producción del estado. Existen antecedentes que señalan que la producción ha bajado considerablemente, en esta región de 1991 a 1996 (Palacios Fest y Vargas Rangel, 2002).

Mandinga está constituida por tres cuerpos lagunares, ubicados entre los paralelos 19° 00' a 19°06' N y los meridianos 96°02' y 96°06' W (Figura 2). El sistema

presenta un clima cálido con régimen de lluvias en verano y un régimen de lluvias menos invernal (García, 1988).

Los sedimentos son finos y la salinidad puede encontrarse de 0.9 a 35%(Reguero, 1994). Sin embargo, en esta laguna dominan las condiciones de estuarinidad y su salinidad promedio esta entre 20 y 30 ‰, su temperatura fluctúa entre 30- 35° C y presenta concentraciones de oxígeno entre 3.0 – 4.0 ml/L (Contreras-Espinoza *et al.*, 2002).

Las características de esta laguna la hacen apropiada para cultivos en suspensión. Sin embargo en los últimos treinta años la producción no ha sido estable, debido principalmente a que la extracción depende un 80% de los bancos ostrícolas que requieren un trabajo constante para ser productivos y por los problemas ambientales.

Las intensas actividades comerciales, industriales y de la población agravan más el problema de contaminación por metales (Villanueva y Botello, 1998), en tanto que los procesos de industrialización generan cantidades potencialmente tóxicas de hidrocarburos. En Mandinga las actividades pecuarias son intensas con uso indiscriminado de agroquímicos y existe un arrastre de aportes por el río Jamapa además de aportes de diversas industrias establecidas a lo largo de la cuenca de captación de los efluentes que influyen en el sistema (Hernández, 1996).

En la laguna de Mandinga, se han reportado niveles de hidrocarburos (18 µg/g) en sedimento por debajo del límite establecido por la UNESCO (70 µg/g)(1996), situación contraria a la relacionada con los metales plomo, cadmio y cromo reportados por arriba de los límites máximos permitidos (LMP) por la legislación mexicana en agua y organismos, los datos reportados para 1996 se registran en la tabla 1.

Los LMP de la legislación mexicana para el control de la calidad de moluscos bivalvos han sido importados de otras legislaciones y tienen poca relación con el estado de salud de los organismos. El presente estudio se desarrollará con organismos provenientes de la laguna de Mandinga, que es uno de los principales ecosistemas costeros de Veracruz.

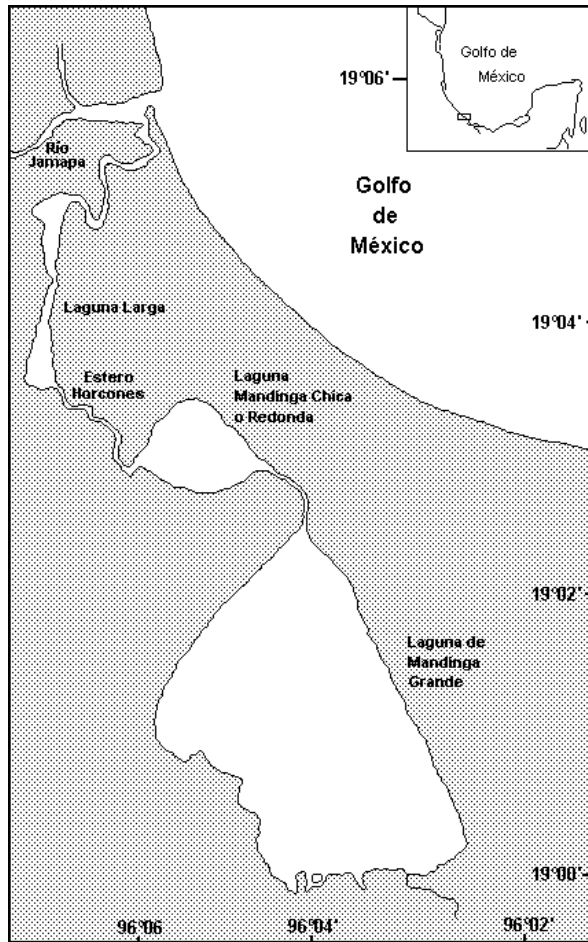


Figura 2. Mapa de la Laguna de Mandinga, y la ubicación de las zonas de colecta.

Tabla 1. Niveles promedio de metales en agua, sedimento y ostión registrados en la Laguna de Mandinga, Veracruz.

	Plomo	Cadmio	Cromo
Columna de Agua (mg l^{-1})	125 ± 356	2.0 ± 1.0	4.0 ± 1.0
Sedimento ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3.34 ± 3.25	0.015 ± 0.029	7.43 ± 8.32
Sedimento total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	55.15 ± 24.43	1.09 ± 0.58	21.92 ± 10.14
Sedimento biodisponible ($\mu\text{g g}^{-1}$)	11.60 ± 1.89	0.80 ± 0.65	0.96 ± 0.62
<i>C. virginica</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$)	11.55 ± 0.33	3.13 ± 1.25	3.32 ± 3.58
LMP en agua (mg l^{-1})	0.40	0.20	1.00
LMP en ostión para consumo humano ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1.00	0.50	13.00*

L.M.P utilizados (Límites máximos permisibles):

En agua NOM-001-ECOL-1996 (D.O.F., 1997)

En Ostión NOM-031-SSA1-1993(D.O.F., 1995) y *Niveles críticos para consumo de moluscos bivalvos: cadmio (3.7) y plomo (1.7) (FDA, 1993).

3. Justificación

En México son escasos los programas de monitoreo de la contaminación y el diseño raramente contempla aspectos fisiológicos y toxicológicos en especies indicadoras. La escasez de estudios al respecto y la necesidad de conocer el estado de nuestros recursos justifica la búsqueda de técnicas rápidas, precisas y de bajo costo que permitan obtener información para poder establecer el riesgo que corren especies de interés comercial como *C. virginica* generando al mismo tiempo, información que puede contribuir a reducir riesgos en la salud pública por el consumo de esta fuente de alimentación.

4. Hipótesis

Los organismos expuestos un tercio de vida en la laguna de Mandinga a concentraciones por arriba del límite permisible presentarán efectos reversibles o irreversibles que se manifestaran a través del empleo de biomarcadores específicos.

5. Objetivo General

Evaluar con biomarcadores de exposición la respuesta producida por metales; cromo, cadmio y plomo en el ostión *Crassostrea virginica* sujeto a exposición subcrónica en la laguna de Mandinga, Ver.; después de un proceso de desintoxicación y durante un bioensayo de intoxicación-desintoxicación con cadmio.

5.1. Particulares

- Determinar el índice de estado de los organismos y sus características morfométricas.
- Determinar los niveles de contaminantes críticos (cadmio, plomo y cromo) en agua, sedimento y ostión juvenil provenientes de Mandinga, Ver.
- Determinar los niveles de contaminantes críticos (cadmio, plomo y cromo) en ostión juvenil y relacionarlo con los niveles registrados en agua y sedimento del lugar de colecta.
- Analizar los cambios histopatológicos en la glándula digestiva del ostión *Crassostrea virginica* en organismos de campo, depurados y sujetos a intoxicación-desintoxicación como respuesta a un estrés producido por la exposición a estos iones en la Laguna de Mandinga, Ver.
- Evaluar el proceso de intoxicación y desintoxicación así como la reparación de los tejidos en organismos de la laguna y organismos sujetos a pruebas de laboratorio mediante biomarcadores específicos (Histoquímicas e inmunocitoquímicas: pas, azul alciano, tricrómica de Masson, Cd45, Cd68, fosfatasa alcalina placentaria, metalotioneínas y patrones electroforéticos).
- Correlacionar las concentraciones de metales, parámetros fisicoquímicos y las variables biométricas (índice de estado, lesiones presentadas y respuestas específicas).

6. Materiales y métodos

6.1. Trabajo de campo

Se colectaron muestras de agua, sedimento y ostión en tres estaciones estratégicas de la laguna de Mandinga (Laguna Grande, Laguna Chica y la Boca de la Laguna Chica), durante las estaciones climáticas características de la zona en el año 2003 y 2004.

Las muestras de agua se colectaron en un frasco de plástico de 1 L de capacidad, a una profundidad de 15 cm aproximadamente, se le agregaron 5 mL de H₂SO₄, y se congelaron hasta su posterior análisis.

Los sedimentos se colectaron con una draga tipo Van Veen. Se drenó cuidadosamente el agua superficial y se extrajo la muestra de la parte central con una pala de plástico. Se tomaron aproximadamente 200 g de sedimento húmedo y se colocaron en una bolsa de polietileno, almacenándolas en una hielera hasta su análisis.

Se colectaron aproximadamente 60 ostiones por estación para la evaluación del índice de estado, histología, determinación de proteínas y metales; plomo, cadmio y cromo. Un lote similar fue transportado al laboratorio para evaluar el proceso de desintoxicación.

6.2. Trabajo de laboratorio

Los ostiones fueron colocados en dispositivos experimentales de 40 L en agua artificial Instant Ocean (Shumway y Koehn, 1982) con las condiciones óptimas para su desarrollo. Se controlaron los niveles de pH (7.9), temperatura (25°), salinidad (22 ppm), alimentación (10,000 cel/mL), oxígeno disuelto (7.3 mg/L) y contenidos de amonio (NH₃: 4.8 μM/L). Los ostiones se mantuvieron en el laboratorio para desintoxicarlos durante 21 días. Paralelamente se realizó un

bioensayo de intoxicación-desintoxicación con organismos expuestos a 100 µg de cadmio. El mantenimiento de los ostiones en el laboratorio requirió del control de diversos parámetros, alimentación y algunos aspectos técnicos. A continuación se detallan los aspectos generales.

6.2.1. Cultivo de algas

Los organismos se alimentaron con algas (*Tetraselmis suecica*) cultivadas en el laboratorio (un mes antes de la colecta). El sistema de cultivo de las algas consistió en una serie de recipientes de cristal con capacidad de 20 L con medio Guillard F/2, colocados en un dispositivo con iluminación y aireación constante. Se realizaron conteos regulares de la densidad de población, hasta alcanzar una producción estable de células suficiente para alimentar ostiones en mantenimiento (de 1 a 15 millones de células/mL (SEPESCA-Secretaría de Pesca, 1988), los ostiones se alimentaron una vez al día con 0.68 mL del cultivo por ostión (Castrejón *et al.*, 1994).

6.2.2. Morfometría

Los ostiones colectados fueron lavados y etiquetados. Los datos morfométricos registrados fueron los siguientes: peso total, peso húmedo, peso de la concha, peso de la masa visceral y peso seco, longitud, ancho, altura, y volumen intervalvas; los pesos fueron determinados mediante una balanza analítica con sensibilidad de hasta 0.001 g las tallas, con ayuda de un vernier y el volumen, con ayuda de una probeta. Con los datos de longitud, ancho de la valva, altura, cavidad de la concha, y peso total húmedo, se estableció el índice de condición de acuerdo con el criterio de (Hetzl y Wright, 1983). Se calcula con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{peso seco} \times 100}{\text{Peso seco de la concha}}$$

6.2.3. Fase de desintoxicación

Los ostiones colectados se colocaron en acuarios de 40 L por 21 días, Se tomaron muestras de ostión (triplicadas) y agua del acuario cada 72 h para evaluar el proceso de desintoxicación.

6.2.4. Bioensayo de intoxicación-desintoxicación con cadmio

El bioensayo necesitó control de variables de origen por ello, previo a la exposición se mantuvieron cerca de 30 días en un sistema de aclimatación de 560 L, con flujo continuo y biofiltros. Sesenta y seis ostiones, fueron expuestos a 100 µg/L de Cd en acuarios de 40 L. La fase de intoxicación tuvo una duración de 72 h y la fase de desintoxicación fue de 230 h con muestreos de 3 organismos a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 230 h. Paralelamente se colectaron 3 ostiones testigo que se encontraron en peceras semejantes pero sin entrar en contacto con el cadmio.

6.2.5. Determinación de Pb, Cr y Cd por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

Para la determinación de los metales los recipientes utilizados fueron lavados con detergentes libres de fosfatos, ácido nítrico al 5% y enjuagados en agua de la llave, destilada y desmineralizada.

Preparación de muestras para la determinación de metales pesados.

Ostión

Los metales en tejido de ostión se analizaron por el método descrito por (IAEA/UNEP/FAO/IOC, 1984), los organismos fueron pesados y secados, 1.0 g de tejido, seco y pulverizado, se colocó en bombas de teflón agregando 5 mL de HNO₃ concentrado por 12 h y colocadas nuevamente cerradas en planchas de

aluminio a 140° por 3 h. Posteriormente fueron aforadas a 25 mL con agua desionizada.

Agua

Los metales en agua se determinaron según la técnica aprobada por (EPA (Environmental Protection Agency), 1984). Las muestras de 1L fijadas con 2.0 mL de H₂SO₄, se descongelaron y se filtraron con papel filtro (0.5 abertura de poro) y se les adicionaron 10 mL ácido concentrado y se aforaron a 25 mL.

Sedimento

Las muestras de sedimento fueron secadas y 0.25 g fue molidos y digeridos con 12 mL de HNO₃ concentrado e incubado a 110°C durante 18 h en bombas de teflón y planchas de aluminio en una cama de arena. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 2500 rpm/30 min. El residuo fue nuevamente centrifugado con 18 mL de agua destilada, colectando los dos sobrenadantes en frascos y aforados a 30 mL (Agemian y Chau, 1976), modificado por (Malo, 1977, Paez-Osuna *et al.*, 1993).

Espectrofotometría de Absorción Atómica

Se utilizaron estándares conocidos para la elaboración de la curva patrón de cada metal analizado en un espectrofotómetro de absorción atómica modelo AA-6800 de la marca Shimadzu, con lámparas de cátodo hueco. Se utilizaron materiales de referencia para muestras de ostión Ref. IAEA-407, 2003 y para muestras de sedimento Ref. GBW-08301,2004.

Factor de Captación (F.C.)

El factor de captación se determinó con los valores de metales presentes en los tejidos de los organismos, mediante la relación descrita por Spacie y Hamelinck (1985).

$$F.C.= \frac{\text{(metal) en el organismo}}{\text{(metal) en el agua}}$$

Donde

F.C. = Factor de concentración

(Metal) en el organismo= concentración de metal presente en el organismo ($\mu\text{g g}^{-1}$)

(Metal) en el agua= Concentración de metal presente en el agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)

6.2.6. Histopatología

Los organismos fueron pesados y fijados en formol al (10%) para la revisión histopatológica por la técnica de inclusión en parafina y tinción por hematoxilina-eosina (H-E). La técnica histológica incluyó: Fijación, lavado, inclusión, corte, desparafinación y tinción. Para la deshidratación, aclarado e infiltrado de los tejidos se utilizó un procesador de tejidos marca Leica modelo TP1020. El colado de bloques fue realizado en un centro de inclusión de Leica modelo EG1140H acoplado a una placa de enfriamiento (Leica modelo EG1140C) para que la parafina solidifique. Los cortes se realizaron con ayuda de un micrótopo modelo HM315 y se realizaron 3 cortes seriados de: 9 μm , para la tinción con Hematoxilina-eosina y de 6 μm para la tinción tricrómica, Azul Alcian, Acido Peryódico-Schiff (PAS) y pruebas inmunocitoquímicas, los cortes teñidos se analizaron con microscopio óptico.

Para evaluar la fase de desintoxicación se utilizó como parámetro de clasificación el número de las células café y hemocitos presentes en los tejidos. Se determinó el número de células café realizando un conteo en 6 campos a 100X, por corte y en sus 3 réplicas. Un total de 18 campos fueron revisados para cada tejido y se calculó el promedio de células café.

La densidad de hemocitos fue clasificada en 4 categorías:

1 = hemocitos en tejido conjuntivo periférico al órgano.

2 = hemocitos con infiltración baja en el órgano.

3 = hemocitos con infiltración moderada en el órgano.

4 = hemocitos con infiltración elevada, no se distinguen límites entre tejidos.

Se graficaron el número de células cafés y la categoría de hemocitos presentes en el tejido conjuntivo adyacente a esófago, intestino, glándula digestiva, branquia y manto desde la intoxicación (72 h) hasta el final del periodo de desintoxicación (230 h).

6.2.7. Tinciones especiales: Histoquímica

Respuestas tisulares en los organismos fueron estudiadas con ayuda de las siguientes técnicas:

Tricrómica de Masson (tejido conectivo).

Previo a la tinción, los tejidos se incubaron en Bouin 24 h, posteriormente se tiñeron con hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 min, se lavaron con agua corriente 10 min más y se enjuagaron con agua destilada. En seguida se colorearon con la solución fucsina ácida-escarlata de Biebrich durante 15 min y se enjuagaron con agua destilada. Se diferenció con la solución fosfotúgstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 min. Se observó que el colágeno no se tornara rojo. Se contrastó con la solución de azul de anilina de 5 a 10 min y se enjuagó con agua destilada. En seguida se realizó la diferenciación utilizando ácido acético al 1%, de 3 a 5 min. Finalmente se deshidrató y aclaró con ayuda de alcohol etílico al 95%, alcohol absoluto y xileno, 2 cambios de dos min cada uno, y se montó en resina sintética.

Los resultados esperados de esta técnica son:

Núcleos: negro

Músculo, citoplasma, queratina: rojo

Colágeno: azul o verde.

Azul Alcian (hidratos de carbono). Los cortes fueron colocados en solución de ácido acético al 3% durante 3 min. Posteriormente se tiñeron con solución de azul Alcian durante 30 min y en seguida fueron lavadas con agua destilada durante 10 min. Se contrastaron con solución filtrada de rojo núcleo resistente durante 5 min y se lavaron con agua corriente por un minuto, se deshidrataron y aclararon con

alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, dos cambios cada uno, dos min, se montaron con resina.

Los resultados esperados de esta técnica son:

Mucopolisacáridos ácido débiles y ácido hialurónico.

Núcleos: de rojo a rosado

Citoplasma: rosa pálido.

Ácido Peryódico-Schiff (PAS) (azúcares reductores). Los tejidos fueron oxidados en solución de ácido peryódico durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente se colocaron en el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 min y se lavaron con agua corriente tibia durante 10 min. El contraste se realizó con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 min. Se lavaron con agua corriente durante 15 min y se deshidrataron de la forma ya antes descrita.

Los resultados esperados de esta técnica son:

Glucógeno, mucina y algunas membranas basales: de rojo a púrpura

Hongos: de rojo a púrpura

Núcleos: azul

Inmunohistoquímica

Muestras fijadas en formalina fueron cortadas en microtomos (4 µm), colocadas en portaobjetos cargados electroestáticamente (SFH1103, Biocare Medical) para evitar el desprendimiento de los cortes. Los cortes fueron desparafinados como en las técnicas anteriores. Se realizó la recuperación antigénica (recuperación del epítipo, recuperador pH 6 Dako: K0679) con ayuda de una olla de presión por 3 min de 22 a 25 psi y a una temperatura de 125 °C. Posteriormente los tejidos se dejaron enfriar por 20 min a temperatura ambiente y se colocaron en un sistema de tinciones especiales automatizado (DAKO Autostainer Plus modelo S3800). Este equipo inicia con el bloqueo de peroxidasa endógena (DAKO S1699; 3% de peróxido de hidrógeno) (Boenisch *et al.*, 2002) aproximadamente por 5 min,

posteriormente se realizó el lavado con solución amortiguadora (Amortiguador de Sodio y potasio pH 7.2) y enseguida se llevó a cabo la incubación del anticuerpo primario por 30 min, se realizaron nuevamente lavados. Posteriormente se dejaron los tejidos 30 min con anticuerpo secundario (link), se realizaron lavados con solución amortiguadora. El sistema de detección fue LSAB+System-HRP (estreptavidina 30 min anticuerpo terciario) y el cromógeno 3,3, diaminobenzidina (10 min), se enjuagaron con agua destilada, se tiñeron con hematoxilina de Hill's, lavado con agua de la llave tibia y enjuague con agua de la llave tibia. Se utilizó posteriormente solución de Scout 1 min, alcohol al 96% (2 baños de 5 min) y alcohol absoluto (2 baños de 4 min) y se montaron en resina sintética.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para la estandarización de la técnica inmunohistoquímica y para observar la activación celular mediada, y macrófagos en el ostión:

Anti-CD45. Anticuerpo Monoclonal en contra del antígeno común de linfocitos B y T con reacción en la membrana (DAKO-LCA No. M0701).

En los tejidos se colocó el anticuerpo primario (dilución 1:100 en PBS) por 30 min , para posteriormente adicionar el cromógeno (10 min) y realizar la tinción de contraste.

En tejidos normales, la tinción es más intensa sobre la superficie de la membrana y es menos marcada en el citoplasma, no reacciona con tejido no hematopoyético, el anticuerpo reacciona y marca neoplasias en células B y T, y es negativo con granulocitos o eritrocitos.

Anti-Fosfatasa alcalina placentaria (PAP). Anticuerpo monoclonal de ratón, Clone 8^a9 (No. M 7191).

Se realizó la dilución del anticuerpo 1:40 en PBS. La presencia de fosfatasa alcalina placentaria, es importante para la demostración y evaluación de diferentes tipos de células germinales, neoplasias y carcinomas en el páncreas, ovario, estómago entre otras

Anti-CD68. Anticuerpo monoclonal CD68 clone KP1 (Nr. M 0814).

Se realizó la dilución del anticuerpo monoclonal del ratón anti-CD68. Tiñe el citoplasma granular o difuso, en el tejido normal, los granulocitos y macrófagos de tejido son marcados por el anticuerpo. CD68 es una proteína glicosilada de membrana lisosomal, CD68 se expresa fuertemente en granulocitos plasmáticos y débilmente sobre la superficie de macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos y células NK. CD68 es expresada en 40% células B y puede observarse en el citoplasma de tejidos del hígado y túbulos del sistema renal. Marca macrófagos y otros miembros de la línea mononuclear fagocítica. Es utilizado para la identificación de neoplasma de mielina y el origen de macrófagos y monocitos.

Anticuerpo policlonal anti-metalotioneínas (AB36 882)

Se adicionaron 150 μ L del anticuerpo (dilución 1:50 en PBS) dejándolo en incubación por de 30 min, se adicionó el anticuerpo secundario y se utilizó el sistema HRP por 30 min, posteriormente se adicionó Romulin 5 min, se realizó el lavado con agua y el contraste con hematoxilina de Harris.

6.2.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de proteínas solubles totales de *C. virginica*.

Extracción de las proteínas del tejido de *Crassostrea virginica*

Para la extracción de proteínas de los ostiones se tomo 1g de tejido fresco, se sumergieron en nitrógeno líquido y se congelaron a -70°C . La glándula digestiva se homogeneizó y diluyó con amortiguador de muestra (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 en presencia de inhibidores de proteasas; Sigma catálogo P-9599 082k4061), ayudados con un Ultra-Turrax modelo T8.. Los ácidos nucleicos se precipitaron con sulfato de protamina 1mg/mL a 4°C en agitación. El extracto se aclaró mediante centrifugaciones a 12,000 g durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -70°C en alícuotas de 1 mL. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Precipitación de las proteínas y preparación de la muestra

Se tomaron 850 μL de proteínas del extracto de *C. virginica* (34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína). Se precipitó con 4 volúmenes de acetona fría y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, el botón resultante se enjuagó con acetona al 70% hasta lograr un botón claro. Se calentó a 100°C con 40-50 μL de amortiguador de muestra (SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v, azul de bromofenol al 0.01% p/v en Tris-HCl 62.4 mM pH 6.8) durante 2 min antes de colocarse en los geles de poliacrilamida al 13%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970)

El gel de separación se preparó al 12.5% (5 mL de acrilamida al 30%, 2.34 de agua desionizada, 2.5 mL de amortiguador Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8.) desgasificado por 15 min y agregándole 100 μL de SDS, 50 μL de APS al 10% y 5 μL de TEMED. La cámara electrofóretica previamente preparada con separadores de 0.75 mm, se llenó con la mezcla anteriormente mencionada. Se añadieron 250 μL de isobutanol y se dejaron polimerizar durante 1 h.

El gel de compactación se preparó al 4% (1.33 mL de acrilamida al 30%, 6.1 mL de agua desionizada, 2.5 mL de amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8) y se desgasificaron por 15 min. Por último se agregaron 100 mL de SDS, 50 μL de APS al 10 % y 10 μL de TEMED y se dejó polimerizar.

En la electroforesis se depositaron 50 μg de proteína en cada carril de los geles preparados. El gel se resolvió en una cámara Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) a 200 V durante 45 min en un amortiguador de corrimiento preparado con Tris 0.25 M, glicina 1.92 M y SDS al 1%. Los geles monodimensionales se fijaron en una solución de ácido acético al 10% v/v etanol al 40% y agua desionizada durante 1 h y se tiñeron con azul de Coomassie durante 1-1 ½ h. Se decoloraron con ácido acético al 10% v/v.

Los geles teñidos fueron digitalizados y analizados por densitometría con el software Labworks 4.0 de upv (Imaging Systems. Inc EUA). Las masas relativas

Mr fueron determinadas con un estándar (SDS-PAGE), de baja masa molecular (BioRad 161-0304 y 161-0363).

6.2.9. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza ANOVA para evaluar los efectos y se calculó el coeficiente de correlación de parámetros fisicoquímicos, variables biométricas con los contenidos de metales mediante el programa Statistica de Statsoft Ser. (1997).

7. Resultados

7.1. Parámetros fisicoquímicos y morfométricos

Los parámetros registrados en la zona de colecta se presentan en la tabla 2. Los parámetros fisicoquímicos registrados durante la colecta y en el laboratorio se mantuvieron dentro de los recomendados como óptimos para el desarrollo de *C. virginica*. En promedio se registró una temperatura de 22 ± 0.5 ° C; salinidad de 22 ± 1.5 ‰ y pH de 7.9 ± 0.5 . Estos intervalos fueron conservados durante el periodo de depuración de los organismos y en el bioensayo de intoxicación.

El análisis de los datos morfométricos (tabla 3) indicó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las lagunas exceptuando los organismos colectados en la época de nortes ($p < 0.05$). La longitud fue el único parámetro que no presentó diferencias ($p > 0.05$) entre las épocas de colecta, por el contrario existió una correlación positiva ($r = 0.4$) entre el peso húmedo y el peso seco a lo largo del ciclo anual.

El índice de condición los organismos colectados fue alto (> 120) en relación al considerado aceptable sin embargo, fue evidente una tendencia a disminuir de la época de secas a nortes. Estacionalmente el índice fue de 415 en secas, 234 en lluvias y 75 en la época de nortes (ver tabla 3). Los organismos, tuvieron tallas alrededor de 7 cm, peso seco promedio de 1.0 g y un alto estado fisiológico de acuerdo al índice de condición que establece la relación entre la masa corporal y el liquido intervalvas (242).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos registrados en la laguna de Mandinga, Ver., y durante las pruebas de laboratorio (desintoxicación y bioensayo de toxicidad a cadmio).

	Época	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	pH
Laguna Grande	Nortes	29.00	16.00	7.90
	Secas	31.00	33.00	8.34
	Lluvias	7.50	9.80	7.50
	Promedio ± Desv. Stad.	22 ± 4.6	20 ± 2.5	7.0 ± 0.1
Laguna Chica	Nortes	28.00	29.00	6.49
	Secas	31.00	30.00	7.32
	Lluvias	7.60	9.60	7.00
	Promedio ± Desv. Stad.	22 ± 10.4	23 ± 9.3	7.0 ± 0.3
Boca de laguna	Nortes	29.00	28.00	7.20
	Secas	31.00	28.00	7.28
	Lluvias	7.70	9.70	7.00
	Promedio ± Desv. Stad.	22 ± 8.5	22 ± 8.6	7.0 ± 0.1
Campo	Promedio ± Desv. Stad.	22 ± 10.5	22 ± 6.8	7.0 ± 0.1
Laboratorio				
Desintoxicación	504 h: Promedio ± Desv. Stad.	25 ± 0.3	22 ± 2.5	7.9 ± 0.2
Bioensayo	Promedio ± Desv. Stad.	25 ± 0.5	21 ± 1.5	7.9 ± 0.6

Tabla 3. Datos morfométricos e índice de condición de los ostiones colectados en Mandinga, Ver. (Promedio \pm desviación estándar).

Localización	Longitud (cm)	Alto (cm)	Ancho (cm)	Peso		Vol. Valvas (ml)	Índice de condición
				Húmedo (g)	Peso Seco (g)		
Secas							
Grande	6.2	3.0	3.1	16.9	1.6	3.5	461
Chica	8.1	2.2	4.8	8.0	1.0	2.2	448
Boca	9.1	2.8	4.3	11.7	1.5	4.3	337
Lluvias							
Grande	9.6	2.4	4.3	16.9	1.1	4.0	276
Chica	6.9	2.8	4.1	15.8	1.0	4.5	216
Boca	7.7	2.0	4.3	19.0	0.7	3.3	212
Nortes							
Grande	6.3	2.8	3.8	4.1	0.5	8.5	54
Chica	6.6	2.2	4.0	4.4	0.7	6.8	100
Boca	7.0	2.6	3.9	4.5	0.6	8.6	70
Promedio \pm Desv. Stad.	7.4 \pm 1.8	2.5 \pm 0.7	4.2 \pm 1.0	10.6 \pm 4.8	1.0 \pm 0.6	5.1	242

*Índice de Condición

120 = Alto

90 = Normal

70-80 = Bajo

Los ostiones que se mantuvieron en el laboratorio por 502 h en agua libre de metal, registraron menor peso seco con respecto al tiempo de los intervalos de muestreo. En la tabla 4, se muestra el peso seco promedio de 6 organismos por tiempo experimental y se observa que este peso fue de 0.31 g en promedio con un índice de condición bajo, de 55 y 85 en época de secas y lluvias respectivamente.

Tabla 4. Peso seco de *C. virginica* sujetos a desintoxicación por 502 h

Tiempo (h)	Día	Peso seco (g)	
		Nortes	Secas
0	0	0.75	0.43
72	3	0.35	0.43
144	6	0.44	0.46
216	9	0.31	0.69
288	12	0.24	0.53
360	15	0.32	0.39
432	18	0.20	0.18
504	21	0.16	ND
Promedio \pm Desv. Stad.		0.36 \pm 0.1	0.46 \pm 0.1
Índice de Condición		55	85
N =		48	48

En la tabla 5 se observa el peso seco de los organismos utilizados para el bioensayo de intoxicación-desintoxicación, estos organismos mantuvieron un peso seco promedio de 0.5 g y el índice de estado fue de 293 (peso alto), los parámetros morfométricos no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) por lo que se consideró como un lote homogéneo.

Tabla 5. Datos morfométricos de *C. virginica* intoxicados (72 horas) con cadmio y sujetos a desintoxicación (216 h).

Tiempo (h)	Día	Peso seco (g)
0	0	0.32
24	1	0.43
48	2	0.57
72	3	0.49
96	4	0.76
120	0	0.51
144	1	0.48
168	2	0.53
192	3	0.52
216	4	0.44
240	5	0.45
264	6	0.59
288	7	0.55
312	8	0.44
Promedio ± Desv. Stad.		0.50 ± 0.19
Índice de Condición		293
N =		100

7.2. Determinación de metales Cd, Cr y Pb

Los niveles de metales registrados en ostión de las tres lagunas no mostraron diferencias significativas entre las zonas de colecta. Sin embargo existen diferencias notables entre los niveles de metales registrados en sedimento, agua y ostión tabla 6.

Tabla 6. Metales en la laguna de Mandinga, Ver.

Metal	Agua (mg L ⁻¹)			Sedimento (µg g ⁻¹)			Ostión (µg g ⁻¹)		
	Cadmio	Plomo	Cromo	Cadmio	Plomo	Cromo	Cadmio	Plomo	Cromo
Nortes,									
2003	0.02	0.23	0.32	L.D.	26.59	29.81	0.95	4.11	18.72
Secas, 2003	0.07	0.25	0.19	0.97	22.27	44.28	6.23	12.01	13.41
lluvias, 2003	1.86	L.D.	0.93	1.24	29.18	18.71	0.35	4.12	L.D.
Nortes,									
2004	L.D.	2.59	L.D.	L.D.	4.90	3.09	2.89	4.91	L.D.
Secas, 2004	L.D.	3.14	L.D.	L.D.	3.00	1.34	0.71	4.04	L.D.
Promedio	0.39	1.24	0.28	0.44	17.19	19.44	2.23	5.84	6.43
Desv. Stad.	± 0.73	± 1.33	± 0.34	± 0.54	± 11.05	± 16,24	± 2.18	± 3.10	± 8.04
LMP	0.2	0.4	1.00	1.20**	46.70	81.00	0.50	1.00	13.00*

L.D. (Limite de detección): cadmio 0.236; plomo 0.119; y cromo 0.034 mg L⁻¹.

L.M.P utilizados (Límites máximos permisibles):

En agua NOM-001-ECOL-1996 (D.O.F., 1997)

En Ostión NOM-031-SSA1-1993(D.O.F., 1995) y *Niveles críticos para consumo de moluscos bivalvos: cadmio (3.7) y plomo (1.7) (FDA, 1993).

Sedimento: ** Valores que producen efectos biológicos (ERL)(Long *et al.*, 1995).

7.2.1. Metales en agua

La NOM-ECOL-001-96, establece los límites permisibles de diversos contaminantes presentes en las aguas residuales, que se vierten a la zona costera. De acuerdo a esta norma los límites para cadmio son 0.2 mg L^{-1} por lo que la concentración de cadmio en el agua de Mandinga superó los límites permisibles LMP en la época de lluvias (1.86 mg L^{-1}). El plomo se observó con mayor frecuencia en las muestras analizadas, la concentración promedio fue de 1.24 mg L^{-1} superando el LMP (0.4 mg L^{-1}) en la época de nortes y secas. Los niveles más altos de cromo (0.93 mg L^{-1}) se registraron en la época de lluvias, con un valor cercano al LMP (1.0 mg L^{-1}). En términos generales se puede señalar que las concentraciones de cadmio y plomo permanecieron por arriba de los límites que señala la legislación mexicana (figura 3).

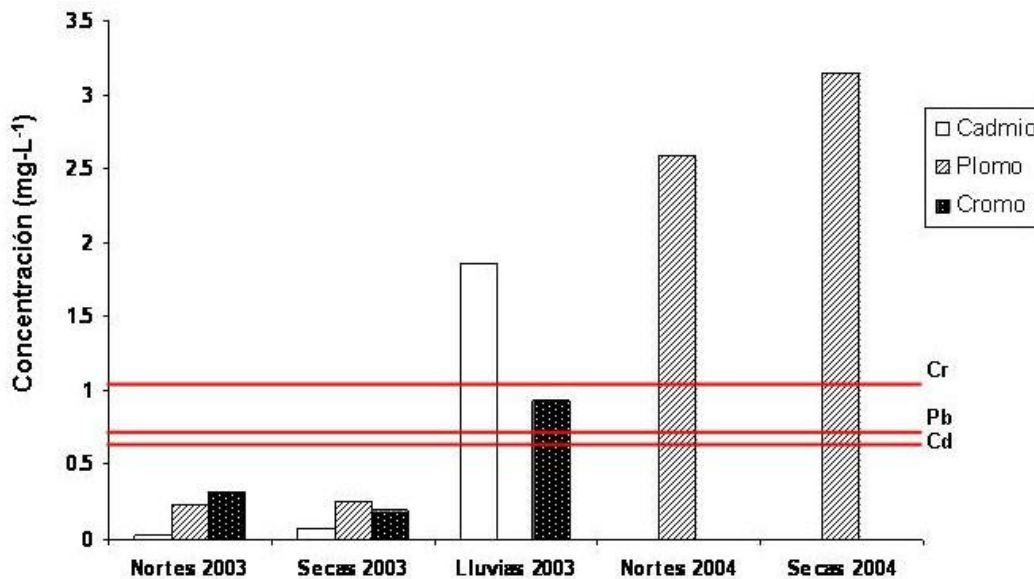


Figura 3. Concentración de Metales determinados por EAA en el agua de la laguna de Mandinga, Ver.

7.2.2. Metales en sedimento

Los niveles de cadmio en el sedimento fueron de 0.97 y 1.24 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la época de secas y lluvias esta última concentración puede producir efectos biológicos (Long et al., 1995). Las concentraciones de plomo y cromo fueron más frecuentes en los muestreos y a pesar de registrarse concentraciones esporádicamente altas, de 21 y 46 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, en lo general se encontraron dentro del parámetro que “no produce efecto biológico” (Long et al., 1995). Las concentraciones de metales en el sedimento se observan en la figura 4.

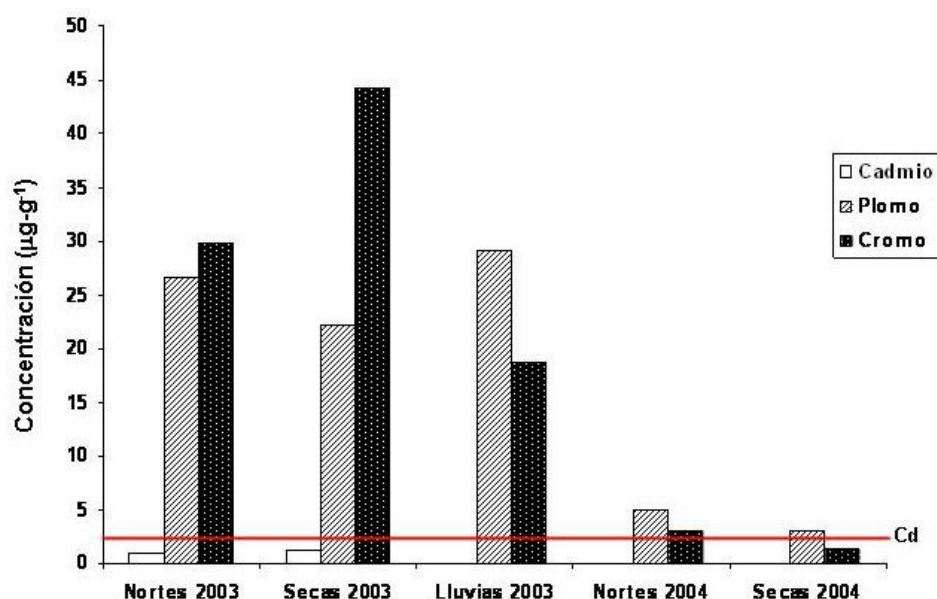


Figura 4. Concentración de Metales determinados por EAA en el sedimento de la laguna de Mandinga, Ver.

7.2.3. Metales en ostión

Las concentraciones de metales en el ostión fueron; 2.23 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cadmio, y de 5.84 $\mu\text{g g}^{-1}$ de plomo, niveles que superan los LMP para su consumo. El cromo en época de secas y nortes se registró en concentraciones de 13.41 y 18 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, superando estas concentraciones el LMP. Las concentraciones de metales más altas fueron detectadas en los ostiones colectados en la época de secas, cuando se registran altas temperaturas y menores niveles de agua. La

figura 5 muestra las concentraciones y la permanencia del plomo y el cadmio registrado en ostión a lo largo del ciclo anual.

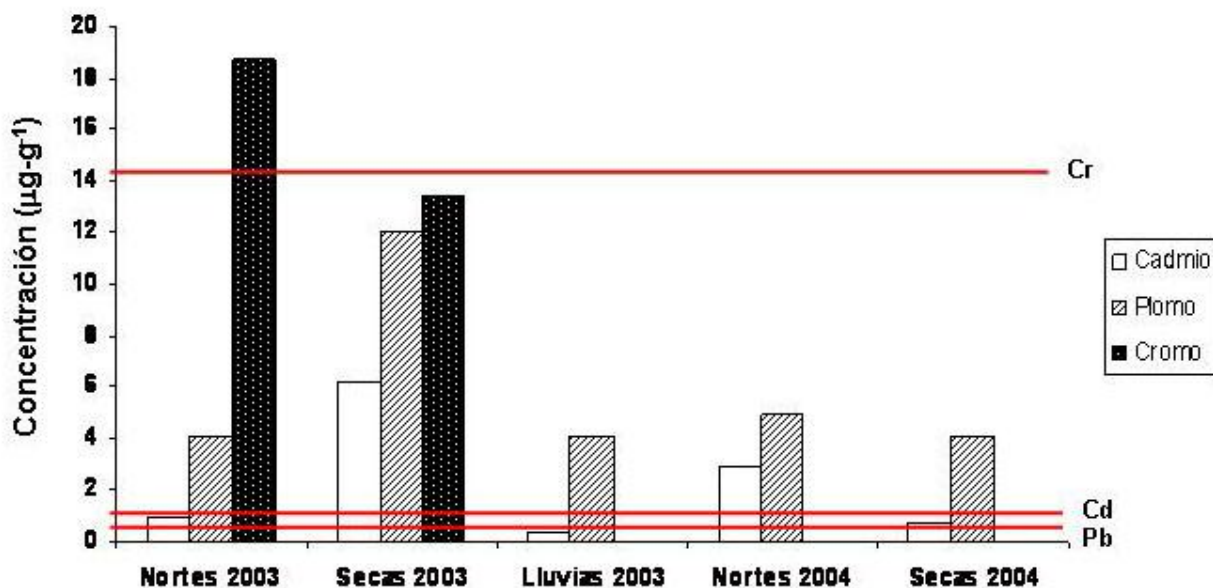


Figura 5. Concentración de Metales determinados por EAA en el ostión de la laguna de Mandinga, Ver.

En la figura 6, se puede observar que las concentraciones de metal fueron: sedimento > ostión > agua con excepción del cadmio. La presencia de cadmio en niveles de 0.34 a 2.31 $\mu\text{g g}^{-1}$ fue de 41% en los ostiones; en relación al plomo las concentraciones fueron entre 0.43 a 17.96 $\mu\text{g g}^{-1}$ con una incidencia en 80%; y el cromo se presentó en niveles de 1.29 a 4.23 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el 7% de las muestras analizadas.



Figura 6. Niveles de metales en sedimento, agua y ostión.

7.2.4. Determinación de metales durante la depuración en el laboratorio.

Las concentraciones de cadmio, cromo y plomo no mostraron tendencia clara a disminuir durante los 21 días de depuración de acuerdo con los datos de la tabla 7.

Tabla 7. Niveles de metal en *C. virginica* sujetos a depuración

Tiempo (h)	Días	Cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Plomo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cromo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
0	0	6 ± 3	17 ± 14	38 ± 8
72	3	5 ± 2	5 ± 23	9 ± 10
144	6	6 ± 1	8 ± 12	ND
216	9	6 ± 3	9 ± 17	1 ± 4
288	12	8 ± 6	7 ± 32	9 ± 5
360	15	11 ± 5	6 ± 17	40 ± 7
432	18	11 ± 6	6 ± 32	30 ± 1
504	21	5 ± 6	1 ± 33	23 ± 1

ND= no determinado.

Tiempo= promedio de 3 ostiones analizados.

De los 3 metales, solo el plomo se registró en menores concentraciones al término del periodo de desintoxicación. La figura 7, muestra la tendencia en donde se observó un decremento después de los 360 h no significativo en cuanto a las concentraciones de metal, con un comportamiento de eliminación bimodal del cadmio y cromo.

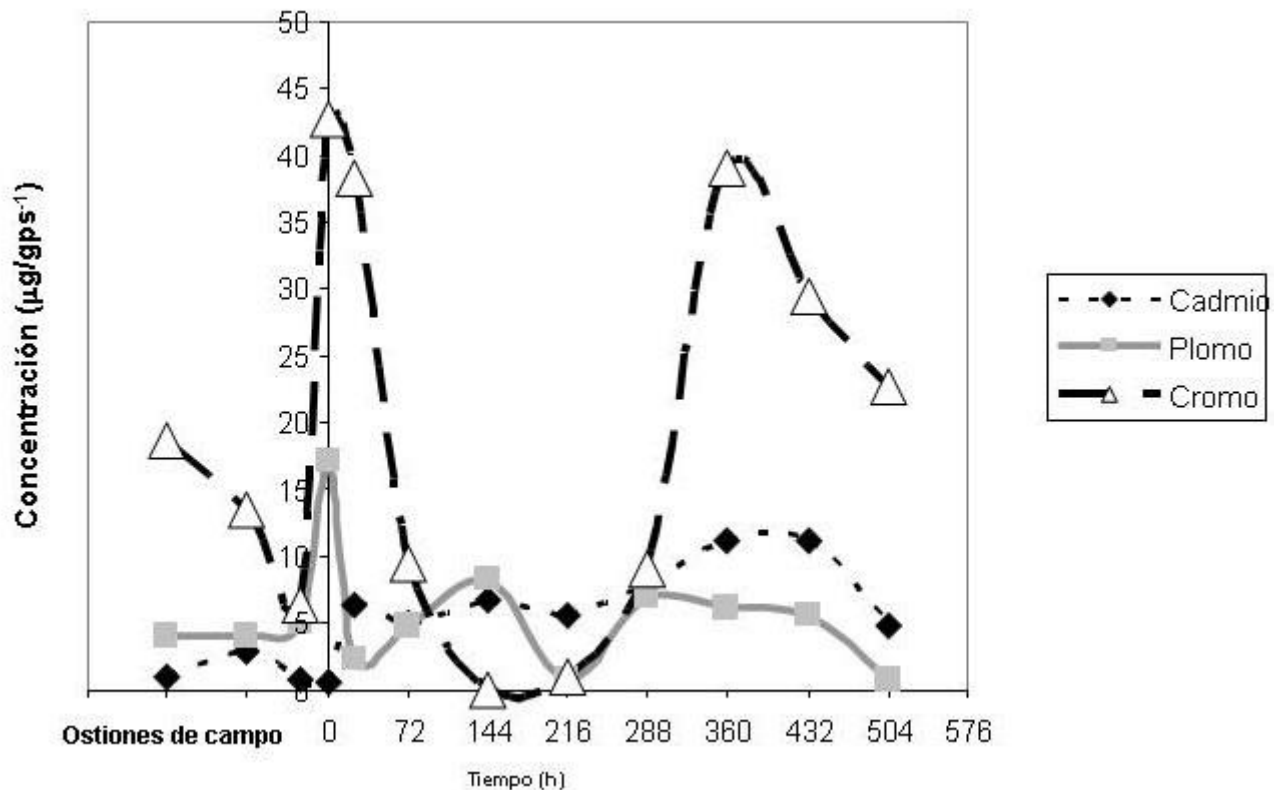


Figura 7. Niveles de metales en organismos sujetos a depuración.

Bioensayo: Concentraciones de cadmio

Los organismos intoxicados alcanzaron niveles hasta de $26 \mu\text{g g}^{-1}$ y durante el periodo de depuración eliminaron hasta el 90 % del cadmio captado (tabla 8). Los organismos utilizados como controles mantuvieron concentraciones de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ durante el tiempo de depuración.

Tabla 8. Niveles de cadmio en organismos intoxicados y desintoxicados en el laboratorio

Tiempo (h)	Día	Ostiones en agua libre de cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ostiones expuestos a cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FC (factor de captación)
INTOXICACIÓN				
0	0	5	6	30
24	1	4	6	27
48	2	8	18	90
72	3	4	14	100
96	4	6	26	140
promedio		5.6 ± 1.67	14 ± 8	
DESINTOXICACIÓN				
120	0	2	16	140
144	1	ND	16	200
168	2	2	10	160
192	3	2	8	160
216	4	ND	10	50
240	5	ND	10	50
264	6	2	12	80
288	7	ND	2	92
312	8	ND	2	11
promedio		2.5 ± 1.67	10.42 ± 5.07	

7.2.5. Factor de captación (FC)

Este factor relaciona las concentraciones de metal en el agua y tejidos del organismo, y fue mayor de 100 en ostiones de la laguna de Mandinga, lo que implica importantes índices de enriquecimiento. De manera análoga se pudo observar como este factor se incrementó a 140 en el bioensayo de intoxicación y decreció a 11 durante el periodo de desintoxicación.

7.2.6. Correlación de metales con variables biométricas

La matriz que correlaciona las variables biométricas (longitud, peso e índice de condición) contra los parámetros ambientales y las concentraciones de contaminantes se presenta en la tabla 9. Los datos revelaron una alta correlación entre los niveles de cadmio y cromo en el sedimento con los niveles detectados en el ostión (0.64 y 0.80 α 0.65), y una moderada correlación negativa entre el cadmio y plomo del agua y estos mismos metales en ostión (- 0.45 y - 0.34 α 0.65). Estos resultados sugieren que los niveles registrados en el sedimento representan una fuente de contaminación potencial para estos organismos bentónicos.

La salinidad se correlacionó con las concentraciones de plomo y cromo en ostión ($r = 0.60$). La longitud y el índice de condición presentaron una correlación positiva con el cadmio ($r = 0.62$; 0.56 respectivamente) y el índice de condición también presentó buena correlación con las concentraciones de plomo en ostión ($r = 0.64$).

La correlación de las variables biométricas con los contenidos de metal indicó que los tres metales presentaron relación significativa con la salinidad y la temperatura (tabla 9). Tanto las concentraciones de cadmio como las de plomo correlacionaron significativamente con la longitud, el índice de condición, y la concentración de metal en agua; mientras que solamente el cadmio la presentó con su concentración en el sedimento. Las concentraciones de cromo en ostión presentaron correlación significativa con el peso, pH y oxígeno disuelto (tabla 9).

Tabla 9. Correlación de la concentraciones de metales en ostión con las variables biométricas, parámetros fisicoquímicos, metales en agua y sedimento

Variable	Cadmio	Plomo	Cromo
Longitud	*0.62	*0.39	- 0.20
Peso	- 0.04	0.19	*- 0.32
Índice Condición	*0.56	*0.64	- 0.01
Salinidad	*0.34	*0.60	*0.60
pH	- 0.23	- 0.11	*- 0.68
Oxígeno	- 0.21	- 0.21	*0.79
Temperatura	*0.84	*0.71	*0.58
Agua	*- 0.45	*- 0.34	- 0.08
Sedimento	*0.64	0.18	*0.80

* Significativo $p > 0.05$

7.3. Histopatología

7.3.1. Organismos de campo y desintoxicados

En los organismos colectados en la laguna de Mandinga se observó la presencia de alimento (figura 8). La caracterización histológica del ostión evidenció la presencia de grandes epitelios en la luz de los túbulos de la glándula digestiva (figura 9) y en el intestino (figura 10) característicos en estos organismos.

Las muestras ambientales fueron analizadas y comparadas con ostiones depurados e intoxicados en el laboratorio. Los ostiones de la Laguna de Mandinga, presentaron alteraciones en los epitelios del manto, branquia, tejido conectivo. En la glándula digestiva se observaron alteraciones en los túbulos y

epitelios del intestino. Las alteraciones observadas incluyen edema, hiperplasia de células epiteliales en los túbulos, presencia de vesículas cafés, incremento en hemocitos y necrosis.

En el tejido conjuntivo periférico la activación de las células cafés fue más intensa. En el tejido conjuntivo se observaron con mayor frecuencia las vesículas cafés en diferente tamaño (figura 11). Un acercamiento en la hemolinfa mostró la presencia de gránulos característicos de este mecanismo de defensa, reportado como células cafés maduras, ya que se ha establecido su aumento en tamaño por su capacidad de interacción con el metal (figura 12).

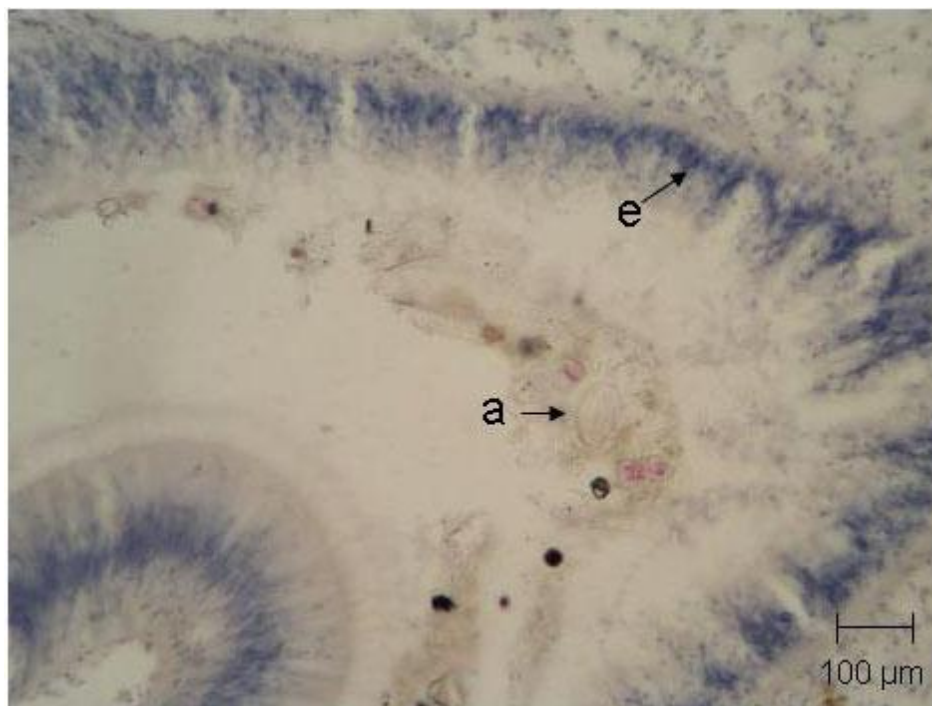


Figura 8. Tracto digestivo mostrando restos de alimento (a) y degeneración de los epitelios (e) que lo recubren en ostión con presencia de cadmio($1.2 \mu\text{g g}^{-1}$) y cromo ($61 \mu\text{g g}^{-1}$). Tinción H-E.

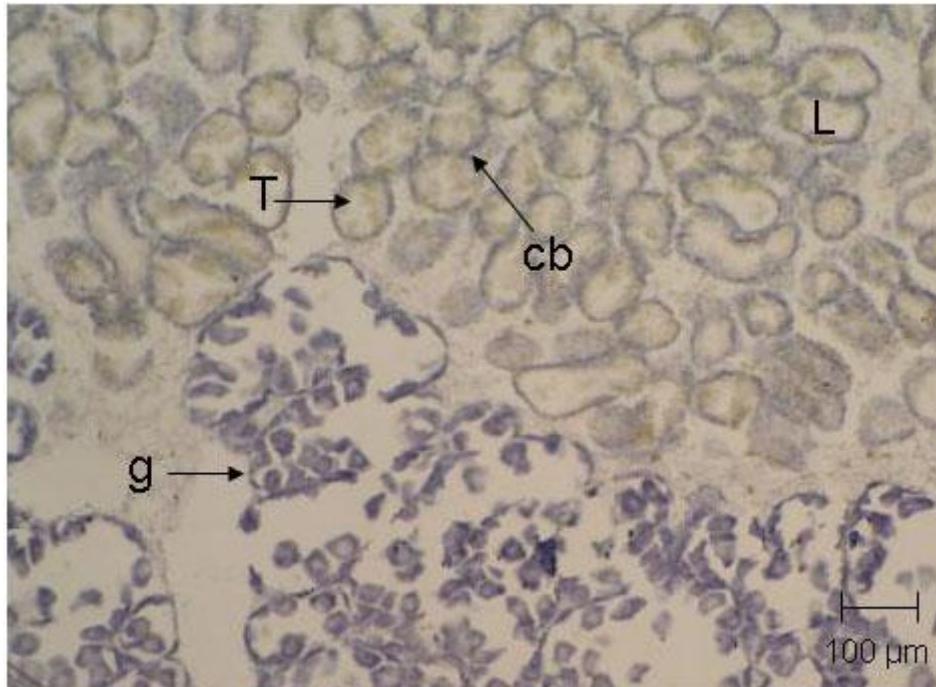


Figura 9. Túbulos (T) de la glándula digestiva en ostión, la luz (L) de los túbulos presentan diferentes radios y en la base del epitelio que los recubre se observan células basofílicas así como restos de la gónada (g). Tinción H-E.

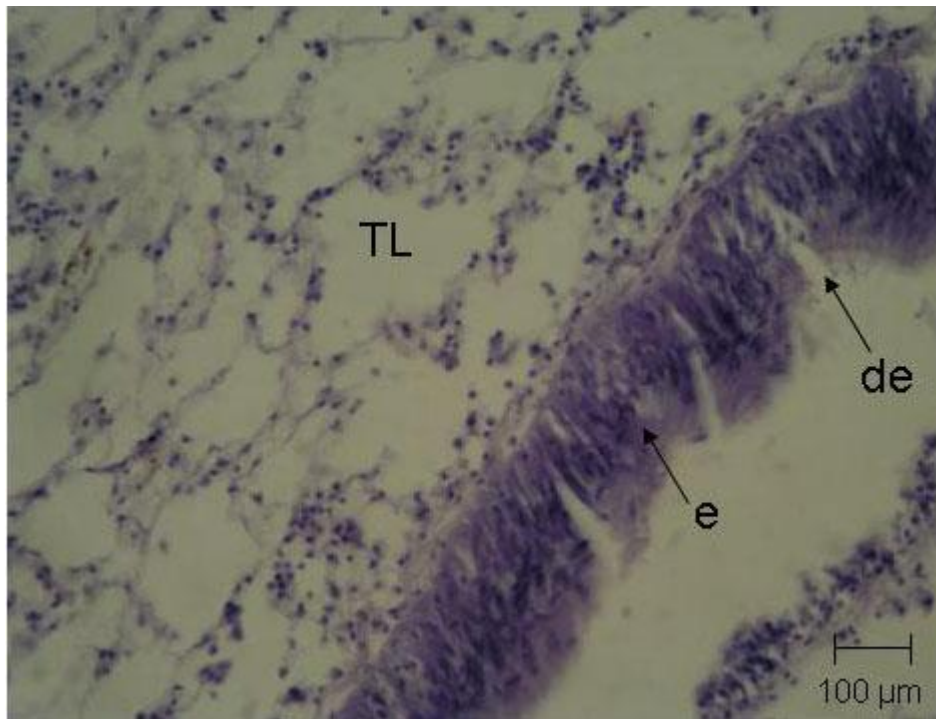


Figura 10. Organismo analizado con niveles de $50 \mu\text{g g}^{-1}$ de cromo se observa disrupción (de) del epitelio (e) que recubre el intestino y edema en el tejido conectivo también llamado tejido de Leydig en *C. virginica* (TL), sugiriendo lesiones subletales. Tinción H-E.

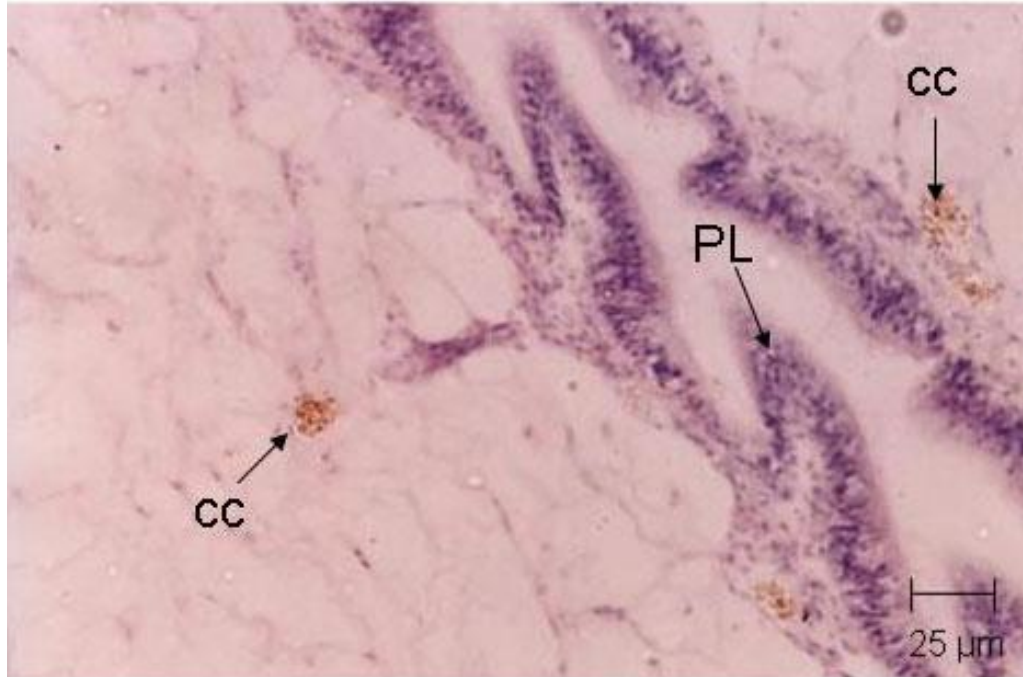


Figura 11. Corte longitudinal de los palpos labiales (PL) se muestra las crestas del epitelio y la presencia de vesículas cafés (cc) con la granulación característica del estado fagocítico de este mecanismo de desintoxicación (ostión con $6 \mu\text{g gps}^{-1}$ de Cd). Tinción H-E.

También se observó en los ostiones de Mandinga el incremento de la respuesta inmunocítica la cual en apariencia tiene diferente intensidad en los organismos analizados (figura 12). Paralelamente se observó la presencia de vesículas cafés en tejido conectivo que rodea el tracto digestivo (figura 13).

La intensidad de la respuesta hemocítica fue de moderada a alta en la periferia de los túbulos hacia el tejido conectivo en organismos desintoxicados (figura 14). También fue posible observar diferentes diámetros en los túbulos de la glándula digestiva por pérdida o presencia del epitelio que los recubre (figura 15),

Las branquias en estos organismos presentaron aspectos inflamatorios moderados, pudo apreciarse tinción basófila y daño en los cilios de las laminillas branquiales (figura 16). Se observaron efectos inflamatorios en los túbulos de la glándula digestiva e intestino I (figura 17 y 18).

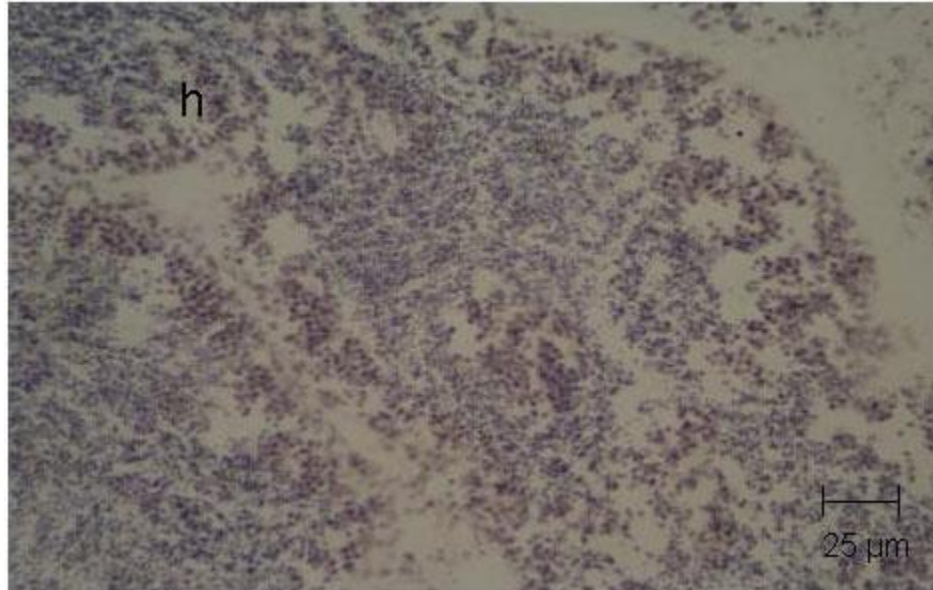


Figura 12. Infiltración de hemocitos (h) en tejido conectivo e ostiones con niveles de $29 \mu\text{g gps}^{-1}$ de cromo. Tinción H-E.

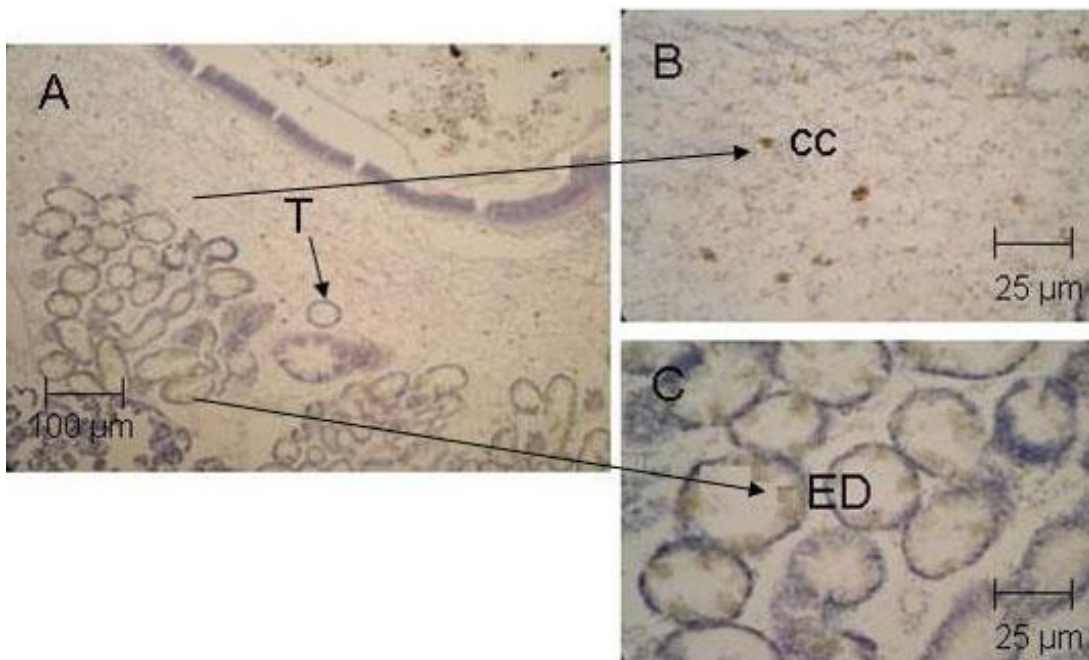


Figura 13. En A se observan los túbulos de la glándula digestiva (T), en B un acercamiento de las células cafés (cc) y en C, el epitelio de recubrimiento interno de los túbulos con edema (ED). Tinción H-E.

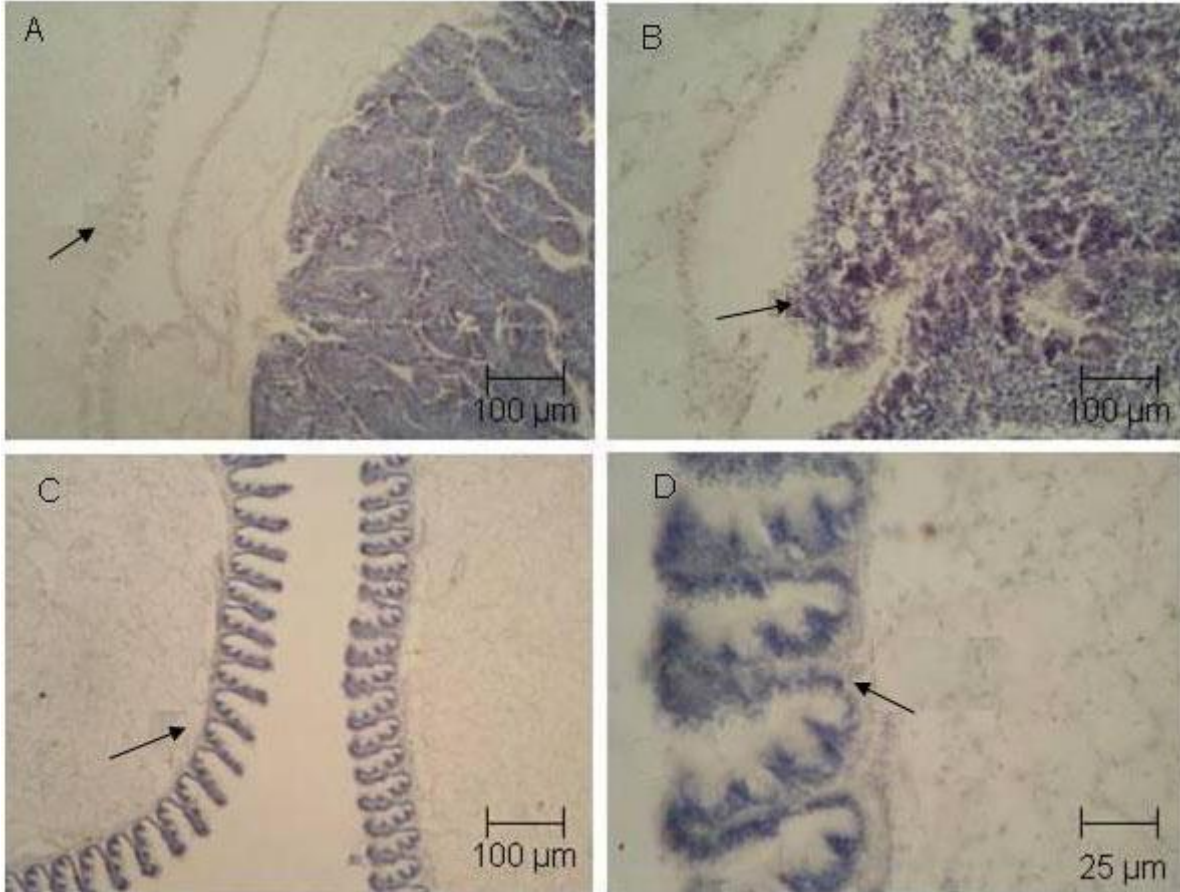


Figura 14. Aspecto de lesión subletal en organismos intoxicados con Cromo. Se aprecia en A el aspecto hialino, en B incremento de hemocitos como mecanismo de defensa, en C edema y en D epitelio del esófago dañado. Tinción H-E.

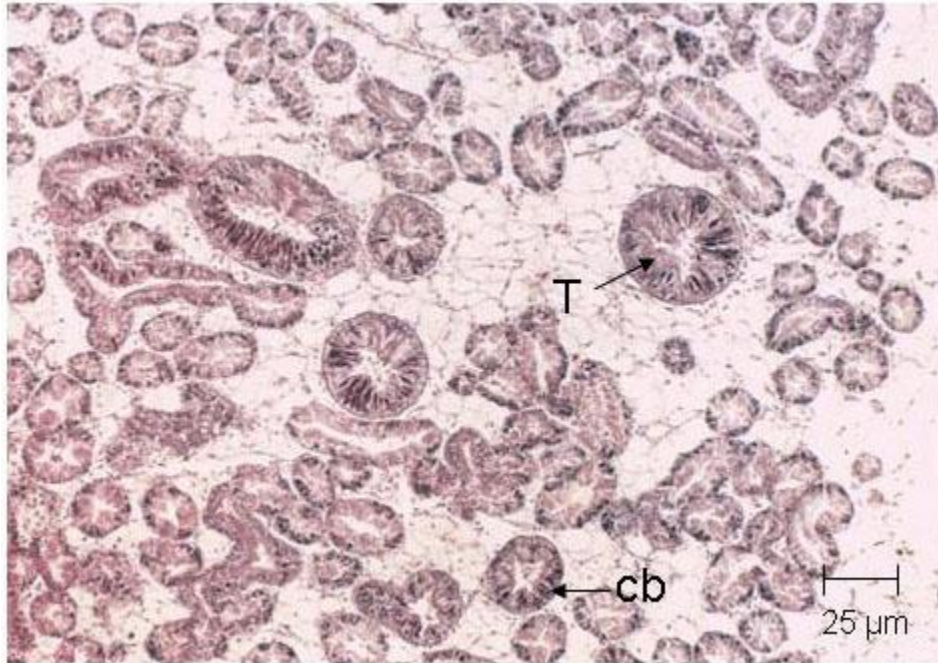


Figura 15. Túbulos (T) de la glándula digestiva en ostión. Se observan los epitelios internos en los túbulos y células basofílicas (cb). Tinción H-E.

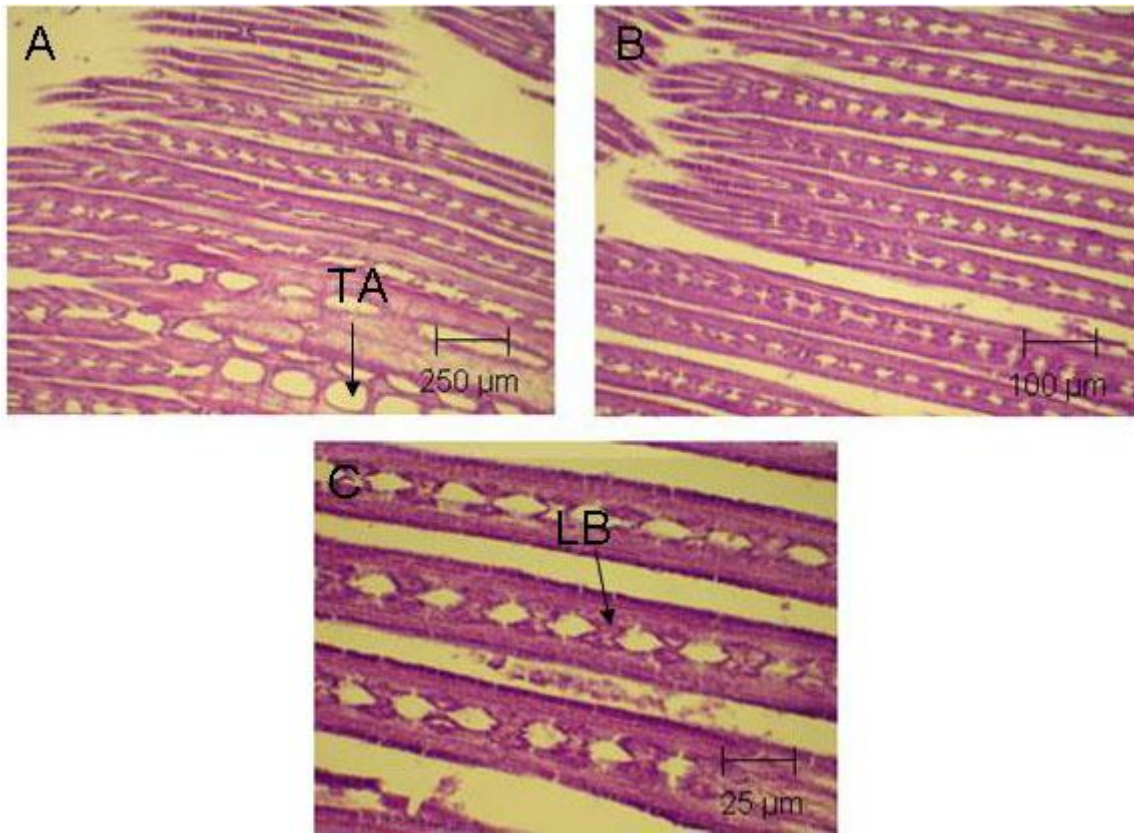


Figura 16. Aspecto de las laminillas branquiales (LB) en aumentos progresivos (de A-C), donde se aprecian los efectos inflamatorios en los tubos de agua (TA) persistentes durante la depuración. Tinción H-E T4.

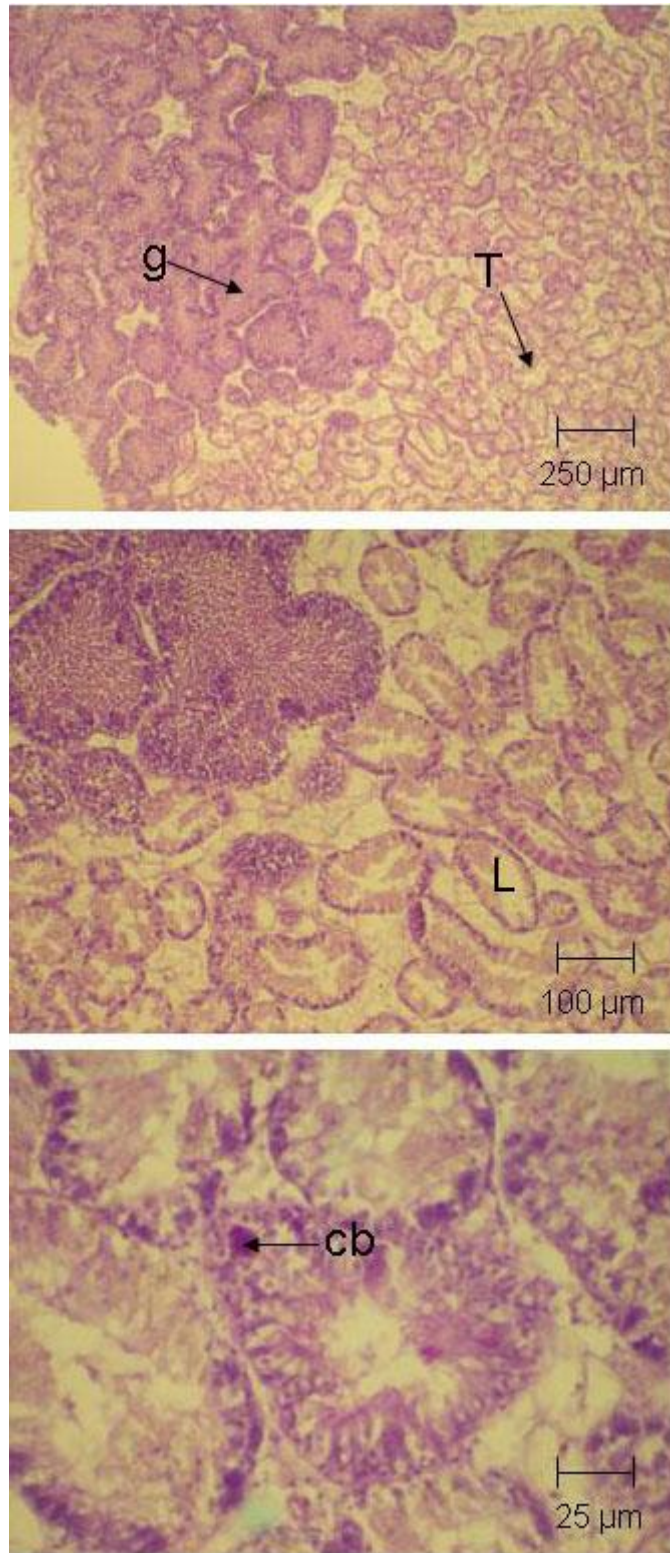


Figura 17. Aspecto de los túbulos durante la desintoxicación, en A se observan los túbulos (T) y la gónada de *C. virginica*, en B la luz de los túbulos con apariencia estrecha y en C observe las células basofílicas (cb) en la base de los túbulos. Tinción H-E T8.

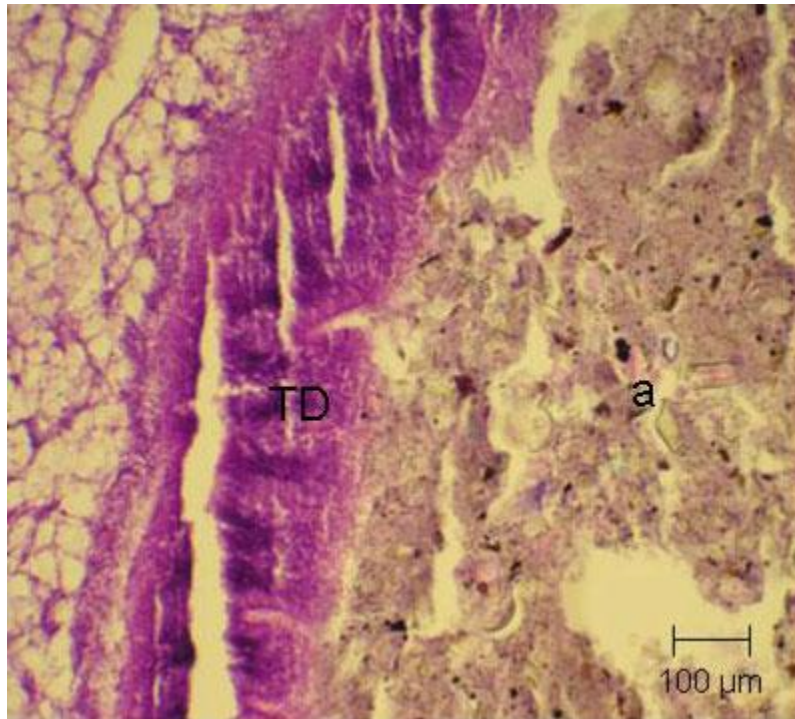


Figura 18. Epitelio del tracto digestivo (TD) durante la desintoxicación (216 h) se observan restos de alimento (a). Tinción H-E.

7.3.2. Bioensayo

El análisis histopatológico de ejemplares de *Crassostrea virginica* se comparó con organismos depurados que no presentaron concentraciones de los metales analizados. En los ostiones expuestos a cadmio se observaron, respuestas inflamatorias, degeneración de cilios en el intestino, daño en los epitelios de los túbulos de la glándula digestiva, hialinización y basofilia. En el esófago de los ostiones se observó tinción basófila en el epitelio de los palpos e incluso algunas secreciones posiblemente mucosas (figura 19A). En esta misma estructura, el tejido conjuntivo presentó células cafés durante la fase de depuración (figura 19a). En el intestino de los organismos intoxicados se observó la degeneración de los cilios en la parte luminal del epitelio que lo recubre (figura 19B). Los organismos de la fase de depuración presentaron edemas, ruptura del epitelio y presencia de células cafés en el tejido conjuntivo que rodea el intestino (figura 19b).

Los epitelios que revisten la luz de los túbulos de la glándula digestiva prácticamente desaparecieron y sufrieron deformación (figura 19C). Sin embargo, al final del periodo de depuración se observó la recuperación de la apariencia epitelial (figura 19c).

Las laminillas branquiales presentaron en la porción apical tinción basófila (figura 20A) muy probablemente por la presencia de hemocitos como una reacción de defensa ante la presencia de Cd (figura 20a). En el manto la respuesta fue similar, el lóbulo sensorial externo presentó tinción basófila, en tanto que en la fase de depuración el manto mostró aspecto hialino (figura 20B, b).

Algunas respuestas celulares inducidas se manifestaron a través de la presencia de células cafés y hemocitos (figura 21A y 21B respectivamente). En el tejido conjuntivo de los organismos expuestos a Cd, se observaron las células cafés, en tonalidades de marrón a café claro con la tinción H-E (figura 21 A, a). Células cafés con diferente tamaño (1 a 5 μm) se observaron también en los canales de hemolinfa. Las células cafés de mayor tamaño presentaron forma de vesícula y tuvieron apariencia granular en el interior. Éstas se cuantificaron en el esófago, intestino, túbulos de la glándula digestiva y el manto (figura 23).

En el tejido conjuntivo, entre el intestino y los túbulos de la glándula digestiva, se observaron hasta 35% más células cafés que en el esófago y el manto. La mayor incidencia de células cafés se registró a las 72 h de depuración en el intestino, en tanto que en los túbulos de la glándula digestiva se presentó a las 144 h.

Posteriormente a estos plazos prevaleció una tendencia hacia la disminución del número de células cafés. En las últimas horas de la fase de desintoxicación el número de células cafés fue similar en los organismos testigo, sin embargo la apariencia granulada de las vesículas cafés en los organismos intoxicados, sugiere la captación de material, es decir, de Cd.

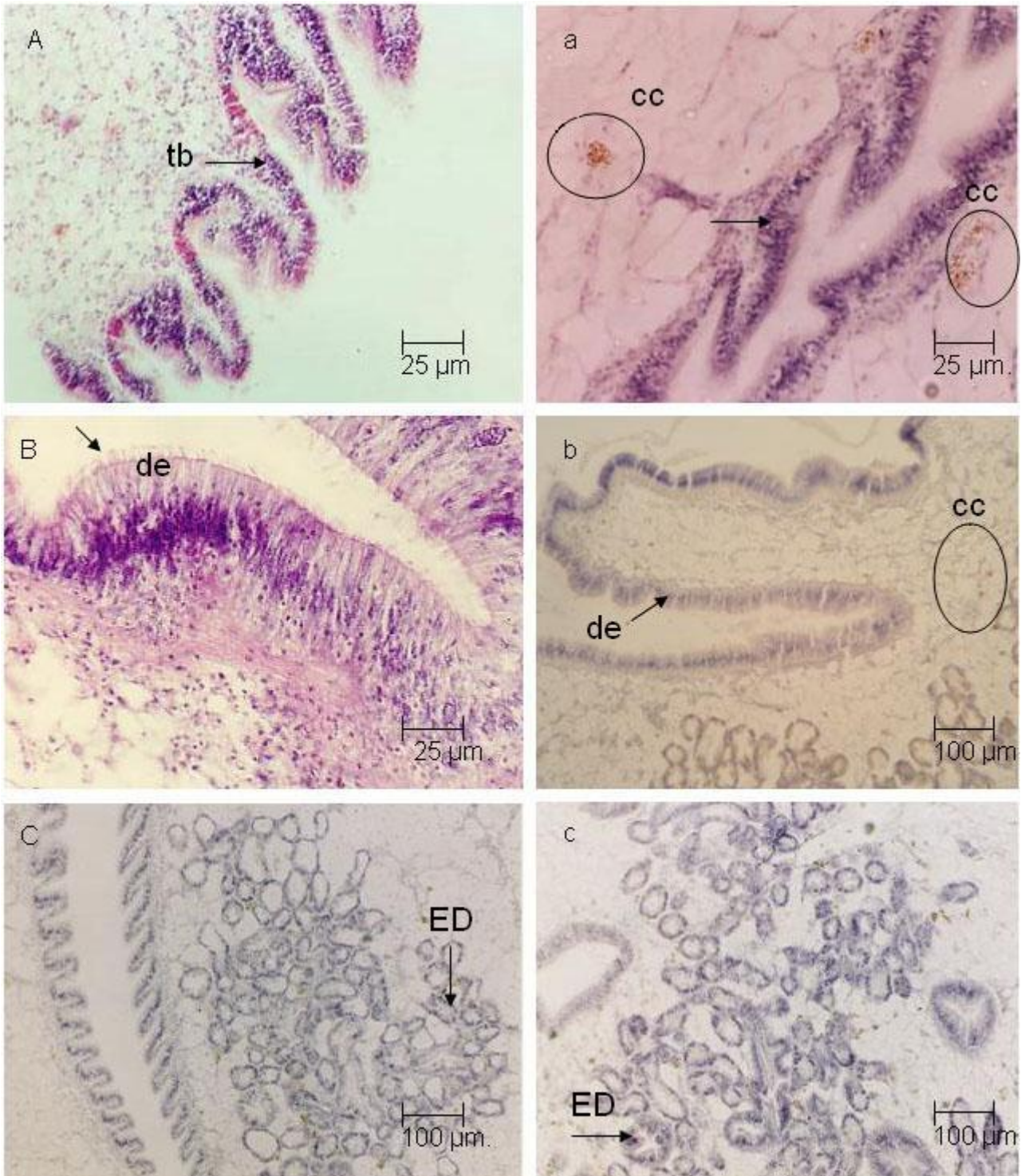


Figura 19. Tejidos del ostión *Crassostrea virginica* durante la exposición a cadmio (izquierda) y durante la fase de desintoxicación (derecha). En el esófago (A, a) se observa tinción basófila (tb) en los epitelios; en el intestino (B, b) se observa un aspecto degenerativo (de) del epitelio que lo recubre; en la glándula digestiva (C, c) se advierte edema (ED); dentro del tejido conjuntivo se observan algunas células cafés (cc). Tinción H-E.

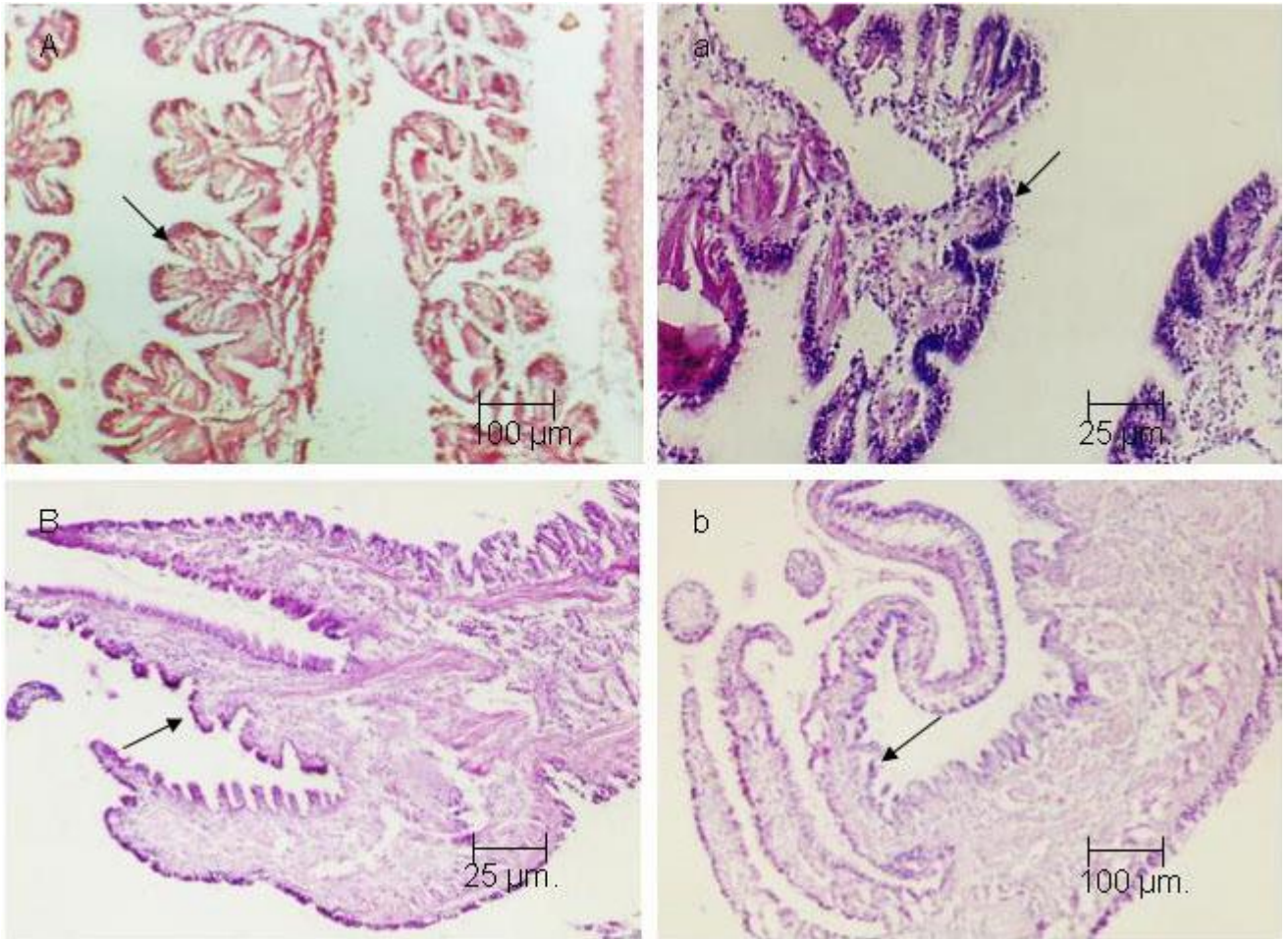


Figura 20. Tejido branquial y del manto del ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) la branquia muestra basofilia en el epitelio de la región apical; B, b) aspecto de los lóbulos sensitivos del manto en b) el aspecto es más hialino. Tinción H-E.

Los ostiones presentaron una respuesta hemocítica, como se muestra en la figura 21 (B,b) paralela al incremento en el número de células cafés, como respuesta a la inflamación aguda. Los hemocitos, posiblemente granulocitos por su actividad protectora, se presentaron en esófago, intestino, glándula digestiva, branquia y manto. La densidad de hemocitos fue mayor en el tejido cercano al intestino y las branquias con respecto al esófago, túbulos de la glándula digestiva y el manto. Este mecanismo de defensa fue evidente desde las 24 horas de la fase de desintoxicación y disminuyó su densidad a las 230 h (figura 22, 23 y 24).

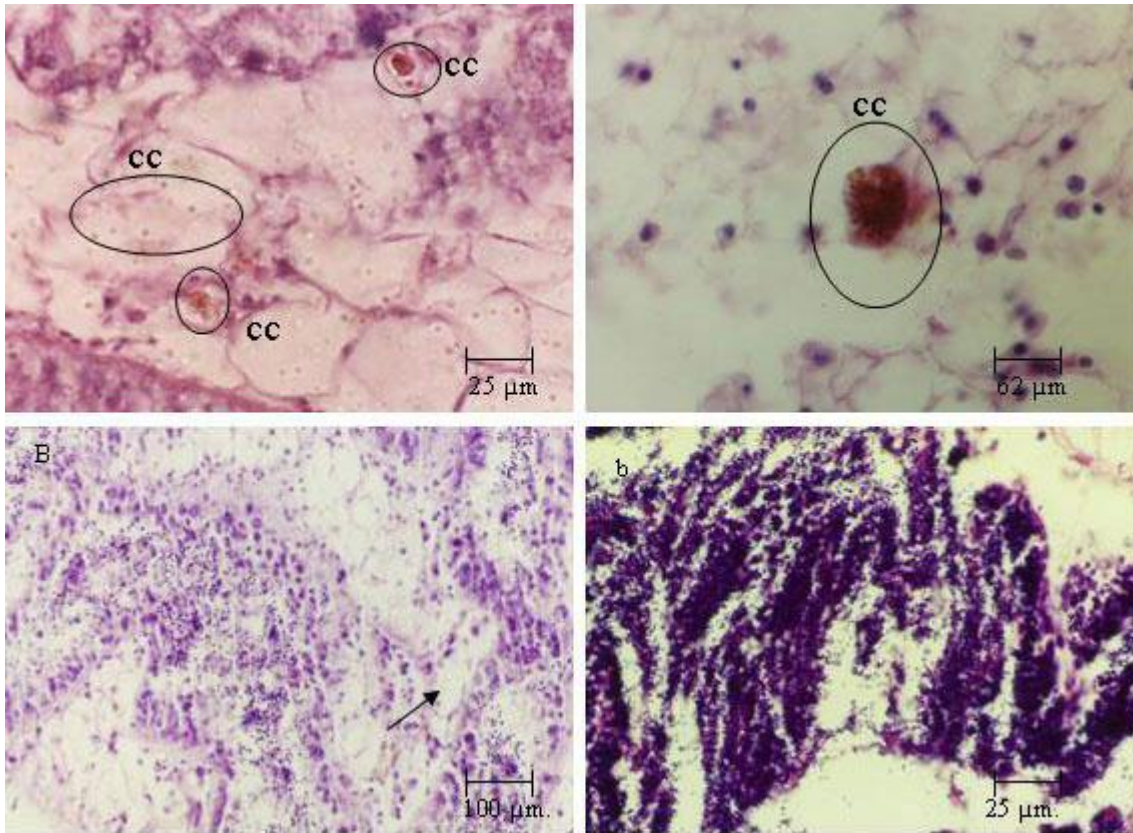


Figura 21. Tejido conjuntivo y canales de hemolinfa del ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) células cafées en diferentes tamaños (cc); B, b) hemocitos en aparente migración e incremento. Tinción H-E.

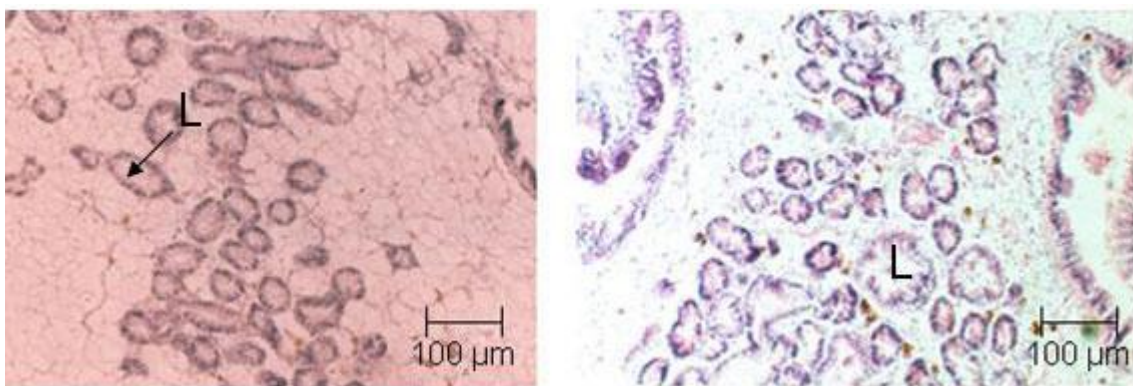


Figura 22. Aspecto de los túbulos durante la depuración con diferente radio interno en la luz (L) de los túbulos. Tinción H-E.

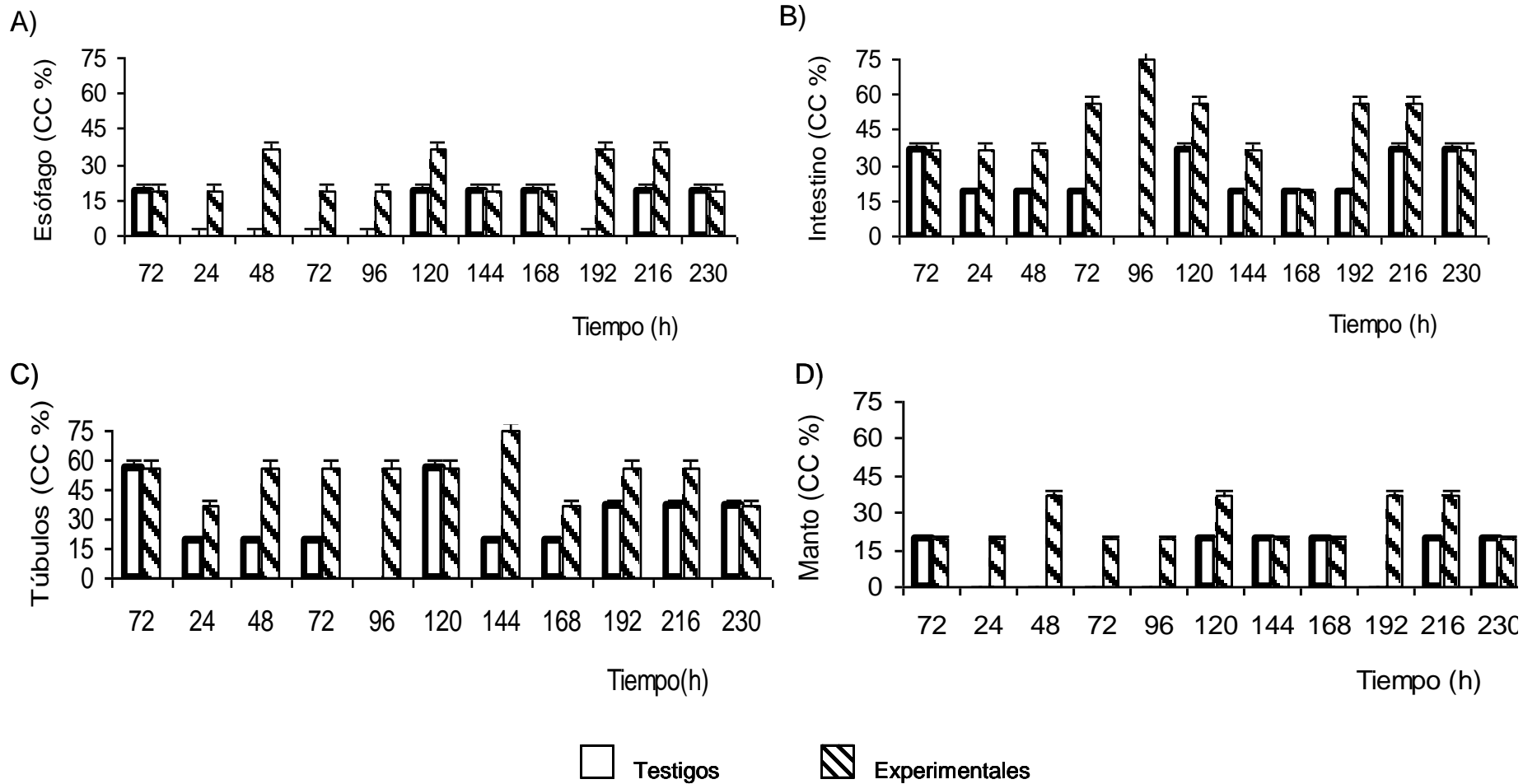


Figura 23. Células cafées en el ostión *Crassostrea virginica*. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva y D) manto.

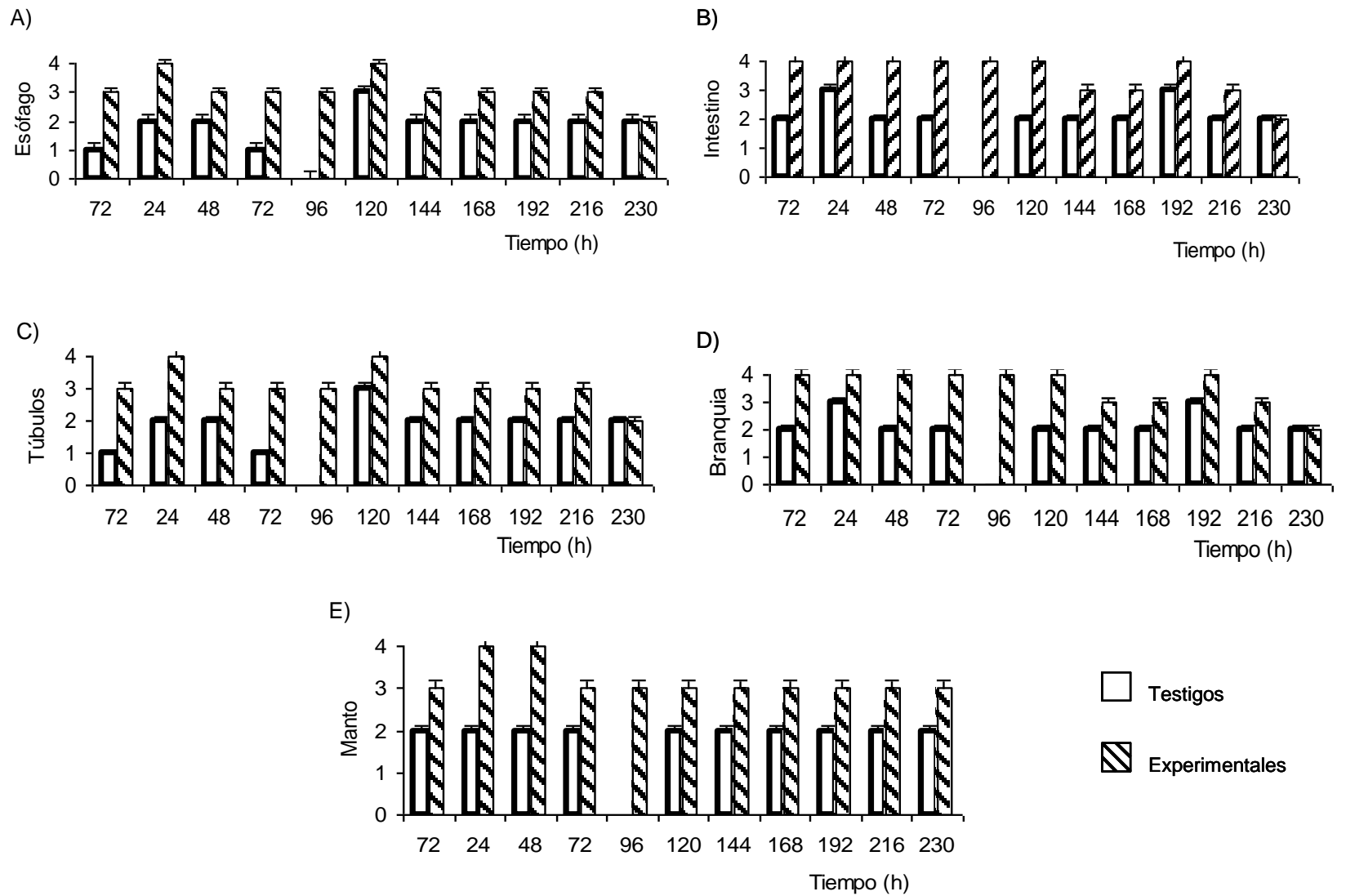


Figura 24. Hemocitos en tejidos del ostión *Crassostrea virginica*. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva, D) manto y E) branquia

7.4. Biomarcadores específicos

7.4.1. Histoquímica

7.4.2. Tricrómica de Masson

El tejido conectivo consiste de células (fibroblastos, adipositos etc.) y fibras (colágenas, reticulita y elastina) extracelulares incluidas en una sustancia amorfa. Con esta tinción fue posible evidenciar la presencia de fibras de colágeno. En la figura 25 se puede observar la presencia de fibras de colágeno en branquias de los organismos colectados en Mandinga, respuesta más evidente en organismos intoxicados con cadmio (figura 26 F).

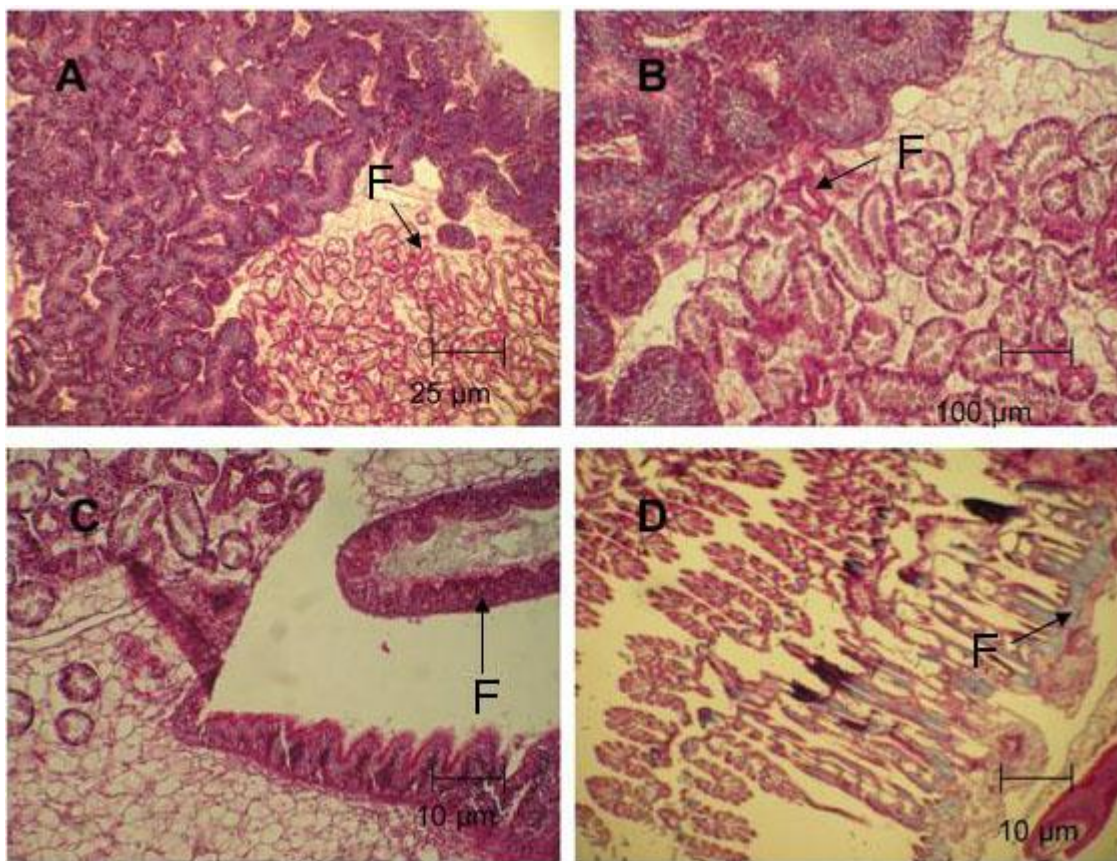


Figura 25. Fibras (F) teñidas en rojo en la base del epitelio de los túbulos y tracto digestivo (A a C) y la presencia de colágeno en las branquias (D). Tricrómica de Masson.

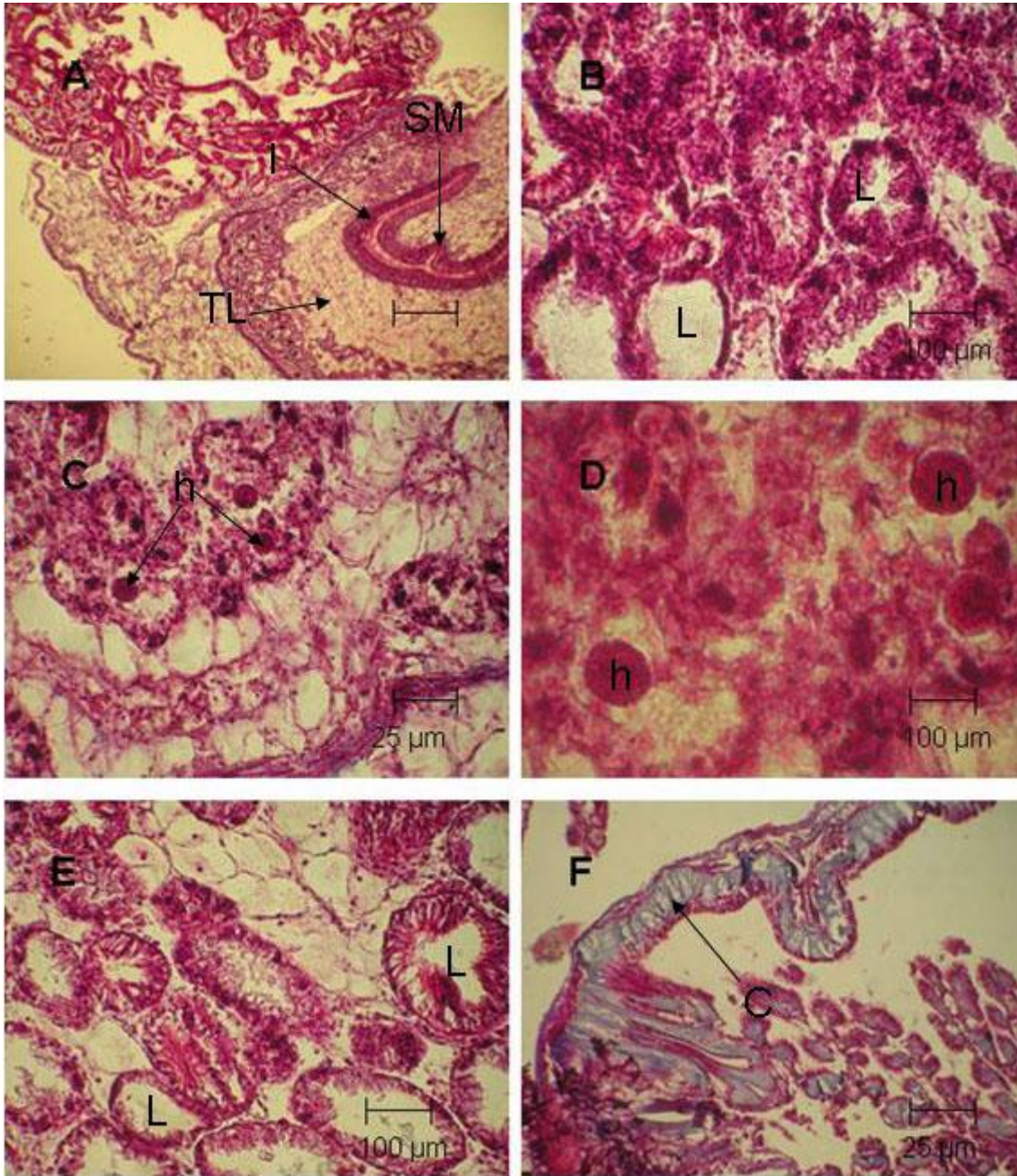


Figura 26. Aspecto de la glándula digestiva en ostión *C. virginica* de Mandinga, Ver. En A se observa el intestino (I) rodeado de tejido de Leydig (TL); en B un aspecto de la luz de los túbulos; en C y D, presencia de células esféricas posiblemente hemocitos; en F presencia de colágena (C) en un organismo intoxicado y posteriormente depurado por 72 h. Tricrómica de Masson.

7.4.3. Azul-Alcian

Los compuestos de hidratos de carbono presentes en los tejidos se ven afectados por las lesiones. Azul- Alcian es una técnica que proporcionó información de la presencia de mucina ácida. Los mucopolisacaridos de tipo ácido son evidentes en organismos colectados en Mandiga (figura 27) y al parecer en agua libre de metal esta respuesta decrece (figura 28), sin embargo en los organismos intoxicados con cadmio y desintoxicados (9 días) la respuesta persiste (figura 29).

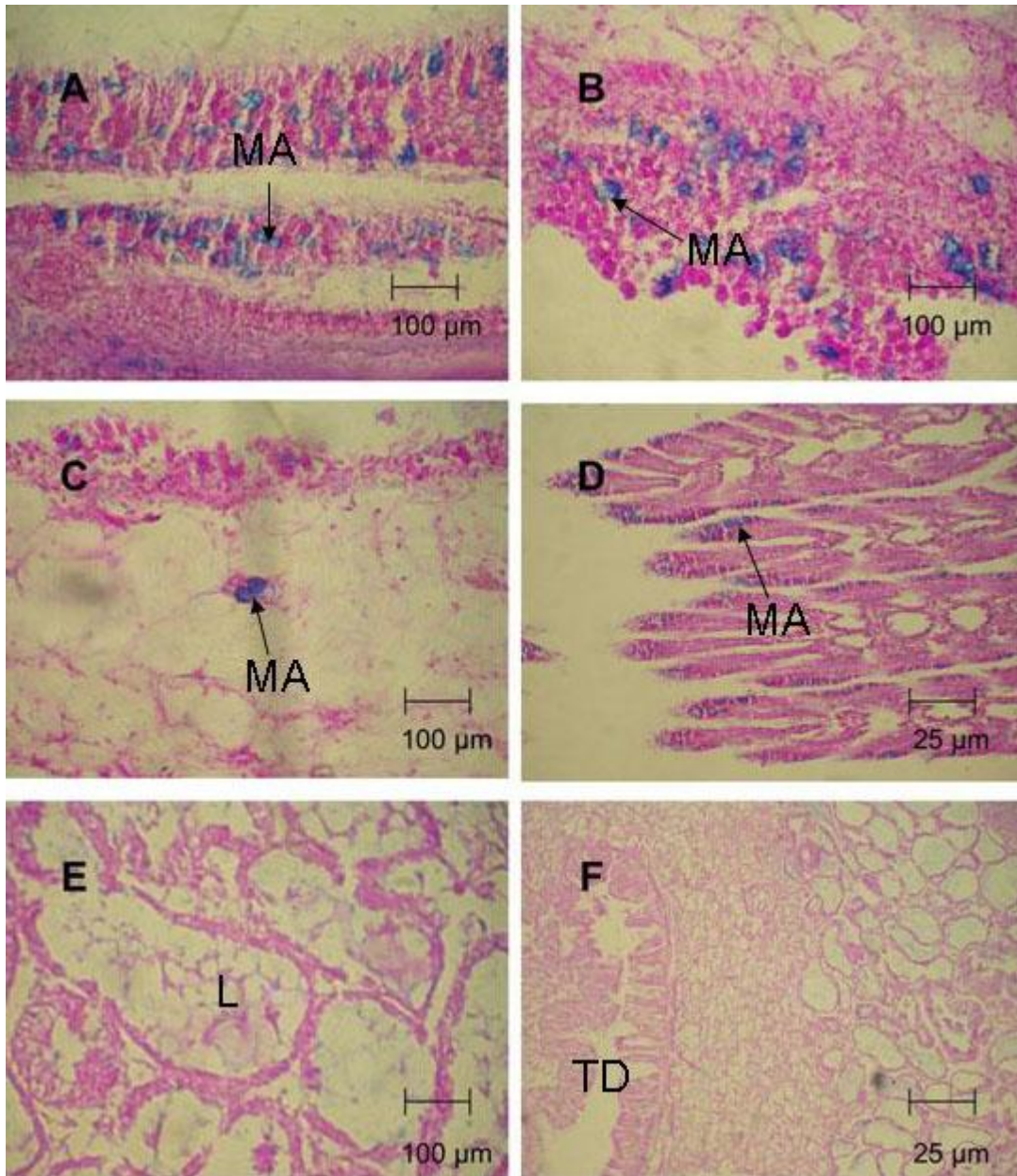


Figura 27. Mucinas ácidas (MA) en la parte apical de los epitelios del tracto digestivo, en tejido conectivo y en branquia (A a D), y el contraste de coloración en organismos sometidos a depuración por 24 h, en E aspecto de la luz (L) de los túbulos y en F tracto digestivo (TD) con lesiones. Tinción azul-alcian.

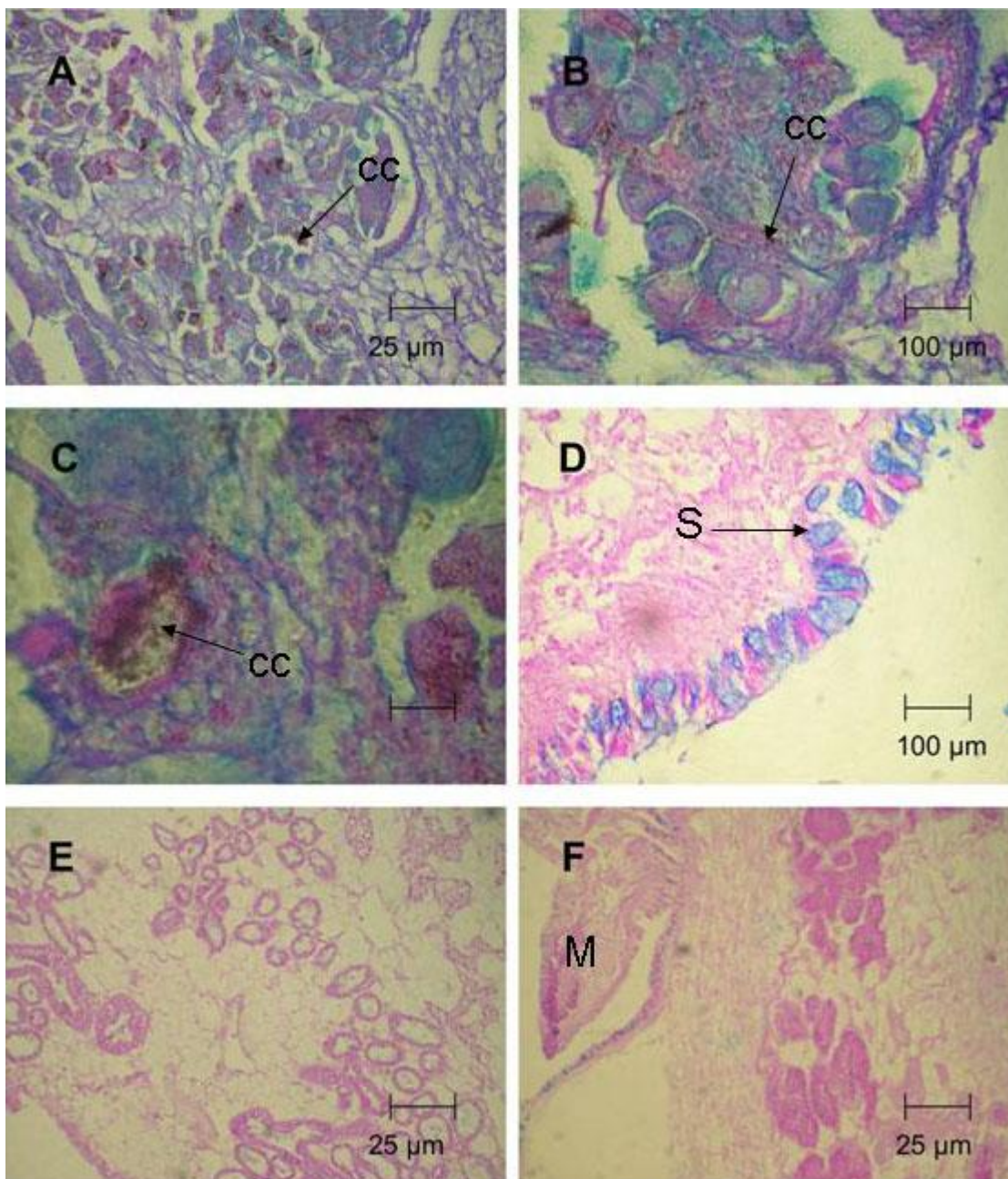


Figura 28. Coloración típica de mucopolisacáridos de tipo ácido en organismos sujetos a depuración por espacio de 15 días. En A a C presencia de células cafés (cc); en D a F, secreción (S) en los borde del manto así como la tinción hialina observada en organismos del bioensayo de exposición a cadmio y desintoxicados por 9 días. Tinción azul-alcian.

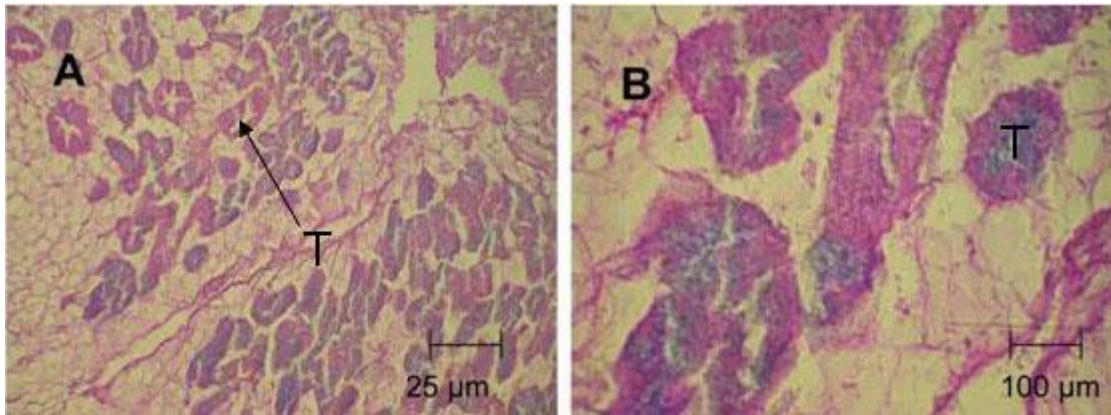


Figura 29. Aspecto de los túbulos (T) de la glándula digestiva (A) organismos intoxicados con Cd y (B), ostiones depurado por 9 días. Tinción azul-alcian.

7.4.4. Ácido Peryódico-Schiff (PAS)

La respuesta en la membrana basal de los epitelios fue PAS positiva indicando la presencia de mucopolisacaridos de tipo neutro, posiblemente como mecanismos de defensa. La presencia de estos mucopolisacaridos también se observó al interior de los túbulos de la glándula (figura 30) y estuvo más marcada en organismos intoxicados con Cadmio (figura 31).

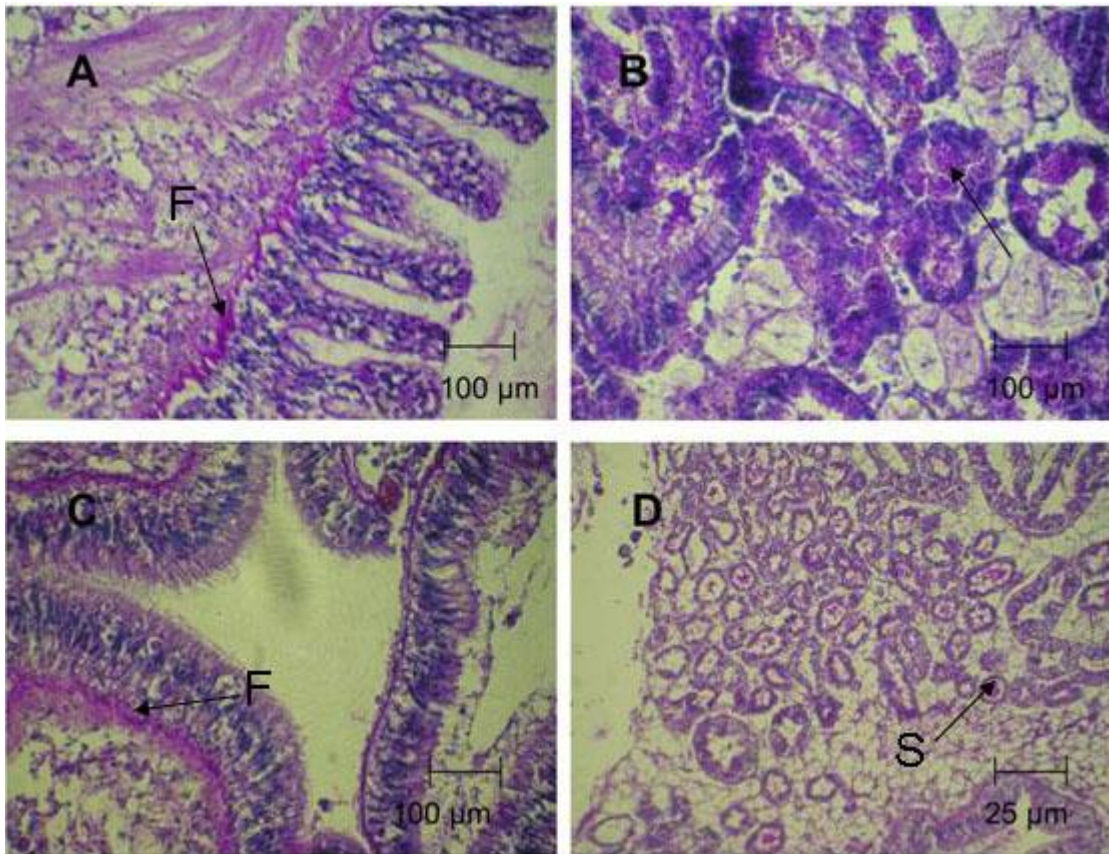


Figura 30. En A se observa fibras de colágena (rosa) en el tejido conjuntivo ó de leyding. En B la tinción rosa sugiere la presencia de carbohidratos de la membrana basal de los túbulos de la glándula digestiva. En C otro aspecto de la tinción de carbohidratos den la membrana basal del intestino. En D se muestra un aspecto de la secreción (S) de mucopolisacaridos en tracto digestivo y en la luz de los túbulos de organismos intoxicados. Tinción PAS.

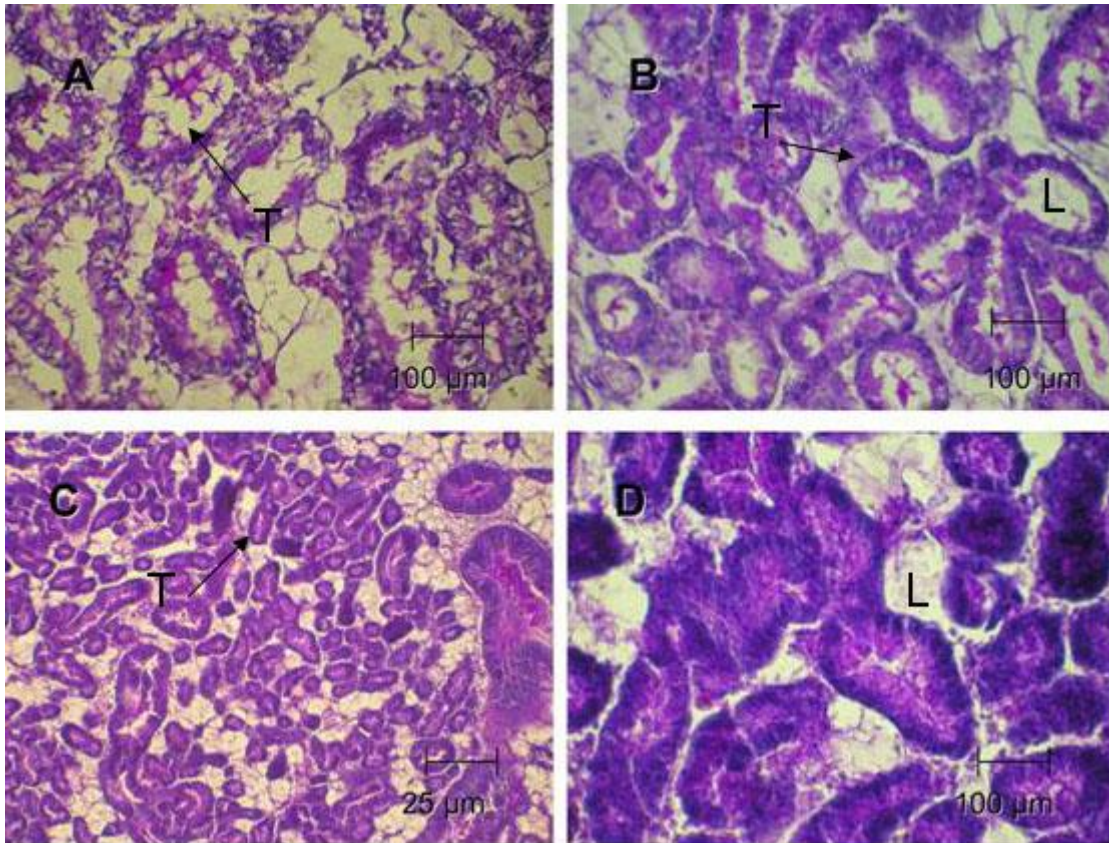


Figura 31. Aspecto de mucopolisacaridos neutros en organismos desintoxicados después de la exposición a cadmio. En A observe los túbulos (T) de organismos desintoxicados (24 h); en B a D se nota el radio de los túbulos mas estrecho en organismos depurados 7 días. Tinción: PAS.

7.4.5. Inmuhistoquímicas; CD45; PAP; CD68

Los resultados de las pruebas con Cd45 mostraron una tinción mas intensa en la membrana (Figura 32). Se observó esta reacción en los túbulos de la glándula digestiva y no reaccionó con tejido como la branquia o el tejido conjuntivo (Figura 33).

La presencia de Fosfatasa Alcalina Placentaria (PAP) se observó en el tracto digestivo de *C. virginica* sugiriendo la presencia de neoplasias (Figura 34).

CD68 proteína de membrana lisosomal altamente glicosilada evidencia macrófagos y hemocitos así como la identificación de neoplasmas en este caso en los túbulos de la glándula digestiva y en el intestino evidenció macrófagos (Figura

35). Los resultados con anticuerpo para metalotioneínas marcaron las denominadas vesículas cafés, sin embargo la prueba no diferencio otra coloración.

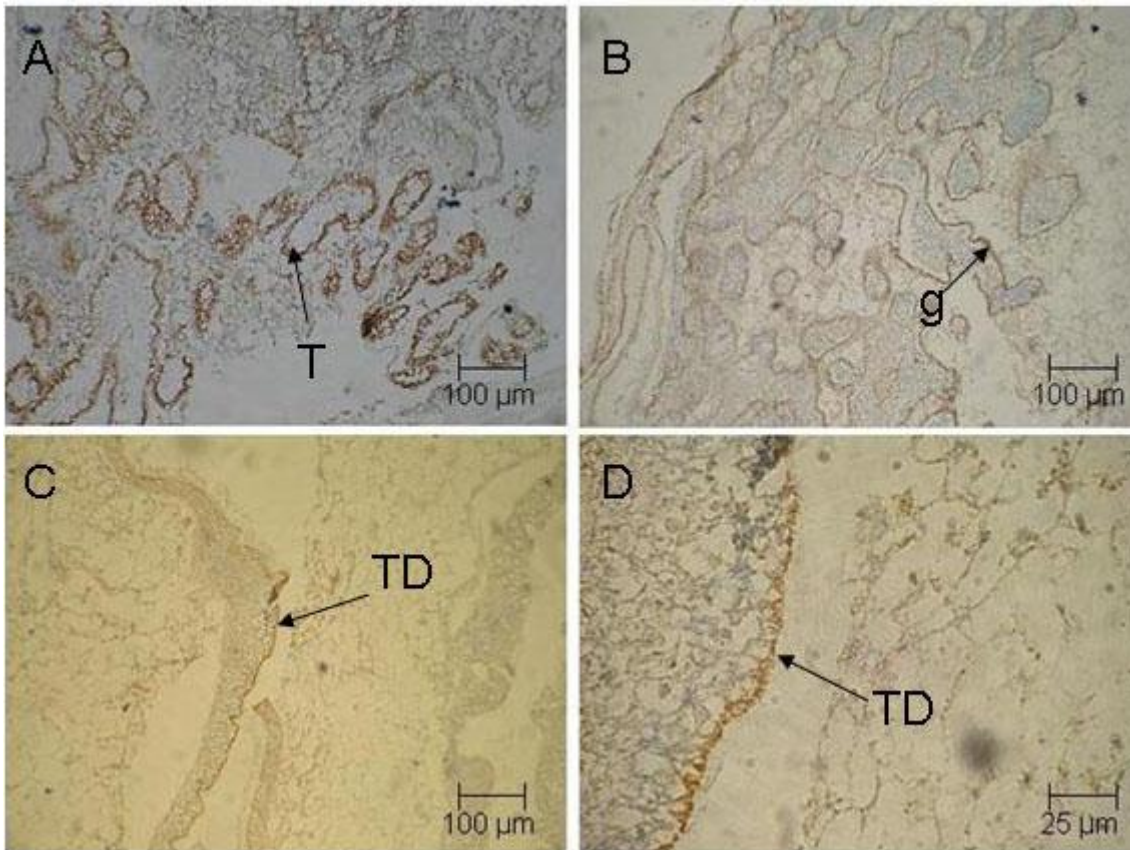


Figura 32. Tinción de CD45 en la periferia de los túbulos (T) de la glándula digestiva y gónada (g) y en la porción apical de los cilios del tracto digestivo (TD).

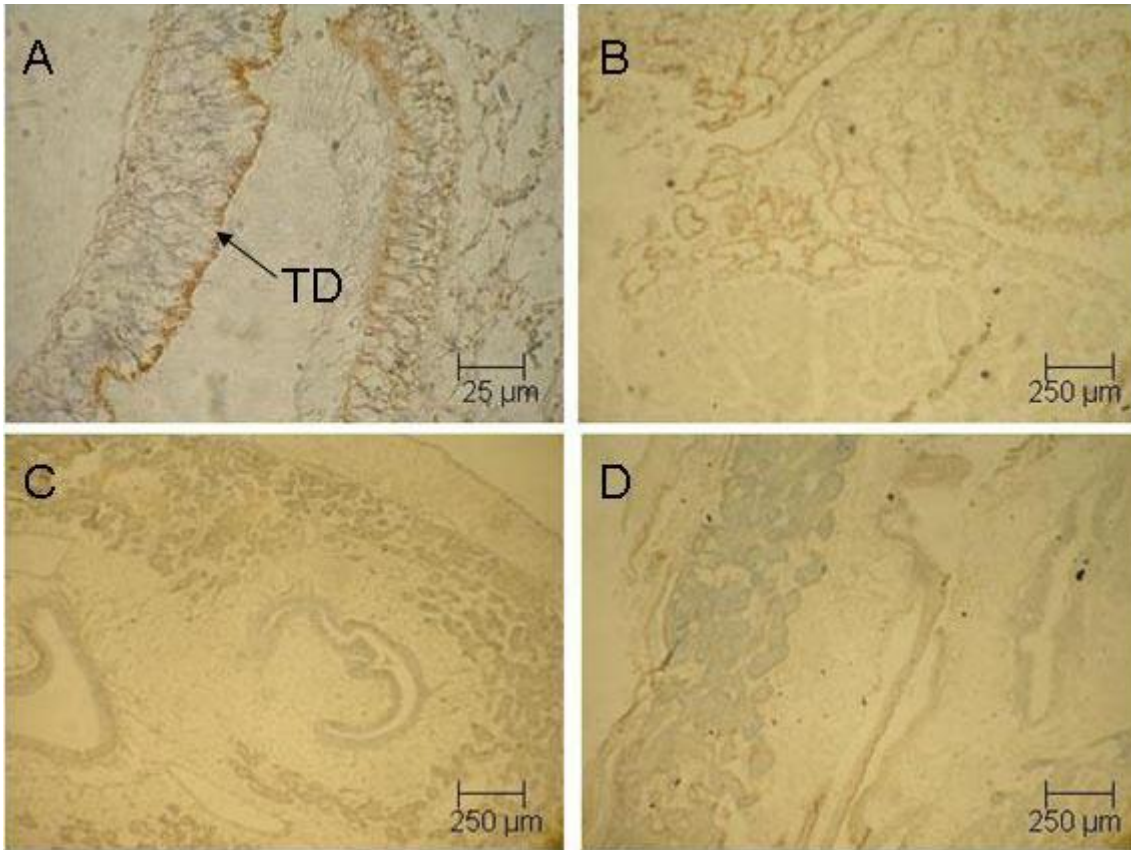


Figura 33. En A Inmunohistoquímica positiva con CD45 en tracto digestivo (TD) de *C. virginica* la tinción fue negativa en lo que aparenta ser el músculo y tejido conectivo (B a D).

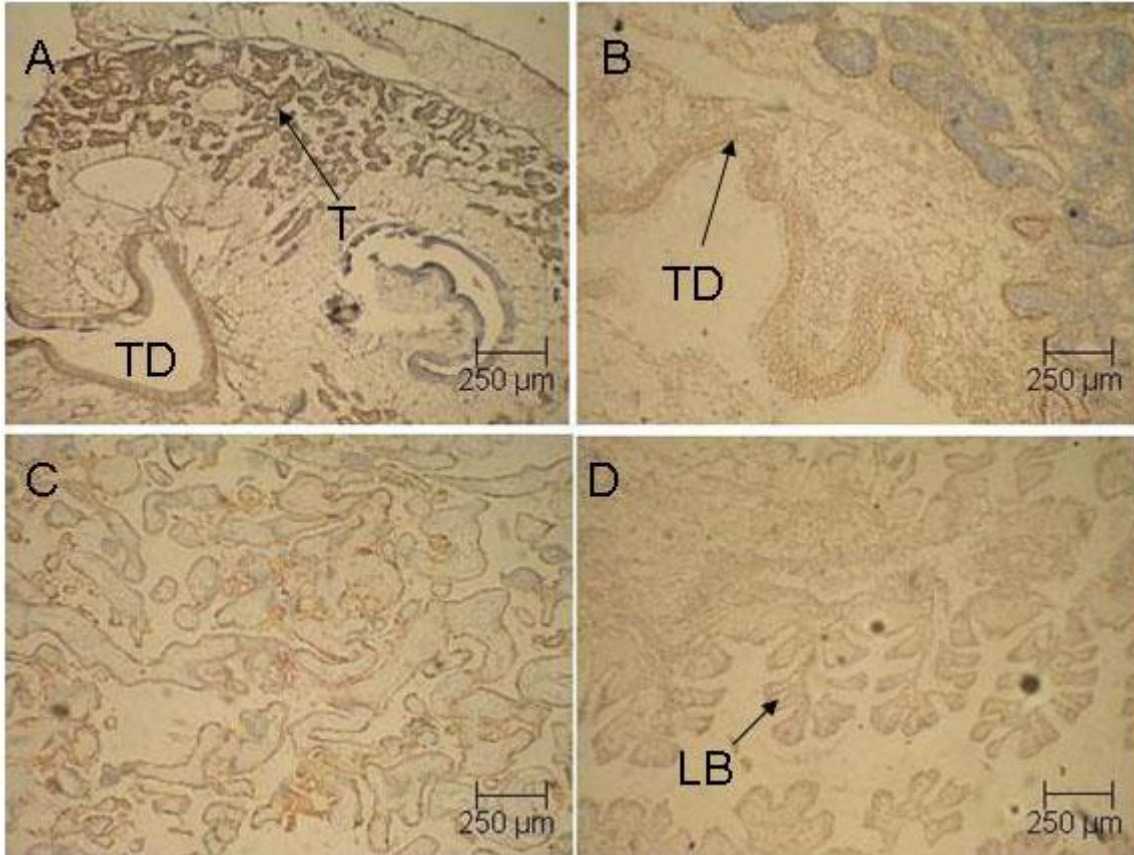


Figura 34. PAP evidenció actividad en los túbulos (T) de la glándula y en el tracto digestivo (TD), no se observó en las branquias (C a D).

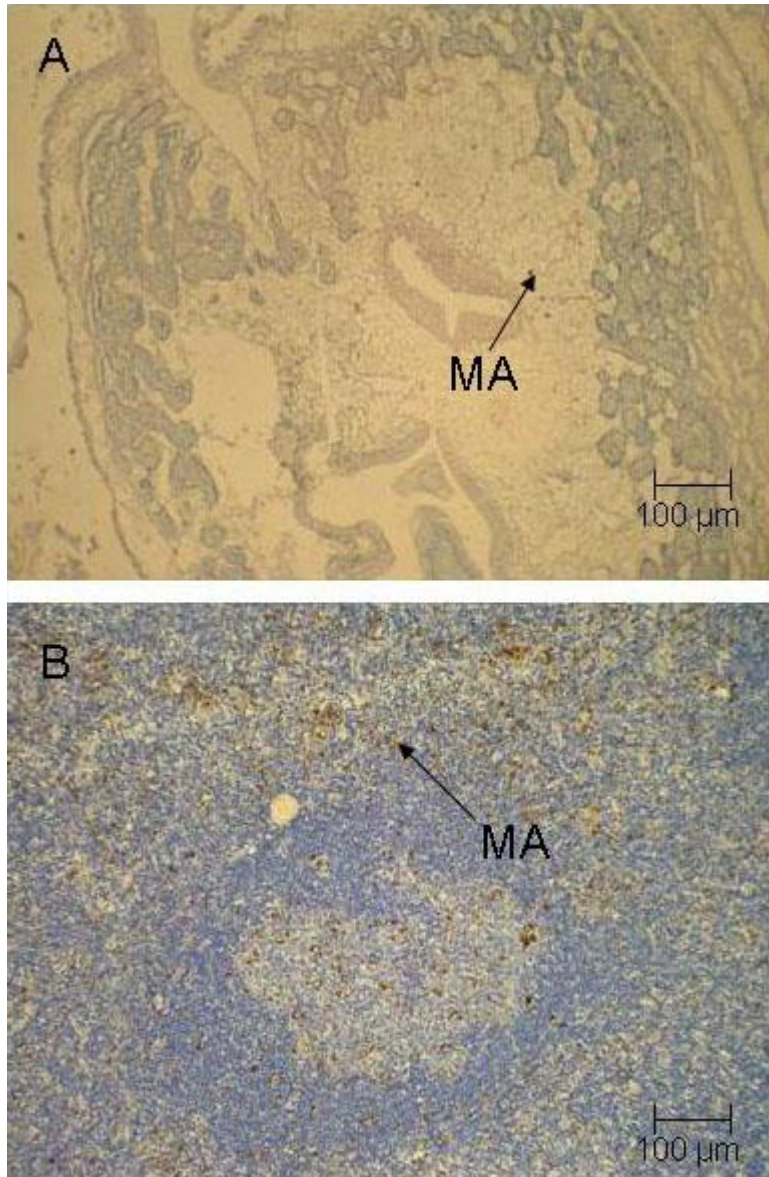


Figura 35. Respuesta con CD68 en los túbulos de la glándula digestiva del ostión y presencia de macrófagos (Ma) en testigo positivo de ganglio linfático.

7.5. Estudio de las proteínas solubles totales de *C. virginica* por electroforesis en presencia de SDS.

7.5.1. Extracción de proteínas.

Las proteínas extraídas de *C. virginica* fueron cuantificadas obteniéndose 2 mg/g de proteína en el tejido fresco de ostión. Se realizó la cuantificación de proteínas en las branquias y glándula digestiva de los ostiones y no hubo diferencias en las concentraciones promedio.

7.5.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) de las proteínas de *C. virginica*.

Las concentraciones de proteínas determinadas en *C. virginica* fueron altas por lo que se realizó el ajuste del volumen de dilución de las proteínas (figura 36). Las proteínas de la glándula digestiva y de las branquia de los ostiones de la Laguna de Mandinga fueron analizadas en diferentes concentraciones para definir la concentración de proteína que reflejara mejor el patrón electroforético (figura 37). Los resultados preliminares sugirieron la concentración adecuada de muestra en el gel (12 µg/µL), ya que concentraciones mayores no permitieron evidenciar con claridad las bandas de proteínas (figura 38).

En el patrón electroforético de *C. virginica* se observaron 19 bandas proteínicas. Algunas de alto peso molecular (148, 168 y 237 KDa); también proteínas de peso entre 42 y 95 KDa y un mayor número de proteínas de bajo peso molecular (11, 12, 13, 16, 18, 19, 21, 25, 27 y 32 KDa). Algunas bandas de proteínas se observaron en todos los organismos (237, 168, 149, 55, 42, 32, 27, 25, 21, 19, 18 y las de 15 KDa) mismos que presentaron entre 16 y 36 ppm de los metales analizados. Las bandas de 14 a 21 KDa podrían tratarse de las sHsps que incluyen a las metalotioneínas; las de 45 a 95 KDa podrían corresponder Hsp60 y Hsp70.

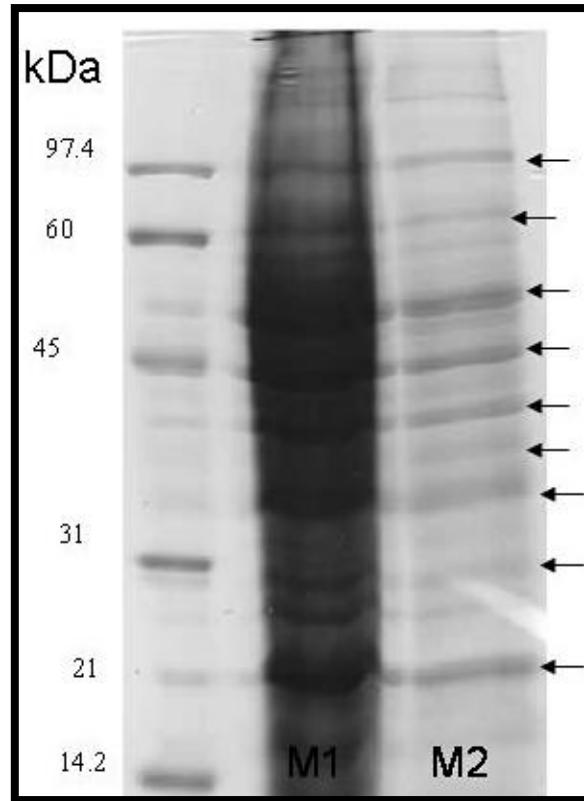


Figura 36. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del Ostión *Crassostrea virginica*. (M1= dilución 1:100 y M2= dilución 1:50).

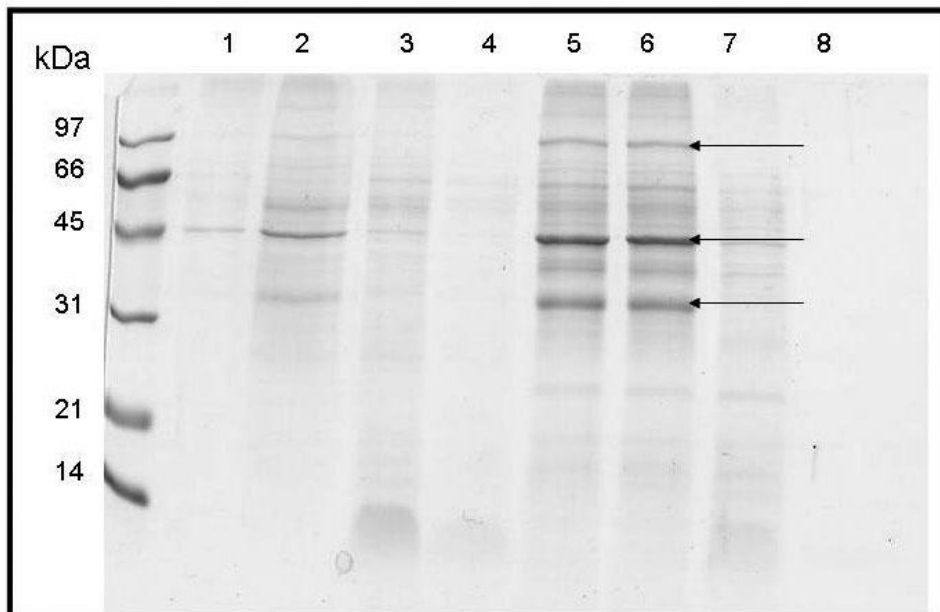


Figura 37. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica*. En 1 Marcadores de peso molecular; de 2 a 4 glándula digestiva y de 5 a 8 proteínas en la branquia del ostión.

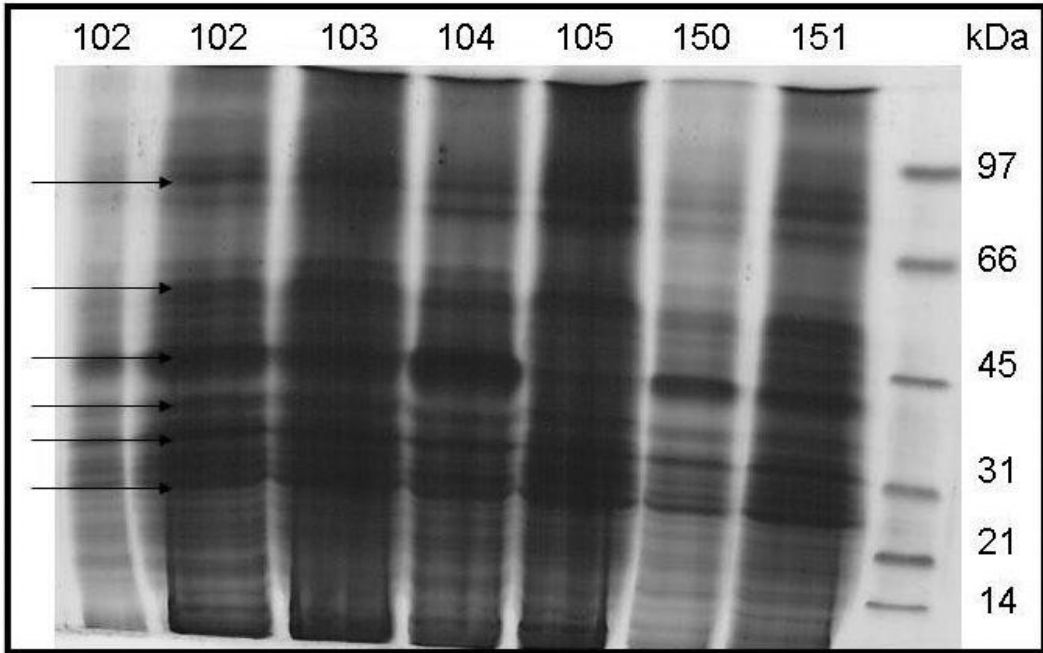


Figura 38. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica* de Laguna chica (102 a 105) y la Boca (150 a 151) en Mandinga, Ver., con altas concentraciones de proteínas en cada carril.

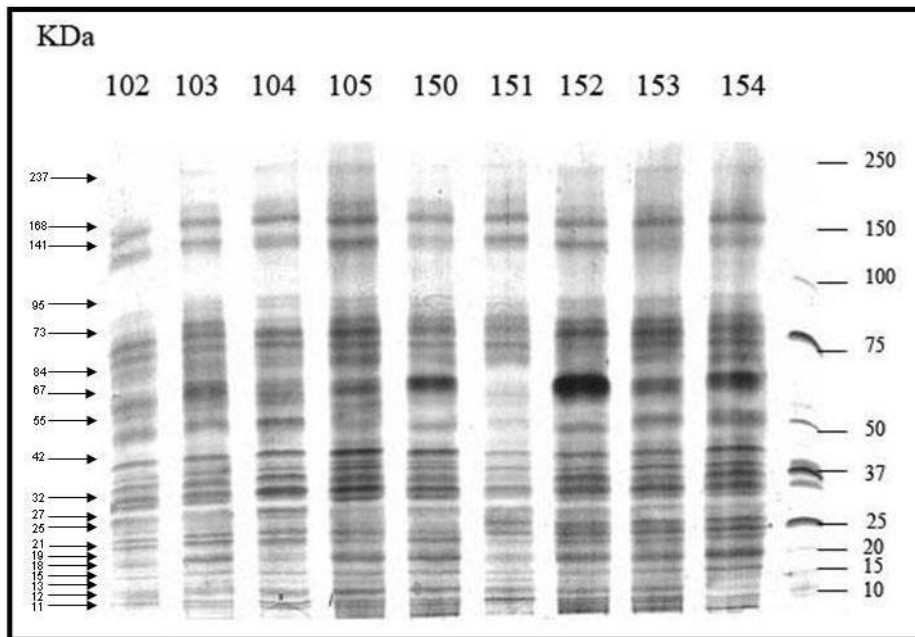


Figura 39. Electroforesis de las Proteínas solubles totales del ostión *Crassostrea virginica* de la Laguna de Mandinga, Ver. (Laguna Chica; 102 a 105; La Boca; 150 a 154).

7.6. Correlación de las concentraciones de metales, parámetros fisicoquímicos y las variables biométricas.

La concentración de metales y la pérdida de los epitelios (presencia o ausencia), deformación y neoplasias de los túbulos de la glándula digestiva fueron cuantificados, así como la presencia de células cafés y la activación de hemocitos en los tejidos, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Las lesiones fueron evaluadas en organismos de campo y desintoxicados, se observó mayor epitelio recubriendo los túbulos así como un incremento en la respuesta hemocítica con respecto al tiempo de depuración. Los ostiones con contenidos de metales presentaron edema y atrofia de epitelios en túbulos en más del 80 % sin embargo, en 4.64% el epitelio persistió. Se observó un incremento en la cantidad de hemocitos; 32% en organismos de campo y más de 60% en organismos sujetos a depuración.

La correlación de las respuestas histológicas con las concentraciones de metal sugiere una relación significativa del cadmio con la pérdida de epitelios, vesículas cafés y presencia de reacción humoral (Tabla 11). El plomo se correlacionó significativamente con los efectos en los túbulos de la glándula digestiva evidentes por la pérdida de cilios, mientras que el cromo se correlacionó significativamente con la presencia de vesículas cafés.

El 47% de ostiones presentaron lesiones histopatológicas en la glándula digestiva relacionadas estadísticamente con la concentración de metales.

Tabla 10. Concentración de metal y presencia de lesiones en ostiones de Mandinga y desintoxicados

Ostiones	Cadmio ($\mu\text{g gps}^{-1}$)	Plomo ($\mu\text{g gps}^{-1}$)	Cromo ($\mu\text{g gps}^{-1}$)	Edema en túbulos (%)		Vesículas café (No.)	Hemocitos (%)
				sin epitelios (%)	con epitelios (%)		
Muestra 1	1.20	L.D	61.00	87.00	3.30	17.00	20
Muestra 2		L.D	79.00	85.00	5.60	7.00	N.O.
Muestra 3	L.D	L.D	67.00	84.20	4.20	32.00	40
Muestra 4	0.50	L.D	51.00	77.30	4.50	25.00	10
Muestra 5	1.01	2.30	L.D	85.90	1.80	9.00	N.O.
Muestra 6	1.94	2.36	55.00	80.80	3.80	10.00	N.O.
Muestra 7	0.70	4.67	29.00	86.70	7.70	18.00	10
Muestra 8	L.D	8.90	L.D	80.80	6.20	30.00	20
Promedio Desv.Stad.	0.67 \pm 0,65	2.28 \pm 2,96	42.75 \pm 28,05	83.46 \pm 3,24	4.64 \pm 1,71	19.00 \pm 9,04	12.80 \pm 15,40
Tiempo (h)	Fase de desintoxicación.						
24	6.02	38.99	20.16	88.2	8.8	9	10
72	3.82	13.75	3.81	90.7	7.9	17	10
144	4.47	2.84	4.96	82	5	37	20
216	5.84	0.94	0.85	85.7	8.6	22	10
288	6.45	8.47	5.57	89.5	8.9	45	20
360	6.75	34.04	3.69	84.6	3.8	63	20
432	8.92	31.45	12.47	91.4	7.1	70	20
504	4.75	22.62	0.8	72.7	10.9	40	20

Tabla 11. Matriz de correlación en organismos de campo

Variable	Edema en túbulos		Vesículas	Hemocitos
	Sin epitelio	Con epitelio		
Cadmio	0.05	*-0.45	*-0.53	*-0.43
Plomo	-0.11	*0.48	0.27	0.00
Cromo	0.02	0.00	-0.12	0.14
Matriz de correlación organismos sujetos a desintoxicación				
Cadmio	0.36	0.23	*0.63	0.37
Plomo	0.12	0.09	0.32	0.15
Cromo	0.10	-0.36	*-0.32	-0.30

8. Discusión

Los resultados de la longitud de la concha, índice de condición, peso de tejido húmedo de los ostiones y salinidad de la laguna fueron similares en todas las colectas, su peso e índice de condición fueron aceptables desde el punto de vista alométrico, por lo tanto, los organismos entraron a experimentación en buenas condiciones de acuerdo a estos parámetros. Se registró un pH elevado durante la fase de laboratorio con respecto a la zona de colecta, sin embargo se encuentra dentro del pH óptimo para esta especie. El pH tiene influencia en el proceso de alimentación de las ostras, existiendo condiciones óptimas entre 6 a 8.5 por debajo o encima de los cuales el proceso de filtración cesa (SEPESCA-Secretaría de Pesca, 1988).

El índice de condición en los ostiones colectados en Mandinga fue más alto en secas y menor en nortes, estas diferencias pueden atribuirse al ciclo de vida de los organismos, ya que los meses más calidos favorecen la alimentación, crecimiento y en general la acumulación del material energético de la especie *C. virginica* (Werner, 2004). En los ostiones depurados en el laboratorio, el índice de condición fue en decremento, posiblemente por el estrés atribuido a las condiciones de laboratorio o por la dieta alimenticia. Los ostiones expuestos a cadmio presentaron el mayor índice de condición lo cual evitó que la variación fisiológica complicara el análisis de la relación entre la cantidad total de metales en el tejido y el estado fisiológico (Depledge y Bjerregaard, 1989).

Las concentraciones de cadmio y plomo en el agua de la laguna, en general, permanecieron por arriba de los niveles recomendados por la legislación mexicana; en la época de lluvias se registraron niveles de 1.86 mg L⁻¹ de cadmio, y de 1.24 mg L⁻¹ de plomo, niveles arriba del LMP en el agua. Estos resultados pueden ocurrir debido a la lixiviación y escorrentía de contaminantes de las laderas de la laguna durante la época de lluvias (Guzmán *et al.*, 2005).

El sedimento de la laguna presentó en octubre concentraciones de cadmio por encima de 1.2 µg g⁻¹ que señala Long *et al.*, (1995) como un valor que en

sedimento produce efectos biológicos adversos (V.S.E.B.); es importante señalar que la presencia de este metal en ambientes marinos disminuye la capacidad de sobrevivencia de larvas y estadios juveniles de peces, moluscos y crustáceos (Villanueva y Botello, 1998). La concentración de metales en el sedimento presento una tendencia (Cr >Pb> Cd) similar a lo reportado por Guzmán (2004) quién señala que la tendencia en los sedimentos de la laguna de Mandinga fue; Pb >Cr> Cd en concentraciones promedio de 0.89, 14.75 y 29.56 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Los resultados de este trabajo en cuanto a las concentraciones y tendencias de cadmio, plomo y cromo son muy parecidas a las determinadas por Guzmán, *et al*, (2005), las diferencias podrían estar relacionadas con el acarreo ocasionado por las lluvias y vientos del norte que influyen en el transporte de contaminantes, las descargas del Río Jamapa (OSTIMEX, 1996) y las aguas residuales de la industria y zonas urbanas al margen de la cuenca que hacen que el sistema funcione como depósito de los desechos de refinerías, cementeras y de la fabricación de estructuras metálicas, ubicadas en los municipios de Veracruz, Medellín, Jamapa, Boca del Río, Tlalixcoyan y Alvarado (Hernández, 1996).

Las concentraciones de cadmio (2.83 $\mu\text{g g}^{-1}$) y plomo (5.84 $\mu\text{g g}^{-1}$) en el ostión estuvieron por encima de lo que marca la NOM-031-SSA1-1993 de 0.5 y 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente (D.O.F., 1995). Es importante señalar que de acuerdo con los Niveles Críticos para Consumo de Moluscos Bivalvos de la de la FDA (1993) de los Estados Unidos, que son el principal país importador de productos pesqueros mexicanos (SAGARPA, 2000) el ostión de Mandinga no sobrepasó el límite establecido para cadmio (3.7 $\mu\text{g g}^{-1}$) y estuvo por encima del limite para plomo (1.7 $\mu\text{g g}^{-1}$). El plomo se registró a lo largo del ciclo anual analizado por lo que se puede pensar que representa una fuente de exposición crónica para el ostión. Los niveles de metales más altos se registraron en ostiones colectados en marzo y junio, coincidiendo con la época de secas y lluvias cuando se registran altas temperaturas, mayor evaporación y remoción de sedimentos. En la época de secas se limita la eliminación de xenobióticos y se favorece la bioacumulación durante la época de lluvias. Guzmán (2005) señala que en lagunas costeras las concentraciones más altas de metales son más frecuentes en las épocas de

nortes y secas, con excepción del níquel, cromo y plomo que en Mandinga se presenta en la época de lluvias, resultados que pueden deberse al efecto de los vientos del norte sobre los sistemas estudiados y en la época de secas al efecto de la concentración de contaminantes por evaporación. Las concentraciones promedio de cromo estuvieron por debajo del parámetro de referencia, sin embargo, la mezcla de los tres metales estudiados podría generar respuestas fisiológicas importantes aún en los niveles registrados en la laguna. Barrera (2006) ha señalado que el metabolismo basal en *C. virginica* se incrementa de 17 a 57% en organismos expuestos al cadmio. Otros estudios en *Argopecten ventricosus* mencionan que la mezcla de metales Cd + Cr + Pb inducen alteraciones en sus procesos fisiológicos (tasa de crecimiento, de respiración y filtración) y que el Cadmio modula la respuesta en estos organismos (Sobrino, 2001).

Los resultados del análisis de correlación de las variables biométricas y parámetros ambientales con el fin de analizar la influencia de estas variables sobre la concentración de metales en ostión mostraron una relación entre la concentración de cadmio y cromo en ostión con la concentración de cadmio y cromo en los sedimentos; las concentraciones de cadmio y plomo en el agua con las concentraciones de estos metales en ostión presentaron una correlación negativa es decir, cuando los organismos presentaron mayor concentración de cadmio y plomo, el agua tenía bajos niveles de estos metales lo que podría deberse a la capacidad de bioconcentración de cadmio y plomo de los ostiones desde la columna de agua; la longitud de los ostiones presentó correlación con los niveles de metales captados, posiblemente porque al aumentar el tamaño también se incrementa la superficie y el tiempo de contacto con los contaminantes. Sin embargo, es evidente que la masa visceral sufre modificaciones a lo largo del ciclo anual, debido a la emisión de gametos y las reservas energéticas almacenadas por la disposición de alimento, tamaño y estación climática (Nelson *et al.*, 1996), lo cual también tiene influencia en la captación o eliminación de contaminantes. La salinidad se correlacionó con las concentraciones de plomo y cromo en ostión, sin embargo; otros trabajos han reportado una relación inversa (Gold-Bouchot *et al.*, 1997). La biodisponibilidad de los metales es inherente a las características

fisicoquímicas de los metales, por ello la salinidad, el pH, oxígeno disuelto y factores biológicos como el índice de condición (peso, longitud), concentración de metales biodisponibles en agua y sedimento, fueron variables que se correlacionaron con los niveles de metales registrados en ostión. Estudios similares al presente han reportado una clara relación entre los niveles de cadmio, cromo y plomo en ostión con la concentración de metales en el sedimento, el pH y el % de carbono orgánico (Guzmán *et al.*, 2005).

En el 41% de ostiones provenientes de la laguna de Mandinga se detectó cadmio, el 80% presentó plomo y 7% cromo, situación que puede sugerir poca capacidad de depuración en el sistema lagunar, sobre todo en el caso de plomo. Las concentraciones de metales en los ostiones, requirieron alrededor de 15 días para mostrar una ligera tendencia a la eliminación de los tres metales en el laboratorio por lo que podríamos pensar que existe posibilidad de eliminación de manera diferencial debido a la activación de diferentes rutas metabólicas. La activación de las rutas metabólicas en los procesos de desintoxicación y reparación de daños, puede también relacionarse con la velocidad de eliminación de los metales durante la depuración. El cadmio generalmente produce respuestas de saturación, esto podría explicar porque los niveles adquiridos en la laguna no fueron eliminados en los intervalos probados durante la fase de desintoxicación, a pesar de que el tiempo de vida media del cadmio en condiciones de laboratorio se estima en 21 días (Guzmán-García, 2001). Otros autores como Greig y Wenzloff (Greig y Wenzloff, 1978), señalan que los organismos que son sometidos a depuración, que provienen de un ambiente natural contaminado y se introducen en otro limpio reducen su tasa de depuración, debido a que las metalotioneínas (proteínas con alta afinidad al cadmio) son capaces de inmovilizar el metal y acumularlo en gránulos amorfos en el interior de la célula en forma no tóxica. La acumulación de metales se produce a través del alimento, en el caso de los bivalvos, por la incorporación de formas biodisponibles del metal después de la digestión en el tracto digestivo (Rainbow *et al.*, 1990). En la glándula digestiva de *C. virginica* se han determinado niveles más altos de metalotioneínas con respecto a la branquia y se ha reportado, que estas proteínas se inducen a las 72 h (810 µg

g⁻¹) y desciende su concentración a las 96 h (158 µg g⁻¹) en ostiones expuestos a 110 µg L⁻¹ de cadmio .

En los ostiones intoxicados con cadmio, los niveles bioconcentrados fueron hasta de 26 µg g⁻¹ más del doble registrado en ostiones de campo y a los 13 días fueron capaces de eliminar el 92% del metal bioconcentrado.

Los cambios tisulares observados en el ostión de campo, intoxicado y desintoxicados, sugieren la exposición continua a agentes xenobióticos. El 47% de ostiones presentaron lesiones histopatológicas en la glándula digestiva relacionadas estadísticamente con la concentración de metales. El análisis histológico mostró daños similares en el tracto digestivo, divertículos digestivos, gónada y tejido conectivo, por ejemplo edema, hiperplasia de las células epiteliales en los túbulos, presencia de vesículas cafés, incremento en hemocitos y necrosis, los que pueden correlacionarse con factores ambientales tales como cadmio ($r = 0.63 \alpha 0.67$) plomo ($r = 0,67 \alpha 0.67$) y cromo ($r = 0.57 \alpha 0.67$).

Los daños observados, se asociaron con las concentraciones de metales en este orden Pb > Cd > Cr. Sin embargo, existen otros contaminantes que no fueron considerados en este estudio y que también pueden estar afectando los tejidos.

Las diferencias en el radio de los túbulos de la glándula digestiva por la presencia o ausencia de epitelios de recubrimiento, constituye un daño en el ostión Winstead (1998), ya ha reportado la atrofia de los túbulos digestivos y la pérdida de sus epitelios como indicador de estrés.

Las alteraciones en la anatomía y en la función de los organismos analizados, se relacionaron con diferentes reacciones histopatológicas; entre las que destaca la inflamación. La inflamación es una reacción de los tejidos a diferentes formas de lesión y entraña respuestas vasculares, neurológicas, humorales y celulares en el foco que sufre daño (Rubin y Farber, 1990).

La célula expuesta a una agresión subletal persistente, tiene un repertorio limitado de respuestas (como son la producción de células cafés y los hemocitos en el caso del ostión), cuya expresión se interpreta como evidencia de lesión celular. Zarogian y Yevich (1994) reportaron un incremento en el número de células cafés

relacionadas con la respuesta inflamatoria y han señalado que la actividad de las células cafés de *C. virginica* se relaciona con el proceso de incorporación, acumulación, desintoxicación y degradación de material extraño de la hemolinfa y que aparecen conjuntamente con amebocitos, los cuales fagocitan partículas y envuelven solutos; mientras que las células cafés embeben solutos eficientemente como un mecanismo de defensa. Otros autores han señalado que la aparición e incremento de las células cafés, junto con los hemocitos cerca de los sitios de inflamación, representan mecanismos de incorporación, acumulación y desintoxicación a contaminantes (Engel, 1999).

La acción de las células cafés, constituye un mecanismo importante de protección ante la presencia del Cd, Las vesículas y células cafés poseen glutatión reductasa, fosfatasa ácida y lisozimas, lo cual ha indicado su origen lisosomal y se ha demostrado que, en las llamadas células cafés existen algunas más pequeñas que son más activas en la acumulación de metal que las células cafés grandes. Las células pequeñas contienen vesículas con lisosomas llamados “jóvenes” y las células cafés más grandes presentan forma de vesículas con grandes lisosomas “viejos”, menos activos ó cuerpos residuales (Zarogian y Yevich, 1994).

A pesar de que las lesiones persistieron en organismos sujetos a depuración, se observó un incremento de vesículas cafés de 32 observadas en organismos de campo a más de 60 en los organismos sujetos a desintoxicación. En la glándula digestiva de organismos intoxicados con cadmio se observó un incremento en el número de células cafés mecanismo activo en ostiones con menos de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de cadmio. En concentraciones mayores, la activación de este mecanismo de depuración puede verse limitado aumentando los efectos tóxicos de los metales. La toxicidad de los metales resulta de la unión no específica, que puede inactivar importantes enzimas regulatorias al desplazar iones metálicos esenciales de sus sitios catalíticos(Neff, 2002).

Las lesiones en la glándula digestiva, pueden deberse a un contacto prolongado con los contaminantes a través de la vía oral y la incapacidad de eliminación del agente estresante. El intestino y los túbulos de la glándula digestiva forman parte

de una de las principales vías de incorporación de tóxicos, por lo que, se considera que la activación de células cafés podría ser un mecanismo primario de defensa en estos órganos. En los organismos intoxicados con cadmio, se observó que en la región del manto y en la branquia pocas células cafés, posiblemente por ser un órgano externo más relacionado con el agua circundante se favorece la eliminación de estas con la corriente de agua.

La respuesta hemocítica fue mayor en organismos sometidos a la fase de desintoxicación (20%) con respecto a los ostiones de campo (10%). Una respuesta análoga se registró en los organismos intoxicados con cadmio evidenciando que, tanto las células cafés como los hemocitos, son respuestas celulares mediadas por la presencia de contaminantes (Guzmán-García, 2001).

En organismos intoxicados con cadmio y depurados, la activación de los hemocitos fue más notoria en los túbulos de la glándula digestiva, así como en el intestino. Éstos actúan como un mecanismo de defensa en los órganos internos análogo al de las células cafés. Otros autores han reportado un incremento en la densidad de hemocitos en el ostión *C. virginica* por exposición a cadmio, estos hemocitos pueden captar iones de cadmio de la hemolinfa que rodea los tejidos y transportarlo al lecho epitelial para ser eliminado del organismo (Fisher *et al.*, 2000).

La presencia de hemocitos fue una respuesta activada evidente en el esófago, la branquia, el manto y la glándula digestiva. Existen reportes que señalan el bloqueo de los canales de calcio por la acumulación de Cd en la branquia de *C. virginica* (Anderson *et al.*, 1997). Esto implicaría, que existe un límite fisiológico de captación de iones, que puede generar lesión y respuesta humoral. Posiblemente por ello, la branquia permaneció con una densidad de hemocitos constante a lo largo de las observaciones. Otros autores han demostrado que la concentración de los metales traza en *C. virginica* puede ser grande, pero la toxicidad llega a ser neutralizada por el contenido de metales en granulocitos (Okazaki, 1976, Zarogian y Morrison, 1981).

Se consideró que existen diferencias histopatológicas importantes entre los tejidos internos (el intestino y la glándula digestiva) y externos (el esófago, las branquias y el manto) de estos moluscos. Es posible que en los tejidos internos los iones de Cd se unan estrechamente a los grupos sulfhidrilo en láminas del mucus, en tanto que los tejidos externos se encuentran con el agua salina por lo que la depuración pasiva puede verse favorecida. La respuesta en los tejidos internos, sugiere que su principal función es el almacén y posteriormente la eliminación de metales traza a través de las células cafés, los hemocitos y el mucus.

En los organismos desintoxicados, la reparación se asumió como un proceso en donde las células destruidas fueron substituidas por nuevas células. Si el estrés desaparece a tiempo o, si la célula es capaz de soportar la agresión en la lesión celular, se restablece la integridad estructural y funcional completa (Rubin y Farber, 1990). Sin embargo, la eliminación de los niveles de metal no genera inmediatamente la salud tisular de los organismos, ya que los daños producidos eventualmente en ausencia del agente, requieren la activación de diferentes mecanismos de reparación.

La presencia de mucopolisacaridos de tipo ácido, podría sugerir una respuesta ante el daño generado; en tanto que los mucopolisacáridos de tipo neutro podrían actuar como mecanismos de defensa y reparación.

De manera análoga, la presencia de colágena en el tejido conectivo sugiere la activación de mecanismos de cicatrización. La utilización de inmunomarcadores corroboró la naturaleza de las respuestas, presencia de agentes reparadores, macrófagos y activación celular mediada.

La expresión de proteínas de peso molecular 70, 60 y 15 ha sido reportada por participar en procesos de exposición a agentes contaminantes (Hsp70), intervención como agentes reparadores y presencia de metalotioneínas (pm15)(Cruz-Rodriguez y Chu, 2002).

Es necesario ampliar este tipo de estudios con la evaluación de inmunomarcadores: actividad fagocítica, producción de especies oxígeno-reactivas (radicales libres) que provocan daño celular, densidad de hemocitos y la

relación del número y estabilidad lisosomal de las células cafés (Matthew *et al.*, 2002) de manera que se establezcan parámetros útiles en la evaluación de la inmunocompetencia celular-mediada en ostiones.

El estado histopatológico de los túbulos de la glándula digestiva y del intestino se asoció, de manera más clara, con los mecanismos de desintoxicación en el ostión *Crassostrea virginica*; por lo que la evaluación en la glándula digestiva es recomendable en los estudios de la fisiología y monitoreo ambiental.

La activación de mecanismos de desintoxicación a través de los macrófagos llamados células cafés y las células de la hemolinfa, disminuyó paulatinamente con el tiempo de depuración. Las células cafés se mantuvieron presentes hasta el final del periodo de depuración en forma de vesículas granuladas, constatando la unión del metal.

Diferentes mecanismos durante la desintoxicación, contribuyeron a la reparación de los tejidos epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva, sin embargo los cambios histopatológicos no fueron completamente reversibles en los tiempos probados; por lo que se sugiere en futuros estudios prolongar este tiempo para la evaluación de la recuperación de daños. Un comportamiento análogo fue determinado con pruebas de daño a nivel de DNA en donde fue cuantificado 100% de daño en células al inicio de la depuración y un descenso al 50 % en las últimas horas del experimento (Aguilar, A. Comunicación personal).

El uso de la herramienta histopatológica, permitió realizar el diagnóstico de daños y evidenció cambios importantes que facilitan la selección de inmunomarcadores en tejidos específicos, así como, plazos de experimentación adecuados para la interpretación de las respuestas biológicas. La evaluación de estas respuestas es necesaria para la evaluación del impacto de enfermedades en las pesquerías y puede ser usado como medida preventiva de riesgo de la salud pública por ingestión de bivalvos contaminados.

En resumen, el análisis realizado demostró lesiones en el recurso ostrícola derivado de agentes contaminantes en la Laguna de Mandinga y en consecuencia un deterioro en la calidad para su consumo. Por otro lado, la activación de

respuestas celulares, sugiere la recuperación de tejidos en ausencia de un agente estresor y que por lo tanto las poblaciones naturales pueden recuperarse en un ambiente limpio controlado. Es necesario continuar con la evaluación en laboratorio del proceso de desintoxicación y el análisis de la regeneración de tejidos.

Seria recomendable que empresas dedicadas a la extracción y comercialización de este recurso, habilitaran en los sistemas de depuración filtros para la absorción de metales y tiempos mayores que los utilizados en la actualidad, en donde solo se contempla la depuración de bacterias.

Las concentraciones de metales y los efectos de estos en los bivalvos, constituyen un indicador de riesgo por lo que es necesario un monitoreo frecuente y la aplicación de medidas que contribuyan a mejorar la calidad del sistema en estudio.

9. Conclusiones

- La concentración de metales en el ostión está determinada en mayor grado por las concentraciones encontradas en el sedimento, por lo que es importante incluir la determinación de metales en programas de monitoreo.
- La presencia de metales en ostión fue $Pb > Cd > Cr$.
- Los ostiones rebasan los LMP para cadmio y plomo con una alta incidencia en las muestras analizadas.
- El ostión de Mandinga, Ver., por sus contenidos de cadmio y plomo no cumple con la normatividad mexicana (D.O.F., 1995) que es más estricta que la consignada por la FDA.
- Los tiempos de desintoxicación de organismos de campo y laboratorio en concentraciones de metales menores de $20 \mu g g^{-1}$, demostraron que estos pueden ser parcialmente eliminados después de 15 días.
- El 47 % de los organismos colectados en campo, presentaron lesiones tisulares.

- La presencia de células cafés y hemocitos son respuestas celulares inducidas que participan en los procesos de desintoxicación.
- Mucopolisacáridos ácidos y neutros participan en las reacciones biológicas inducidas por metales pesados.
- La presencia de colágena es evidente en la fase de desintoxicación, por lo que puede participar en el proceso de reparación de tejidos.
- Líneas de hemocitos análogas a células B y T se manifiestan en el monitoreo de respuestas toxicológicas por metales pesados.
- La expresión de bandas específicas de proteínas corrobora la presencia de agentes estresantes en los organismos analizados.
- La histología generó respuestas específicas que facilitaron la utilización de biomarcadores.
- Es necesario continuar con estudios similares en las diferentes regiones de nuestro país, para generar una base de datos que permita la vigilancia del “estado de salud” de las lagunas en donde se cultivan estos moluscos.

10. Perspectivas

1.- El presente estudio aporta evidencias de los efectos de la contaminación en los organismos acuático, así como de los procesos de reparación de daño tisular. Sería deseable que los programas de manejo de la Laguna de Mandinga y de otros cuerpos de agua pudieran incluir pruebas histológicas acopladas con programas de análisis de imagen para la cuantificación de las lesiones.

2.- Las técnicas histopatológicas son recomendables en los estudios de monitoreo de la contaminación porque representan la integración de muchos procesos celulares y bioquímicas que son alterados en respuesta a los cambios ambientales. Representan una suma de respuestas no específicas que reflejan el deterioro ambiental antes del efecto a nivel poblacional o de comunidad.

3.- Es necesario que los datos que se generan en este tipo de investigaciones sean retomados por las Instituciones encargadas del manejo, uso y explotación de los recursos acuáticos en México. La vinculación de los sectores productivos, gubernamentales, de investigación y de la población son necesarios en los planes de manejo. Los programas deben incluir un seguimiento epidemiológico por consumo a fin de prevenir efectos generalizados en los consumidores de los recursos pesqueros.

4.- Consideramos que es viable mejorar la calidad de los ostiones y que sería de gran utilidad incrementando el tiempo de depuración en las plantas comercializadoras e implantar filtros que ayuden a la retención de metales, acoplado sistemas que permitan la obtención de semillas, para incrementar la producción.

5.- El ostión *C. virginica* es un buen modelo experimental para la investigación de los mecanismos de reparación de daño y cambios a nivel bioquímico. La determinación de respuestas Inmunocitoquímicas y de otras proteínas con técnicas en congelación es una línea de investigación que se requiere para el mejor aprovechamiento de los recursos (extracción de toxinas, alimento, fármacos etc.).

6.- Respuestas de tipo humoral y celular mediadas se ven inducidas por la presencia de contaminantes, sería interesante estudiar que contaminantes contribuyen al daño irreversible del sistema inmune y como afecta a la población.

7.- Es necesario implementar una serie de estudios similares en las diferentes lagunas del Golfo de México a fin de validar las técnicas de biomonitorio y generar un diagnóstico de nuestros recursos.

11. Referencias Bibliográficas.

- Agemian, H., Chau, A.S.Y. 1976. Evaluation of extraction techniques for determination of metals in aquatic sediments. *Analyst* 101: 761-767.
- Anderson, R.S., Brubacher, L.L., Calvo, L.M., Burreson, E.M., Unger, M.A. 1997. Effect of in vitro exposure to tributyltin on generation of oxygen metabolites by oyster hemocytes. *Environ Res* 74: 84-90.
- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H. 2005. Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10: 105-16.
- Barrera, E.G. 2006. Toxicidad del Cromo y Cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Mandinga, Ver. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp. 229
- Beninger, P.G., St-jean, S.D. 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. *Mar.Biol.* 129: 389-297.
- Boenisch, T.M.S., Farmilo, A., Stead, R., Key, M., Welcher, R., Harvey, R., Atwood, K. 2002. Manual de Métodos Histoquímicos de coloración. Dako corporation, Argentina.
- Boisson, F., Cotred, O., Fowler, S.W. 1998. Bioaccumulation and retention of lead in the mussel *Mytilus galloprovincialis* following uptake from seawater. *Sci Total Environ* 222: 55 - 61.
- Castrejón, O.L., Porras, D.D., Band, C.S. 1994. Cultivo de alimento vivo para la acuicultura. Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- CENICA-SEMARNAT-.PLANAME (2002). Plan Nacional Mexicano de biomonitorio para evaluar la contaminación. I Congreso de Ecotoxicología, UAMI, México, D.F.

- Chavin, W. 1973. Teleostean endocrine and paraendocrine alterations of utility in environmental studies., p.199 - 238. *In* Chavin, W. (ed. Responses of Fishes to Environmental Change. Thomas-Springfield, Chicago.
- Cheng, T.C. 1996. Hemocytes: Forms and Functions, p.299 - 364. *In* Kennedy, S.V., Newell, R.I. eds.) The Eastern Oysters *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, USA.
- Contreras-Espinoza, F., Catañeda-Lopez, O., Barba-Macias, E., M., P.-H. 2002. Caracterización e importancia de las lagunas costeras, p.31-43. *In* Guzmán, A.P., Quiroga, B.C., Diaz, L. C., Fuentes, C.D., Contreras, M.C. y G. Silva-Lopez (ed. La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. SAGARPA-UV.
- Cooms, T.L. 1974. The nature of zinc and copper complexes in the oyster *Ostrea edulis*. 28: 1 - 10.
- Cruz-Rodriguez, L.A., Baucum, A.J., Soudant, P., Chu, F.L., Hale, R.C. 2000. Effects of PCBs sorbed to algal paste and sediments on the stress protein response (HSP70 family) in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 50: 341-5.
- Cruz-Rodriguez, L.A., Chu, F.L. 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquat Toxicol* 60: 157-68.
- D.O.F. (1995). Diario Oficial de la Federación, Norma Oficial Mexicana, NOM-031-SSA-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos -refrigerados. Especificaciones sanitarias. México, D.F.: 4 - 25.
- D.O.F. (1997). Diario Oficial de la Federación, Norma Oficial Mexicana, NOM-001-ECOL-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México, D.F., SEMANARP-INE, Gaceta Ecologica: 82-93.

- Depledge, M.H., Bjerregaard, P. 1989. Explaining individual variation in trace metal concentration in selected marine invertebrates: the importance of interactions between physiological state and environmental factors, p.121 - 126. *In* JAPAGA (ed. Phenotypic responses and individuality in aquatic ecotherms, Ireland.
- Dondero, F., Dagnino, A., Jonsson, H., Capri, F., Gastaldi, L., Viarengo, A. 2006. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquat. Toxicol.* 78: S13-S24.
- Eble, F.A. 1996. The Circulatory System, p.271 - 296. *In* Kennedy, S.V., Newell, R.I. eds.) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, USA.
- Eble, F.A., Scro, R. 1996. General Anatomy, p.19 - 71. *In* Kennedy, S.V., Newell, R.I. eds.) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book, Maryland, USA.
- Eisler, R. 1972. Cadmium uptake by marine organisms. *Jour. Fish. Res. Board Can.* 29: 1367.
- Eisler, R. (1985). Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review biological report. Washington D.C., U.S. Dep. of the interior, fish and wildlife Service: 46.
- Engel, D.W. 1999. Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 47: 89-102.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1984. Ambient water quality criteria for cadmium. Washington, D.C. USA.
- Ewers, U., Schlikoter, H.W. 1991. Lead, p.971 - 1014. *In* E., M. (ed. *Metals and their compounds in the environment*. VCH Weinheim, New York.
- Farris, L.J., Van Hassel, H.J. 2007. *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. CRC Press, New York, USA.

- FDA (1993). Guidance documents for trace elements in seafood. Guidance documents for arsenic, cadmium, chromium, nickel (January), lead (August).
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R. 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat Toxicol* 51: 115-38.
- Frazier, J.M. 1979. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Environ Health Perspect* 28: 75-9.
- Gabrieldes, G. (1997). The MED POL Biomonitoring program concerning the effects of pollutants on marine organisms along the Mediterranean coast. Athens, UNEP (OCA)/MED W.G.: 132/3.
- García, M.E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, México, D.F.
- Gauhlhofer, J., Bianchini, V. 1991. Chromium, p.854 - 876. *In* Merian, E. (ed. Metals and their compounds in the environment. VCH Weinheim.
- George, S.G., Carpene, E., Coombs, T.L., Overnell, J., Youngson, A. 1979. Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L), exposed to cadmium. *Biochim Biophys Acta* 580: 225-33.
- Goldberg, E.D., Bertine, K.K. 2000. Beyond the Mussel Watch--new directions for monitoring marine pollution. *Sci Total Environ* 247: 165-74.
- Gold-Bouchot, G., Zavala-Coral, M., Zapata-Perez, O., Ceja-Moreno, V. 1997. Hydrocarbon concentrations in oysters (*Crassostrea virginica*) and recent sediments from three coastal lagoons in Tabasco, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 59: 430-437.
- Greig, R.A., Wenzloff, D.R. 1978. Metal accumulation and depuration by American oyster, *Crassostrea virginica*. *Bull Environ Contam Toxicol* 20: 499-504.

- Guzmán, A.P. 2004. Contaminación por metales pesados en ostión de las lagunas de Alvarado, Mandinga y Tamiahua, Ver. M. en C. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 122
- Guzmán, A.P., Villanueva, F.S., Botello, A.V. 2005. Metales en tres lagunas costeras del estado de Veracruz, p.361-372. *In* Botello, A.V., Osten, J.R.v., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández eds.) Golfo de México contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, centro EPOMEX, México, D.F..
- Guzmán-García, X. 2001. Toxicocinética de Cadmio y daño histopatológico en ostión *Crassostrea virginica* en condiciones de ayuno y alimentación. Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp. 65
- Hernández, V.E. 1996. Estudio de metales tóxicos y esenciales, su biodisponibilidad en sedimentos y organismos en la Laguna de Mandinga, Veracruz, México. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. pp. 45
- Hetzel, E.W., Wright, D.A. 1983. The use of RNA DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Estuaries* 6: 259-259.
- IAEA/UNEP/FAO/IOC. 1984. Determination of total cadmium, zinc, lead and copper in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. International Atomic Energy Agency.
- Kennedy, S.V., Newell, R.I. 1996. The Eastern Oyster. Maryland Sea Grant College.
- Koeman, H.J. 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comp Biochem Physiol A* 100C: 7 - 10.
- Lacerda, L.D., Pfeiffer, W.C., Fizman, M. 1987. Heavy metal distribution, fate and availability in Sepetiba Bay, SE, Brazil. *The Sci. Total Environ.* 65: 163 -173.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the essembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.

- Lakshmanan, P.T., Nambisan, P.N. 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). Bull Environ Contam Toxicol 43: 131-8.
- Long, E.R., Macdonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. Environ Manage 19: 81-97.
- Lowe, O.M., Moore, M.N., Clarke, K.R. 1981. Effects at oil and digestive cells in mussels quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat Toxicol 1: 213-226.
- Luna, M., Rendón, V.O., Alpuche, L.G. 2002. Presencia de plomo en agua y ostión en las lagunas de Alvarado y la Mancha., p.96 – 111. In Guzmán, A.P., Quiroga, B.C., Díaz, L.C., Fuentes, C.D., Contreras, M.C., Silva López, G. eds.) La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. SAGARPA-UV.
- Luoma, S.N. (1986). Cycling of lead into food webs in aquatic environments. Ottawa, Ontario, Canada, Report of the commission on lead in the environment . Royal Society of Canada: 146 - 161.
- Malo, B.A. 1977. Partial extraction of metals from aquatic sediments. Environ Sci Technol 11: 277-282.
- Marygomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metal in molluscs. Microsc. Res. Tech. 56: 358 - 392.
- Matthew, J.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W., Chapman, R.W. 2002. Potencial indicators of stress response Identified by expressed sequencetag analysis of hemocytes and embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. Mar Biotechnol (NY) 4: 82-93.

- McCarthy, J.F., Shugart, L.R. 1990. Biological markers of environmental contamination, p.3 - 16. *In* McCarthy, J.F., Shugart, L.R. eds.) Biomarkers of environmental contamination. Lewis, Boca Raton, Fl..
- Moreno, G.M.D. 2003. Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw-Hill/interamericana de España, España.
- Narbonne, J.F., Aarab, N., Clerandeu, C., Daubeze, M., Narbonne, J., Champeau, O., Garrigues, P. 2005. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers* 10: 58-71.
- Neff, M.J. 2002. Bioaccumulations in marine organisms. Elseviers Science, Oxford, UK.
- Nelson, B.W., Heinz, g.h., Redman-Norwood, A. 1996. Environmental contaminants in wildlife, interpreting tissue concentrations. Lewis Publisher, New York, USA.
- NOAA (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusks, Technical memorandum NMFS-F/ NEC-25: 97.
- Okazaki, R.K. 1976. Copper toxicity in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Bull Environ Contam Toxicol* 16: 658-64.
- Ortiz, J.B. 1999. Cuantificación y alteraciones histopatológicas producidas por concentraciones subletales de cobre en *Fundulus heteroclitus*. *Ciencias Mar.* 25 (1): 119- 143.
- OSTIMEX (1996). Síntesis conceptual en materia de impacto ambiental para el trámite de una concesión de cultivo de ostión de alto rendimiento en la Laguna de Mandinga, Ver. México, OSTIMEX, S.A. de C.V.
- Paez-Osuna, F., Osuna-Lopez, J.I., Izaguirre-Fierro, G., Zazueta-Padilla, H.M. 1993. Heavy metals in oysters from a subtropical coastal lagoon associated with an agricultural drainage basin. *Bull Environ Contam Toxicol* 50: 696-702.

- Palacios Fest, M., Vargas Rangel, R. 2002. Pesquería de ostión, p.96 – 111. *In* Guzmán, A.P., Quiroga, B.C., Díaz, L.C., Fuentes, C.D., Contreras, M.C., Silva López, G. eds.) La pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo. SAGARPA-UV.
- Palmer, S.J., Presley, B.J., Taylor, R.J., Powell, E.N. 1993. Field studies using the oyster *Crassostrea virginica* to determine mercury accumulation and depuration rates. *Bull Environ Contam Toxicol* 51: 464-70.
- Peakall, D.W. 1994. Biomarkers: The way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1: 55 - 60.
- Pringle, B., Shuster, C. 1977. A Guide to trace metal level in Shellfish, p.967 - 987. *In* 6th National Shellfish Sanitation Workshop.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., Depledge, M.H. 1990. The significance of trace-metal concentrations in marine-invertebrates - a need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar Pollut Bull* 21: 321-324.
- Rand, G., Petrocelli, S. 1985. *Fundamentals of Aquatic toxicology*. Hemisphere publishing Corporation, USA.
- Rebelo, M.F., Pfeiffer, W.C., da Silva, H., Jr., Moraes, M.O. 2003. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Aquat Toxicol* 64: 359-62.
- Reguero, R.M.M. 1994. Estructura de la comunidad de moluscos en las lagunas de Veracruz y Tabasco, México e. Doctorado. UNAM. pp. 280
- Ringwood, A.H., Connors, D.E. 2000. The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 50: 207-11.
- Roesijadi, G., Brubacher, L.L., Unger, M.E., Anderson, R.S. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118: 171-6.

- Rosas, P., Baez, A., Belmont, R. 1983. Oyster (*Crassostrea virginica*) as indicator of heavy metals pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. *Water Air and Soil Pollution* 70: 127-135.
- Rubin, E., Farber, J.L. 1990. *Patología México*, D.F.
- Ryan, J.A., Hightwer, L.E. 1996. Stress protein as molecular biomarkers for environmental toxicology, p.492. *In* Feige U., R.I.M., I. Yahara y B. Polla (ed. *Stress-Inducible Cellular Response*, Birkhauser Verlag Basel/ Switzerland. Germany.
- SAGARPA (2000). Anuario Estadístico de Pesca. Dirección General de Política y Fomento Pesquero y Dirección de comunicación Social. México, D.F., SAGARPA: 271.
- Salazar, M.H., Salazar, S.M. 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Mar. Environ. Res.* 32: 131 -150.
- Sanders, J.G., Abbe, G.R., Riedel, G.F. 1990. Silver uptake and subsequent effects on growth and species composition in an estuarine community. *Sci Total Environ* 97-98: 761-9.
- SEPESCA-Secretaría de Pesca. 1988. Manual Técnico para la operación de centros acuícola productores de ostión. SEPESCA, México.
- Shumway, S.E., Koehn, R.K. 1982. Oxygen-consumption in the american oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Ecol-Prog Ser* 9: 59-68.
- Sobrino, F.A.S. 2001. Efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas en la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842) (Bivalvia, Pectinidae). Doctorado en Ciencias Marinas. Centro interdisciplinario de ciencias marinas, IPN. México. pp. 180
- Spacie, J., Hamelinnk, L. 1985. Bioaccumulation, Rand, G., Petrocelli, S. eds.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA..

- UNEP (1985). United Nations Environment Programme, Regional seas: GESAMP: cadmium, lead and tin in the marine environment. UNEP, Paris, UNEP regional Seas Report and Studies. **56**: 22:1 - 62.
- UNESCO (1996). Guide to operational procedures for the IGOS pilot project on marine pollution (petroleum), UNESCO.
- Villanueva, S.F., Botello, A.V. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Rev Environ Contam Toxicol* 157: 53-94.
- Wallner-Kersanach, M., Theede, H., Eversberg, U., Lobo, S. 2000. Accumulation and elimination of trace metals in a transplantation experiment with *Crassostrea rhizophorae*. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 40-5.
- Walsh, A.R., O'Halloran, J. 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. *Environ Toxicol Chem* 17: 1429 - 1438.
- Werner, I. 2004. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar Environ Res* 58: 803-7.
- Werner, I., Teh, S.J., Datta, S., Lu, X., Young, T.M. 2004. Biomarker responses in *Macoma nasuta* (Bivalvia) exposed to sediments from northern San Francisco Bay. *Mar Environ Res* 58: 299-304.
- Winstead, J.T. 1998. A histological study of digestive tubules in intertidal and subtidal oysters, *Crassostrea virginica*, collected at high and low tides. *J Shellfish Res* 17: 275-279.
- Zaroogian, G., Yevich, P. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res* 37: 355-373.
- Zaroogian, G.E. 1979. Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster *Crassostrea virginica*. *Bull Environ Contam Toxicol* 23: 117-22.

Zaroogian, G.E., Morrison, G. 1981. Effect of cadmium body burdens in adult *Crassostrea virginica* on fecundity and viability of larvae. Bull Environ Contam Toxicol 27: 344-8.

Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea virginica* por exposición y depuración al cadmio

Tissue changes of the oyster *Crassostrea virginica* due to cadmium exposition and depuration

Xochitl Guzmán-García¹, Alejandro Martínez-López¹,
Lizan Rodríguez-Medina¹, Humberto González-Márquez²
y Alfonso Vázquez-Botello³

¹Alumna del Doctorado en Biología Experimental. Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Hidrobiología. UAM-I. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina Iztapalapa, C.P. 09340. México, D. F. Tel. (55) 5804 64 74 Fax (55) 5804 4738 xgg@xanum.uam.mx

²Laboratorio de Expresión Génica. Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I.

³Laboratorio de Contaminación Marina, ICMyL, UNAM.

Guzmán-García X., A. Martínez-López, L. Rodríguez-Medina, H. González-Márquez y A. Vázquez-Botello, 2007. Cambios tisulares en el ostión *Crassostrea virginica* por exposición y depuración al cadmio. *Hidrobiológica* 17 (1 Suplemento): 41-48.

RESUMEN

Los niveles de cadmio se han incrementado en el Golfo de México, esto representa un riesgo potencial para la sobrevivencia del ostión *Crassostrea virginica* y sus consumidores, por lo que es importante evaluar los efectos del cadmio a través de los cambios histopatológicos derivados de la exposición a este metal y durante su depuración. Se analizaron ostiones expuestos a 100 µg/l de cadmio por 72 h y depurados por 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 230 h. Las muestras de ostión fueron incluidas en parafina, cortadas en microtomo y teñidas con la técnica de Hematoxilina-Eosina. El análisis histopatológico del esófago, intestino, glándula digestiva, branquia y manto mostró lesiones inflamatorias y la activación celular que incluye, células café y hemocitos como un mecanismo de desintoxicación. Los tejidos conjuntivos cercanos a esófago, intestino y glándula digestiva presentaron más células café y hemocitos que la branquia y el manto. Los cambios histopatológicos no fueron reversibles en 230 h, a pesar de que hay recuperación de los epitelios de la glándula digestiva. Este trabajo recomienda la evaluación histopatológica en la glándula digestiva para determinar el estado fisiológico del ostión y tomar medidas preventivas en la comercialización y cultivo de sus poblaciones naturales.

Palabras clave: Ostión, *Crassostrea virginica*, cadmio, histopatológico.

ABSTRACT

Cadmium levels had increased in the Gulf of Mexico, this represents a potential risk for the survival of oyster *Crassostrea virginica* and for those who eat them, so it is important to evaluate the effects of cadmium through histopathological changes derived from the exposition to this metal and during its depuration. Oysters exposed to 100 µg/l of cadmium for 72 h and depurated by 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, and 230 h were analyzed. Samples of oysters were included in paraffin, cutted in a microtome and stained following the Hematoxilin-Eosin technique. Histopathological analysis of oesophagus, intestine, digestive diverticulum, gills and mantle, showed inflammatory lesions and cell activation, including brown cells and haemocytes as a detoxification mechanism. The conjunctive tissue next to oesophagus, intestine and digestive diverticulum presented more brown cells and haemocytes than gills and mantle. Histopathological damage was not reversible in 230 h, although there was a recovery in epitheliums of digestive diverticulum. This work recommends the histopathological evaluation of digestive diverticulum to

determine the physiological state of oysters and to take preventive measures in the commercialization and culture of their natural populations.

Key works: Oyster, *Crassostrea virginica*, cadmium, histopathological.

INTRODUCCIÓN

El uso industrial de los metales ha provocado que la movilización antropogénica, en algunos casos, sea mayor que la natural, siendo el aporte antropogénico el que más daño ecológico causa (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1991). Los estudios de la contaminación por metales pesados en el medio ambiente marino tienen el propósito de proteger los ecosistemas marinos costeros, en general, y la salud humana, en particular. Con este fin, se ha propuesto el empleo de organismos centinelas como organismos biológicos indicadores de la contaminación por metales pesados en el medio marino.

Los moluscos bivalvos, tales como las ostras, juegan un papel ecológico importante en los sistemas acuáticos. La filtración e ingestión que realiza de materia particulada suspendida (algas y sedimentos) de la columna de agua remueve contaminantes asociados con la materia suspendida. Las ostras son organismos sésiles incapaces de evadir condiciones desfavorables, se alimentan por filtración y se conoce que bioacumulan contaminantes como el cadmio (Cd), permitiendo el diseño de experimentos para estimar la cinética de bioacumulación y trasplante en el laboratorio (Cruz-Rodríguez & Fu-Lin, 2002; Frías-Espericueta *et al.*, 1999).

La bioacumulación de metales en bivalvos depende de las propiedades físico-químicas de los elementos en cuestión, así como de las necesidades metabólicas de los organismos y la disponibilidad de éstos en la columna de agua y/o alimentos (Frías-Espericueta *et al.*, 1999).

El Cd es un elemento estable que no se degrada en el ambiente, es considerado como uno de los más tóxicos para un gran número de organismos marinos, siendo acumulado por los bivalvos en proporciones que en algunos casos, pueden constituir un serio peligro si son destinados a la alimentación humana (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1991; Establier *et al.*, 1978; Fisher *et al.*, 2000).

En México la legislación establece 0.1 mg/l de Cd como Límite Máximo Permitido (LMP) en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (Diario Oficial de la Federación, 1997). Sin embargo, Villanueva & Botello (1998) han reportado concentraciones de Cd mayores al LMP en varias lagunas del Golfo de México, así como concentraciones en el ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) que superan los 2 µg/gps, recomendados para consumo humano.

El ostión *Crassostrea virginica* corresponde a una de las especies estuarinas explotadas con mayor intensidad en las costas mexicanas del Golfo de México, habita en aguas salobres, lagunas y esteros, tiene una amplia distribución y es una especie comercialmente valiosa (Rogers & García-Cubas, 1981; Frías-Espericueta *et al.*, 1999). En el siglo pasado ocurrió la mayor declinación de poblaciones naturales por una variedad de causas incluyendo la sobreexplotación, el daño del hábitat, la degradación de la calidad de agua y el incremento en la susceptibilidad a enfermedades (Matthew *et al.*, 2002).

Engel (1999), sugiere que el ostión *C. virginica* utiliza diferentes estrategias metabólicas en la captación o acumulación de metales. Diversos estudios señalan la bioconcentración de Cd en estudios de laboratorio (Zarogian & Morris, 1981); sin embargo, la cuantificación de los contaminantes subestima el estado fisiológico de los organismos, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar los cambios histopatológicos durante la fase de desintoxicación en el ostión *Crassostrea virginica* expuesto a concentraciones subletales de Cd.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 66 muestras del ostión *Crassostrea virginica*, procedentes de un bioensayo con exposición subletal a 100 µg/l de Cd y sus respectivos testigos. El bioensayo se realizó en dispositivos experimentales de 40 l. La fase de intoxicación tuvo una duración de 72 h y la fase de desintoxicación fue de 240 h con muestreos de 3 organismos a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 230 h. Los ostiones fueron fijados con formol al 10 %, posteriormente se deshidrataron, aclararon e infiltraron en un procesador de tejidos automático modelo LEICA TP 1020. La inclusión del tejido se realizó en parafina con puntos de fusión de 49 - 51° y de 58 - 60 °C utilizando el centro de inclusión modelo LEICA EG 1140 H y LEICA EG 1140 C para la obtención de los bloques. Posteriormente se hicieron 3 cortes seriados de 5-7 µm de grosor con un micrótopo modelo HM 315. Los cortes fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) y revisados en microscopio óptico. Se trabajó el esófago, el intestino, la glándula digestiva, las branquias y el manto. Para evaluar la fase de desintoxicación se utilizó como parámetro de clasificación el número de las células café (llamadas así, porque contienen vesículas con tinción café en el citoplasma; Zarogian & Yevich,

1994) y hemocitos presentes en los tejidos. Se determinó el número de células cafés realizando un conteo en 6 campos a 100X, por corte y en sus réplicas (3). Un total de 18 campos fueron revisados para cada tejido y se obtuvo en ellos el promedio de células cafés.

La densidad de hemocitos se utilizó para la evaluación cualitativa, ésta fue clasificada en 4 categorías:

1 = hemocitos en tejido conjuntivo periférico al órgano.

2 = hemocitos con infiltración baja en el órgano.

3 = hemocitos con infiltración moderada en el órgano.

4 = hemocitos con infiltración elevada, no se distinguen límites entre tejidos.

Se graficaron el número de células cafés y la categoría de hemocitos presentes en el tejido conjuntivo adyacente a esófago, intestino, glándula digestiva, branquia y manto desde la intoxicación (72 h) hasta el final del periodo de desintoxicación (230 h).

RESULTADOS

El análisis histopatológico de ejemplares de *Crassostrea virginica* expuestos a Cd, evidenció respuestas inflamatorias, degeneración de cilios en el intestino, daño en los epitelios de los túbulos de la glándula digestiva, basofilia e hialinización. En el esófago de los ostiones se observó tinción basófila en el epitelio de los palpos e incluso algunas secreciones posiblemente mucosas (Fig.1A). En esta misma estructura, el tejido conjuntivo presentó pigmentos cafés llamados en estos organismos células cafés durante la fase de depuración (Fig.1a). En el intestino de los organismos intoxicados se observó la degeneración de los cilios en la parte luminal del epitelio que lo recubre (Fig.1B). Los organismos de la fase de depuración presentaron edemas, ruptura del epitelio y presencia de células cafés en el tejido conjuntivo que rodea el intestino (Fig.1b).

Los epitelios que revisten la luz de los túbulos de la glándula digestiva prácticamente desaparecieron y sufrieron deformación (Fig.1C). Sin embargo, al final del periodo de depuración se observó la recuperación de la apariencia ciliada (Fig. 1c).

Las laminillas branquiales presentaron en la porción apical tinción basófila (Fig.2A) muy probablemente por la presencia de hemocitos como una reacción de defensa ante la presencia de Cd (Fig.2a). En el manto la respuesta fue similar, el lóbulo sensorial externo presentó tinción basófila, en tanto que en la fase de depuración el manto mostró aspecto hialino (Fig. 2B, b).

Algunas respuestas celulares inducidas se manifestaron a través de la presencia de células cafés y hemocitos (Fig. 3A y

3B respectivamente). En el tejido conjuntivo de los organismos expuestos a Cd, se observaron las células cafés, en tonalidades de marrón a café claro con la tinción H-E (Fig. 3 A, a). Células cafés con diferente tamaño (1 a 5 μ m) se observaron también en los canales de hemolinfa. Las células cafés de mayor tamaño presentaron forma de vesícula y tuvieron apariencia granular en el interior. Éstas se cuantificaron en el esófago, intestino, túbulos de la glándula digestiva y el manto (Fig. 4).

En el tejido conjuntivo, entre el intestino y los túbulos de la glándula digestiva, se observaron hasta 35% más células cafés que en el esófago y el manto. El mayor número de células cafés se registraron a las 96 h de depuración en el intestino (Fig. 4B), en tanto que la mayor incidencia de estas células en los túbulos de la glándula digestiva se presentó a las 144 h (Fig. 4C). Posteriormente a estos plazos prevaleció una tendencia hacia la disminución del número de células cafés. En las últimas horas de la fase de desintoxicación el número de células cafés fue similar en los organismos testigo, sin embargo la apariencia granulada de las vesículas cafés en organismos intoxicados, sugiere la captación de material, es decir, de Cd.

Los ostiones presentaron una respuesta hemocítica, como se muestra en la Fig. 3 (B,b) paralela al incremento en el número de células cafés, como respuesta a la inflamación aguda. Los hemocitos, posiblemente granulocitos por su actividad protectora, se presentaron en esófago, intestino, glándula digestiva, branquia y manto. La densidad de hemocitos fue mayor en el tejido cercano al intestino y las branquias con respecto al esófago, túbulos de la glándula digestiva y el manto. Este mecanismo de defensa fue evidente desde las 24 horas de la fase de desintoxicación y disminuyó su densidad a las 230 h (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Las alteraciones en la anatomía y en la función de los organismos analizados se relacionaron con diferentes reacciones histopatológicas, entre las que destaca la inflamación. La inflamación es una reacción de los tejidos a diferentes formas de lesión y entraña respuestas vasculares, neurológicas, humorales y celulares en el foco que sufre daño (Rubin & Farber, 1990).

La célula expuesta a una agresión subletal persistente tiene un repertorio limitado de respuestas (como son la producción de células cafés y los hemocitos en el caso del ostión), cuya expresión se interpreta como evidencia de lesión celular. Zaroogian & Yevich (1994) han señalado que la actividad de las células cafés de *C. virginica* se relaciona con el proceso de incorporación, acumulación, desintoxicación y degradación de material extraño de la hemolinfa y que aparecen conjuntamente con amebocitos, los cuales fagocitan partículas y envuelven solutos, mientras

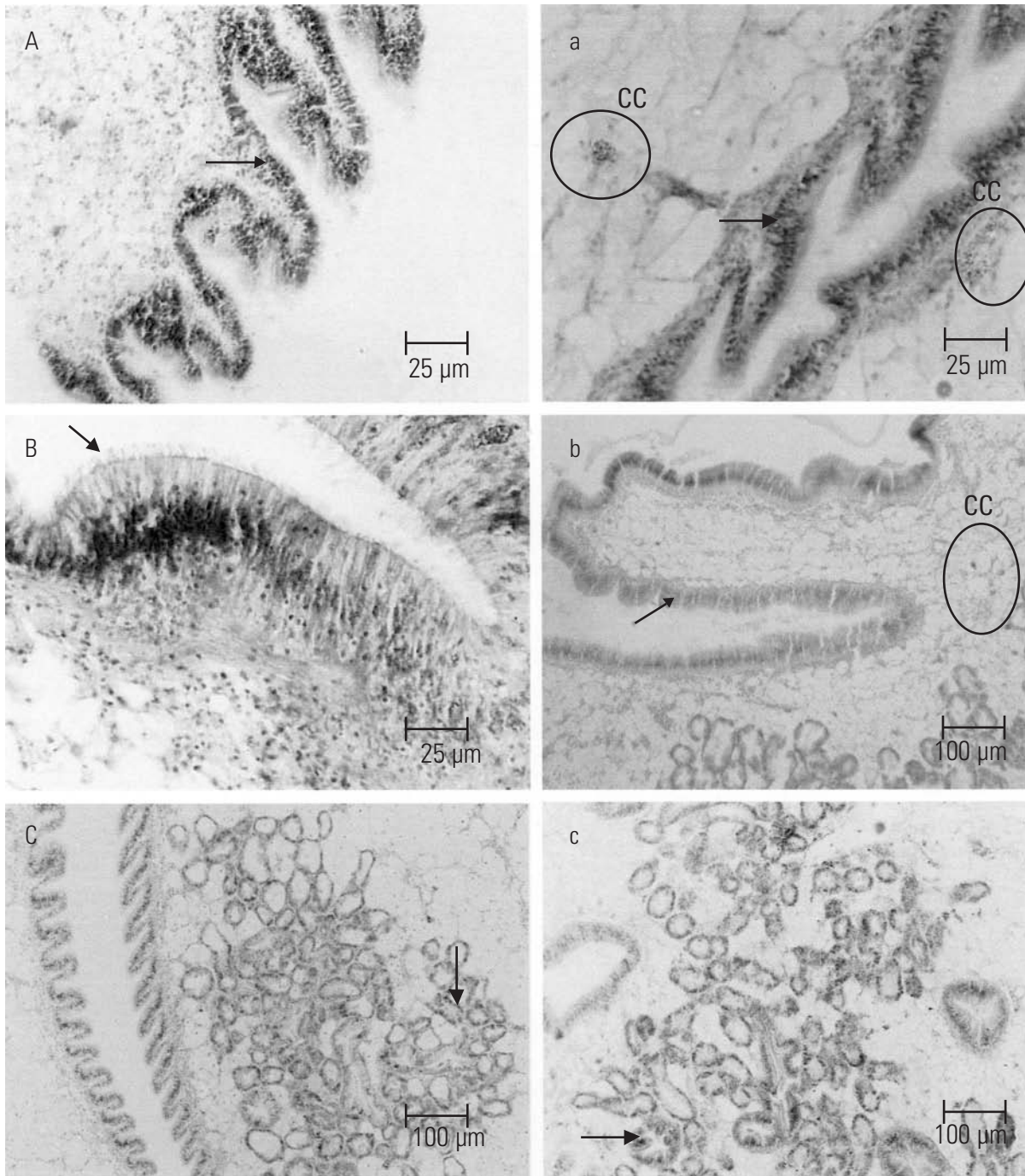


Figura 1. Tejidos del ostión *Crassostrea virginica* durante la exposición a cadmio (izquierda) y durante la fase de desintoxicación (derecha). En el esófago (A, a) se observa tinción basófila (→) en los epitelios; en el intestino (B, b) se observa un aspecto degenerativo del epitelio que lo recubre (→); en la glándula digestiva (C, c) se advierte edema (→); dentro del tejido conjuntivo se observan algunas células cafés (CC). Tinción H-E.

que las células cafés embeben solutos eficientemente como un mecanismo de defensa.

Los resultados de este trabajo señalan que se presentó un incremento de células cafés y hemocitos en los ostiones intoxicados con respecto a los testigos. Esto evidencia que, tanto las

células cafés como los hemocitos participan en la desintoxicación de Cd en los tejidos de *C. virginica*.

El intestino y los túbulos de la glándula digestiva forman parte de una de las principales vías de incorporación de tóxicos, por lo que, se considera que la activación de células cafés podría

ser un mecanismo primario de defensa en estos órganos. En la región del manto y en la branquia se observaron pocas células café, posiblemente por ser un órgano externo más relacionado con el agua circundante se favorece la eliminación de estas células.

En los organismos desintoxicados, la reparación se asumió como un proceso en donde las células destruidas fueron substituidas por nuevas células. Si el estrés desaparece a tiempo o, si la célula es capaz de soportar la agresión en la lesión celular, se restablece la integridad estructural y funcional completa (Rubin & Farber, 1990). La acción de las células café constituye un mecanismo importante de protección ante la presencia del Cd. Zaroogian y Yevich (1994) han demostrado que, en las llamadas células café existen algunas más pequeñas que son más activas en la acumulación de metal que las células café grandes, las células pequeñas contienen vesículas con lisosomas llamados "jóvenes" y las células café más grandes presentan forma de vesículas con grandes lisosomas "viejos", menos activos ó cuerpos residuales.

La activación de los hemocitos fue más notoria en los túbulos de la glándula digestiva, así como en el intestino. Éstos actúan como un mecanismo de defensa en los órganos internos análogo al de las células café. Otros autores han reportado un incremento en la densidad de hemocitos en el ostión *C. virginica* por exposición a Cd, estos hemocitos pueden captar iones de Cd de la hemolinfa que rodea los tejidos y transportarlo al lecho epitelial para ser eliminado del organismo (Fisher *et al.*, 2000).

La presencia de hemocitos fue una respuesta claramente activada evidente en el esófago, la branquia, el manto y la glándula digestiva. Existen reportes que señalan el bloqueo de los canales de calcio por la acumulación de Cd en la branquia de *C. virginica* (Roesijadi & Unger 1993), esto implicaría que existe un límite fisiológico de captación de iones, que puede generar lesión y respuesta humoral. Posiblemente por ello la branquia permaneció con una densidad de hemocitos constante a lo largo de las observaciones. Otros autores han demostrado que la concentración de los metales traza en *C. virginica* puede ser

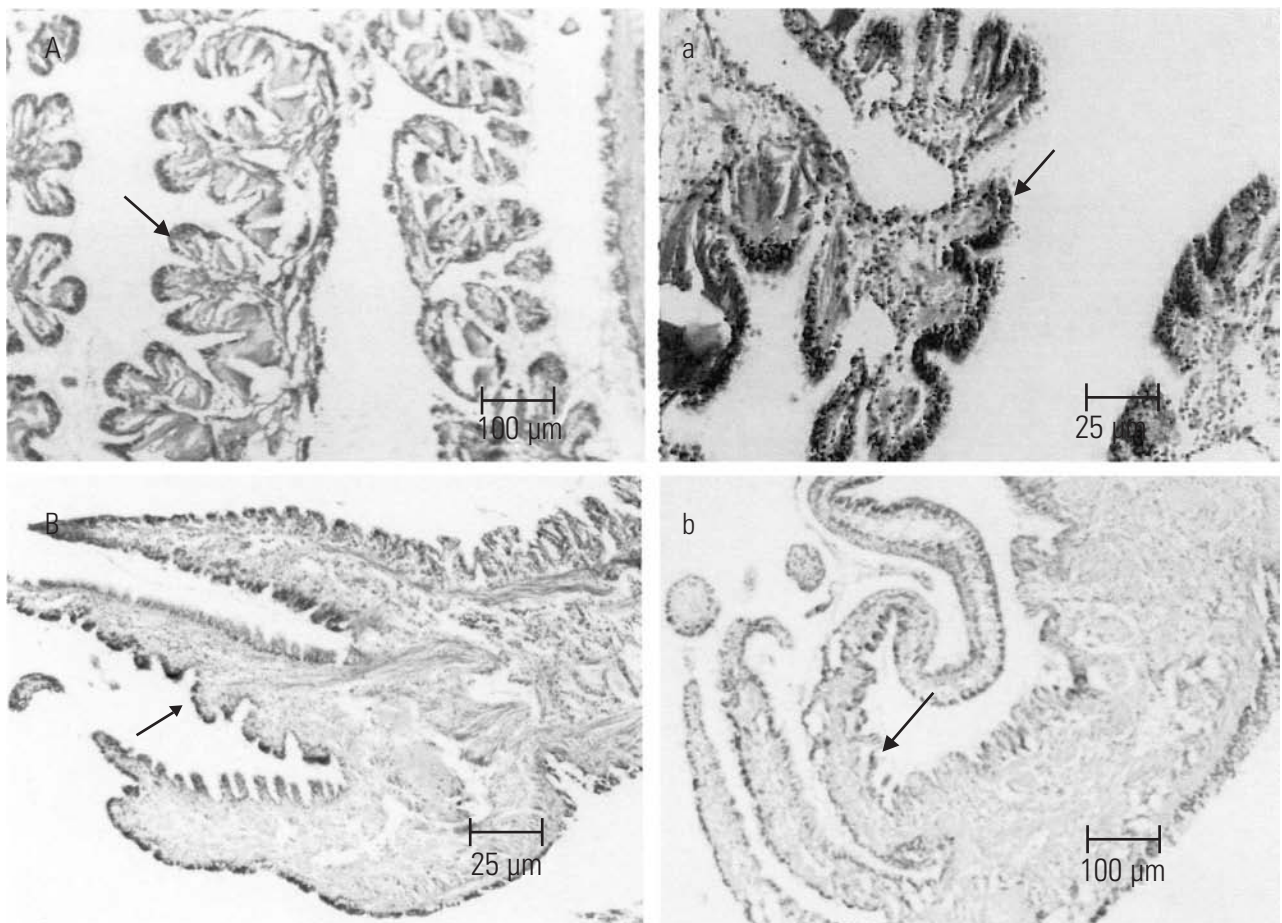


Figura 2. Tejido branquial y del manto del ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) la branquia muestra (→) basofilia en el epitelio de la región apical; B, b) aspecto de los lóbulos sensitivos del manto en b) el aspecto es más hialino (→). Tinción

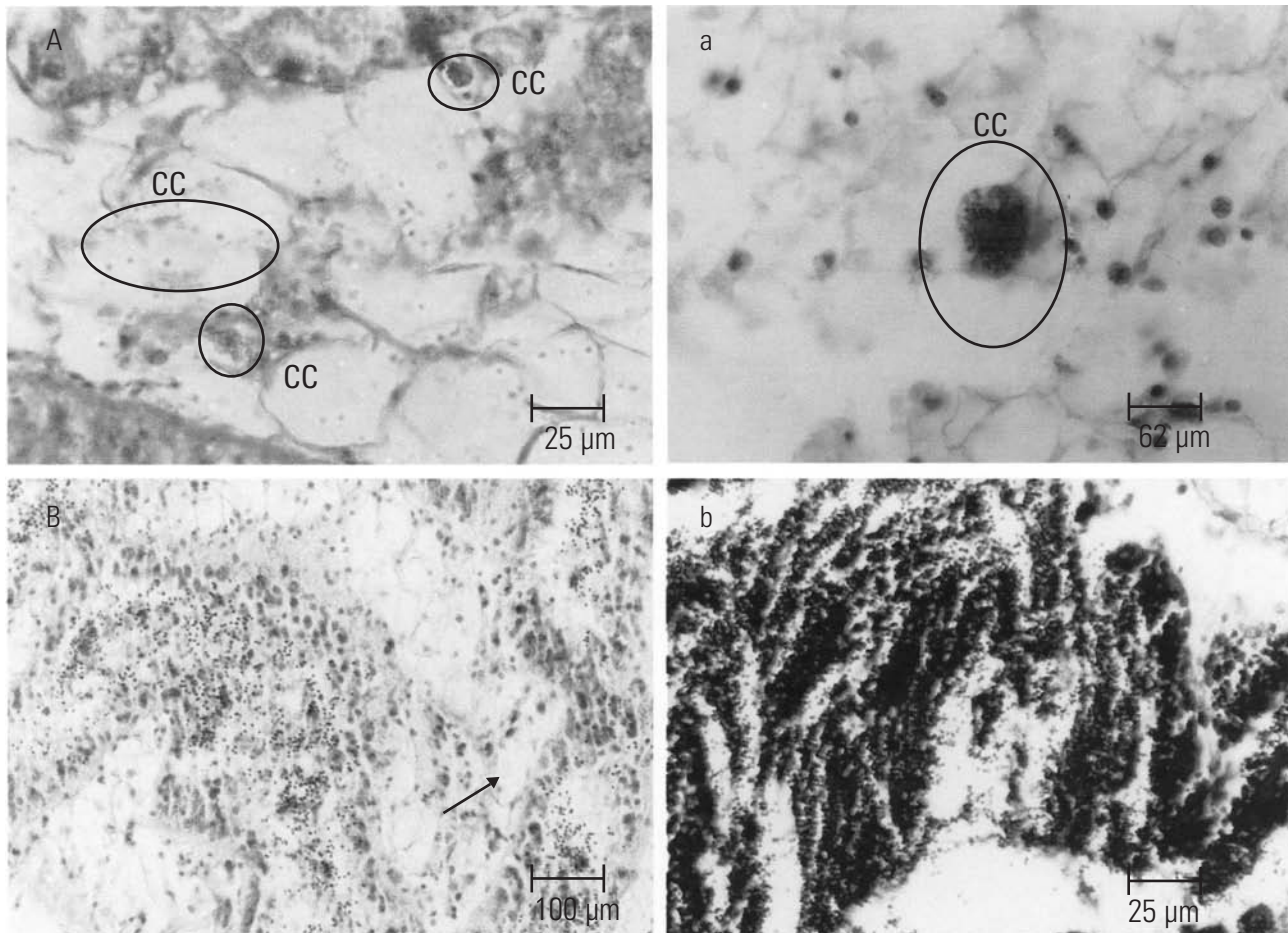


Figura 3. Glándula digestiva en el ostión *Crassostrea virginica* expuestos a cadmio (izquierda) y desintoxicados (derecha). En A, a) diferentes tipos celulares y células café en el canal de hemolinfa (→); B, b) hemocitos en el tejido conjuntivo, aparente migración e incremento (→). Tinción H-E.

grande, pero la toxicidad llega a ser neutralizada por el contenido de metales en granulocitos (Okazaki & Panietz, 1981; Zaroogian & Morris, 1981).

Se consideró que existen diferencias histopatológicas importantes entre los tejidos internos (el intestino y la glándula digestiva) y externos (el esófago, las branquias y el manto) de estos moluscos. Es posible que en los tejidos internos los iones de Cd se unan estrechamente a los grupos sulfhidrilo en láminas del mucus, en tanto que los tejidos externos se encuentran con el agua marina por lo que la depuración pasiva puede verse favorecida. La respuesta en los tejidos internos sugiere que su principal función es el almacén y, posteriormente la eliminación de metales traza a través de las células café, los hemocitos y el mucus. Es necesario ampliar este tipo de estudios con la evaluación de inmunomarcadores: actividad fagocítica, producción de especies oxígeno-reactivas (radicales libres) que provocan daño celular, densidad de hemocitos y la relación del número y estabilidad lisosomal de las células café (Matthew et al., 2002) de manera que se establezcan parámetros útiles

en la evaluación de la inmunocompetencia celular-mediada en ostiones.

El estado histopatológico de los túbulos de la glándula digestiva y del intestino resultante de la exposición a Cd se asoció, de manera más clara, con los mecanismos de desintoxicación en el ostión *Crassostrea virginica* por lo que la evaluación en la glándula digestiva es recomendable en los estudios de la fisiología y monitoreo ambiental. La activación de mecanismos de desintoxicación a través de los macrófagos llamados células café y las células de la hemolinfa, disminuyó paulatinamente con el tiempo de depuración. Las células café se mantuvieron presentes hasta el final del periodo de depuración en forma de vesículas granuladas, constatando la unión del metal. Diferentes mecanismos de desintoxicación contribuyeron a la reparación de los tejidos epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva, sin embargo los cambios histopatológicos no fueron reversibles completamente en 230 h de depuración, por lo que se sugiere en futuros estudios prolongar este tiempo para la evaluación de la recuperación de daños.

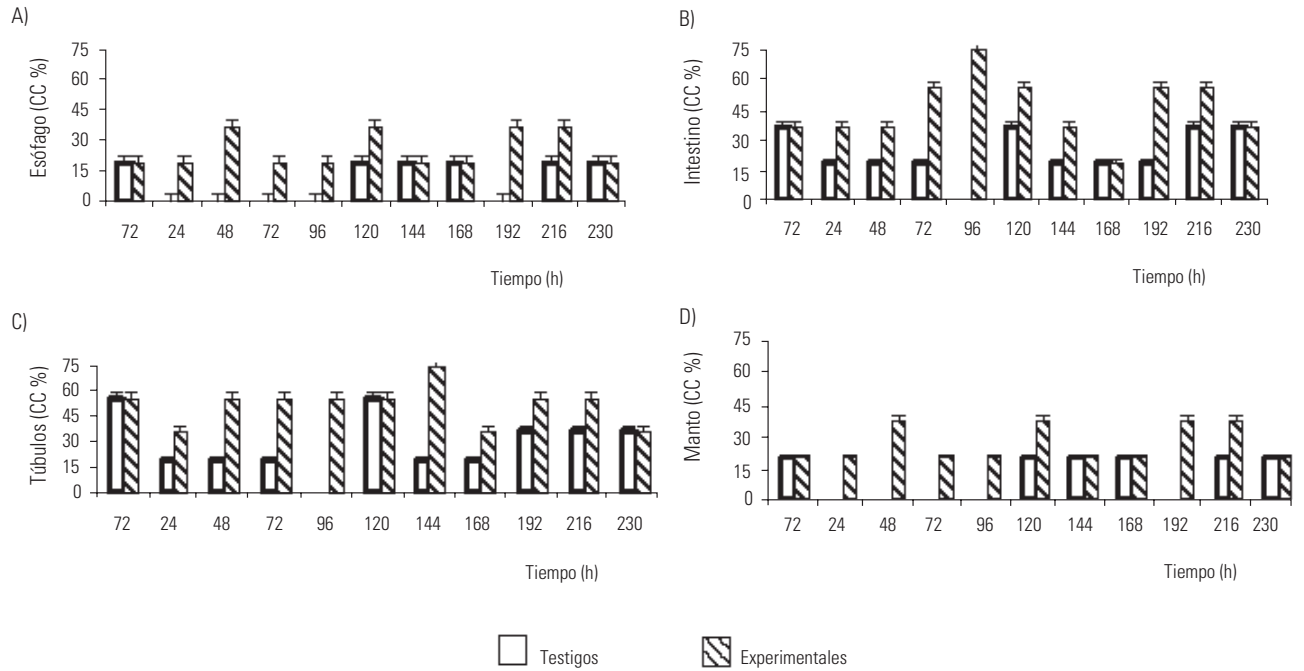


Figura 4. Porcentaje de células cafés (CC %) en el ostión *Crassostrea virginica* durante la fase de desintoxicación. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva y D) manto.

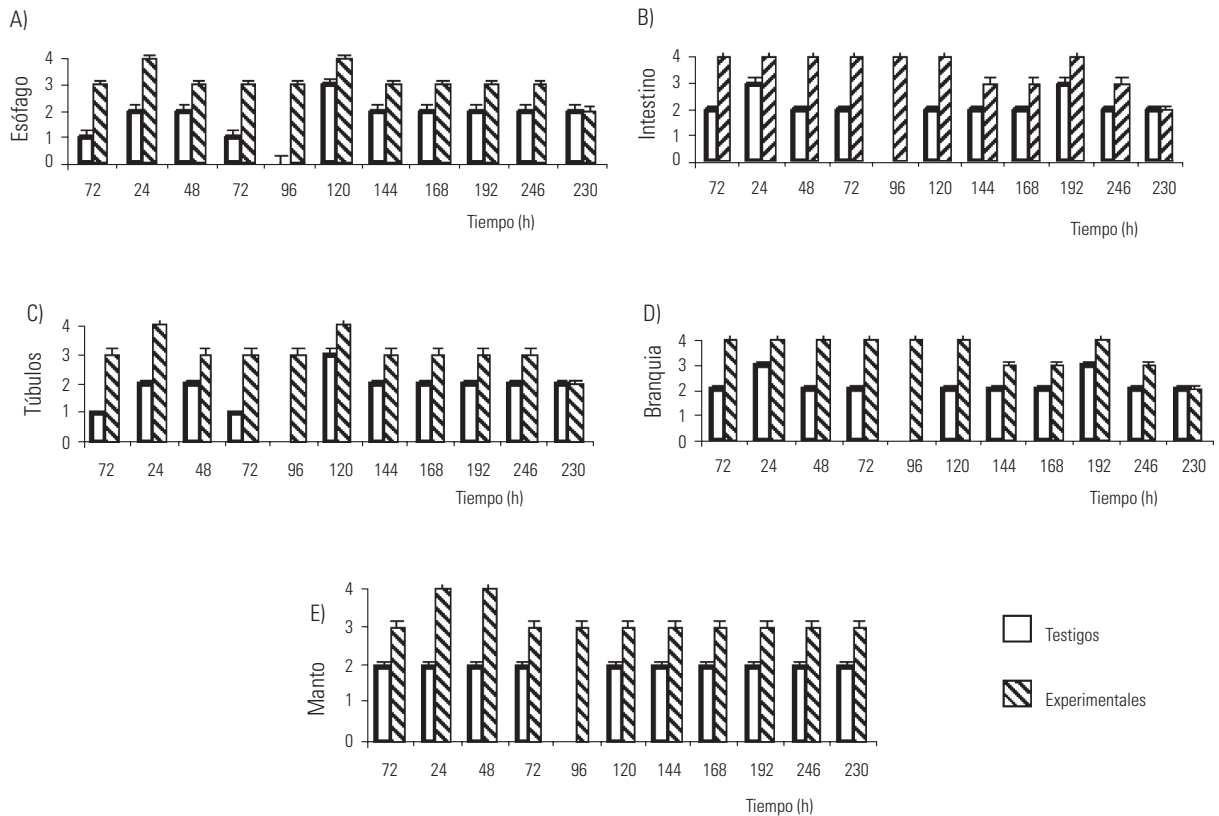


Figura 5. Densidad de hemocitos en tejidos del ostión *Crassostrea virginica* durante la fase de desintoxicación. A) esófago, B) intestino, C) glándula digestiva, D) manto y E) branquia.

El uso de la herramienta histopatológica permitió realizar el diagnóstico de daños y evidenció cambios importantes que facilitan la selección de inmunomarcadores en tejidos específicos, así como, plazos de experimentación adecuados para la interpretación de las respuestas biológicas. La evaluación de estas respuestas es necesaria para la evaluación del impacto de enfermedades en las pesquerías y puede ser usado como medida preventiva de riesgo de la salud pública por ingestión de bivalvos contaminados.

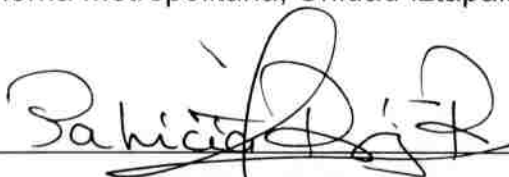
BIBLIOGRAFÍA

- CRUZ-RODRÍGUEZ, A.L. & E.C. FU-LIN. 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 60: 157-168.
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los Límites Máximos Permitidos de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, D. F., enero 6: 68-86.
- ENGEL, W.E. 1999. Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 47: 89-102.
- ESTABLIER, R., M. GUTIÉRREZ & A. RODRÍGUEZ. 1978. Acumulación de cadmio en el músculo y hepatopáncreas del langostino (*Penaeus kerathurus*) y alteraciones histopatológicas producidas. *Investigación Pesquera* 42 (2): 299-304.
- FISHER, W.S., L.M. OLIVER, J.T. WINSTEAD & E.R. LONG. 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminants burdens. *Aquatic Toxicology* 51: 115-138.
- FRÍAS-ESPERICUETA, G.M., A.M. ORTIZ-ARELLANO, I.J. OSUNA-LÓPEZ & J.A. RONSON-PAULIN. 1999. Heavy metals in the rock oyster *Crassostrea iridescens* (Filibranchia: Ostreidae) from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Revista Biología Tropical* 47(4): 843-849.
- GUTIÉRREZ-GALINDO, E.A., M.G. FLORES, G.P. GARCÍA, J.A. CELAYA & G.J. ARMENTEROS. 1991. Metales pesados en tejidos y en biodepositos sedimentarios del ostión *Crassostrea gigas* de la zona de cultivo de bahía San Quintín, Baja California, México. *Investigación Marina. CICIMAR* 6 (1): 175-186.
- MATTHEW, J.J., A.H. RINGWOOD, E.R. LACY, A.J. LEWITUS, J.W. KEMPTON, P. S. GROSS, G.W. WARR & R.W. CHAPMAN. 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American Oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology* 4: 81-93.
- OKAZAKI, K.R. & H.M. PANIETZ. 1981. Depuration of twelve trace metals in tissues of the oysters *Crassostrea gigas* and *C. virginica*. *Marine Biology* 63: 113-120.
- ROGERS, P. & A. GARCÍA-CUBAS. 1981. Evolución gonádica a nivel histológico del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1771) del sistema fluviolagunar Atasta-Pom, laguna de Términos, Campeche, México. *Anales del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México* 8(1): 21-42.
- ROESIJADI, G. & M. E. UNGER. 1993. Cadmium uptake in gills of the mollusk *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channels blockers. *Aquatic Toxicology* 24: 195-206.
- Rubin, E. & J. L. Farber. 1990. *Patología*. Editorial Médica Panamericana, S. A de C. V. México, D. F. 2-58.
- VILLANUEVA, F. & A. V. BOTELLO. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology* 157: 53-94.
- ZAROOGIAN, G. E. & P. YEVICH. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research* 37: 355-373.
- ZAROOGIAN, G. E. & G. MORRIS. 1981. Effect of cadmium body burdens in adult *Crassostrea virginica* on fecundity and viability of larvae. *Environmental Contamination and Toxicology* 27: 344-348.

Recibido: 16 de octubre de 2005.

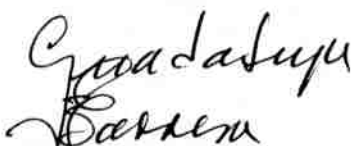
Aceptado: 10 de julio de 2006.

Los miembros del Jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental**” realizada por la alumna **Xochitl Guzmán García** y se realizó la disertación publica el día 14 de diciembre de 2007 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa”



PRESIDENTE

Dra. Patricia Ramírez Romero
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



SECRETARIA

Dra. Guadalupe Barrera Escorcía
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



VOCAL

Dra. Marcela Galar Martínez
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional



VOCAL

Dra. Irma Jiménez Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa