



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

TOXICOCINETICA DE CADMIO Y DAÑO
HISTOPATOLOGICO EN OSTIÓN *Crassostrea virginica*
EN CONDICIONES DE AYUNO Y ALIMENTACIÓN.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
PRESENTA
BIOL. XOCHITL GUZMÁN GARCÍA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2001

COMITÉ TUTORIAL

Director(es):

Dra Patricia Ramírez Romero.
Lab. De Contaminación, Bioensayos e Impacto Ambiental, Depto.
Hidrobiología. UAMI.

M. en C. Guadalupe Barrera E.
Lab. De Contaminación, Bioensayos e Impacto Ambiental. Depto.
Hidrobiología. UAMI.

Asesor(es):

Dra. Laura Martínez Tabche.
Lab. de Toxicología Acuática. Dpto de Farmacia. ENCB. IPN.

Dra. Beatriz Ramírez Mora.
Lab. de Toxicología Acuática. Dpto de Farmacia. ENCB. IPN.

M. en C. Olga Arciniega Ruíz de Esparza.
Lab. de Citología. Dpto de Morfología. ENCB. IPN.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Contando con apoyo del mismo consejo, por medio del convenio número 309-0.

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto "Toxicidad de Cromo y Cadmio de la laguna de Mandinga, Ver" Conacyt No de convenio 400200-5-0636 PT bajo la responsabilidad de la M. en C. Guadalupe Barrera Escorcía, a quien agradezco la dirección y formación recibida.

Agradezco a mi comité tutorial; Dra Patricia Ramirez Romero, M. en C. Guadalupe Barrera E., Dra. Laura Martínez Tabche, Dra. Beatriz Ramírez Mora y M. en C. Olga Arciniega Ruiz de Esparza la valiosa dirección, revisión y tiempo que dedicaron para la estructuración de este trabajo.

Al Ingeniero Ricardo Rosa del Laboratorio de Instrumentación del departamento de Procesos Hidráulicos UAM-I, por su apoyo en la determinación de metal por EAA.

A la M. en C. E. Olga Arciniega Ruíz de Esparza así como al personal del laboratorio de Citología, al centro de Microscopía y al laboratorio de Fisiología de la ENCB del IPN por permitirnos el uso de su equipo histológico y fotográfico.

Agradezco a La Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, al personal del Laboratorio de Contaminación, Bioensayos e Impacto ambiental del departamento de Hidrobiología y de manera especial a Irma Wong, Patricia Namihira y Sonia Rebollar, por su tan importante apoyo.

Es sin duda importante, la formación recibida por nuestros profesores de la maestría a quienes agradezco de manera especial por su gran nivel académico.

DEDICATORIA

**A LUCIO MATADAMAS GARCIA
POR SER UN GRAN COMPAÑERO Y AMIGO.**

**A MIS QUERIDOS HIJOS
MEZTLI Y FERNANDO**

**A MI MAESTRA BETTY
POR SUS LECCIONES DE VIDA.**

**A MI MADRE, HERMANOS Y AMIGOS
POR SU CARÍÑO Y APOYO.**

Indice

Resumen

1.0.	Introducción.....	3
2.0.	Hipótesis.....	9
3.0.	Objetivos.....	9
4.0.	Area de Estudio.....	10
5.0.	Método.....	12
5.1.	Colecta y mantenimiento.....	13
5.2.	Cultivo de <i>Tetraselmis suecica</i>.....	14
5.3.	Diseño experimental.....	14
5.4.	Determinación de Cadmio por EAA.....	16
5.5.	Histopatología.....	19
5.6.	Análisis Estadístico.....	20
6.0.	Resultados.....	21
6.1.	Parámetros Físicos y Morfométricos.....	21
6.2.	Niveles de Cadmio	22
6.2.1.	Niveles de cadmio en agua y ostión de Mandinga, Ver.....	23
6.2.2.	Cinética en ostión en condiciones de ayuno y alimentación.....	23
6.2.3.	Fracciones captadas de cadmio.....	25
6.2.4.	Velocidad de Captación y eliminación....	26
6.2.5.	Estudio histopatológico.....	28
7.0.	Discusión y Conclusión.....	43
8.0.	Bibliografía.....	56

Indice de tablas

Tabla 1. Parámetros Fisicoquímicos en Mandinga y en los Bioensayos.

Tabla 2. Promedio de los datos morfométricos en ostiones colectados.

Tabla 3. Datos promedio de los niveles de cadmio en agua y Ostión.

Tabla 4. Concentraciones promedio de cadmio registradas en ostiones en ayuno y alimentados.

Tabla 5. Factor de captación parcial a diferentes tiempos de intoxicación en condiciones de ayuno y alimentación.

Indice de figuras

Figura 1. Laguna de Mandiga, Ver.

Figura 2. Diseño experimental.

Figura 3. Representación de un modelo de balance toxicocinético.

Figura 4. Esquema del ostión *Crassostrea virginica*.

Figura 5. Concentración de cadmio y efecto histopatológico en ostión.

Figura 6. Aparato digestivo en organismos no intoxicados.

Figura 7. Secreciones en organismos intoxicados.

Figura 8. Respuesta PAS-positiva de mucopolisacaridos.

Figura 9. Corte de los senos linfáticos en ostión testigo.

Figura 10. Respuesta celular inducida

Figura 11. Identificación de granulocitos en tejido de Leydig.

Figura 12. Células cafés en moluscos bivalvos, no intoxicados.

Figura 13. Células cafés en tejido de Leydig después de dos horas de intoxicación.

Figura 14. Células cafés y hemocitos en laminas branquiales.

Figura 15. Hialinización en túbulos de la glándula digestiva, manto y branquia.

Figura 16. Ovocito en organismo testigo.

Figura 17. Cápsula ovigera de los gametos con ruptura por intoxicación.

Figura 18. Branquia en moluscos no intoxicados.

Figura 19. Apariencia de las branquias en organismos expuestos a cadmio.

Figura 20. Fibras del músculo abductor.

Figura 21. Resumen comparativo de los cambios histopatológicos.

Resumen

El ostión *Crassostrea virginica* es un organismo ampliamente utilizado en estudios de monitoreo ambiental y representa un recurso importante para la acuicultura mexicana. La explotación de este recurso ha sido afectada por la creciente contaminación de las lagunas costeras con alta productividad, como la laguna de Mandinga, Ver. Algunos estudios han reportado concentraciones que superan los niveles aceptables de cadmio, esto representa un riesgo potencial para la sobrevivencia y para los consumidores de este producto. En Mandinga se han reportado niveles de cadmio desde 2.0 hasta 87 µg/L (Rosas *et al.*, 1983; Barrera *et al.*, 1999) y en el tejido de ostión entre 1.2 hasta 3.13 µg/g peso seco (Rosas *et al.*, 1983; Villanueva y Botello, 1998 y Barrera *et al.*, 1999).

Crassostrea virginica, bioacumula fácilmente cadmio del medio, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre la acumulación de cadmio y los efectos histopatológicos en ostión *Crassostrea virginica* en condiciones de ayuno y alimentación.

Se colectaron 120 ostiones y 2 muestras de agua de la laguna de Mandinga, Ver. en mayo y junio de 1999. Las muestras de agua fueron acidificadas (pH 2) y congeladas hasta la determinación de Cadmio por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA). Los ostiones fueron transportados al laboratorio donde permanecieron por un periodo de 21 días, para lograr su ajuste metabólico en un sistema cerrado de flujo continuo con control de la calidad del agua. Posteriormente 60 organismos fueron expuestos a 100 µg/L de cadmio durante 96 h. 30 organismos provenientes de esta fase se colocaron en agua libre de metal, durante 96 h. Algunos parámetros como temperatura (°C) y salinidad ‰ fueron controlados. En cada bioensayo se tomaron 3 ejemplares de ostión a los 30, 60 min., 2, 4, 8, 24, 48, 72 y 96 h; un segundo bioensayo se realizó en las mismas condiciones experimentales, más la adición de alimento. Se analizaron los contenidos de cadmio de agua y organismos. Los cambios histopatológicos se analizaron en los segmentos: anterior, medio y posterior. Se aplicó la técnica de inclusión en parafina con tinción de hematoxilina-eosina, las secreciones registradas se evaluaron con la técnica de PAS.

En la fase de intoxicación, los resultados mostraron un incremento en la tasas de captación antes de las 72 h, la captación se ajustó a un modelo monocopartamental abierto de primer orden. La velocidad de captación fue mayor en los organismos alimentados ($K_c = 32 \text{ mL/gps}\cdot\text{h}$) con respecto a los organismos expuestos en condiciones de ayuno ($K_c = 30 \text{ mL/gps}\cdot\text{h}$). Los organismos expuestos fueron capaces de depurar alrededor del 60% del contaminante, mostrando durante la eliminación un comportamiento bifásico. La vida media fue diferente en organismos en condiciones de ayuno (123 h) con respecto a los alimentados (116 h). Las respuestas Histopatológicas mostraron la activación de mecanismos de tolerancia-resistencia al metal que permitieron la sobrevivencia de ostiones que alcanzaron alrededor de 25 µg/gps. Los cambios fueron desde respuestas inflamatorias en algunos tejidos hasta la necrosis de la gónada, así como respuestas inespecíficas de defensa con secreciones de distinta intensidad que se relacionaron con el tiempo de intoxicación; se activaron mecanismos de desintoxicación a través de las llamadas células cafés y hubo la aparición de la respuesta celular mediada o "inmunológica" caracterizada por la presencia de células de la hemolinfa.

Este trabajo mostró que *Crassostrea virginica* expuesta a 100 µg/L de cadmio favorece su acumulación en las primeras horas; y que posteriormente los procesos de distribución y eliminación son decisivos en la respuesta tóxica. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones acumuladas de cadmio en organismos en ayuno y alimentados, sin embargo existe una tendencia que sugiere que los organismos alimentados tuvieron más capacidad para depurar el tóxico. Los ostiones pudieron acumular concentraciones de cadmio arriba de 2 µg/gps (criterio de calidad para consumo de ostión) en 24 h, con daño histológico aparente, por lo que son recomendables para estudios de monitoreo ambiental a corto plazo.

Abstract

The oyster *Crassostrea virginica* commonly used in environmental studies as monitor, is an important resource for the Mexican aquaculture. The exploitation of this resource had been affected by the increase in contamination of the high production lagoons, one example is the lagoon of Mandinga, Veracruz, Mexico.

Studies at Mandinga have reports concentration exceeding the recomendable levels for Cadmium this represents a potential risk for the survival of these bivalves and for those who eat them. Cadmium concentrations from 2.0 up to 87 $\mu\text{g/L}$ have been reported in this lagoon (Rosas *et al.*, 1983; Barrera *et al.*, 1999) and in oyster tissue between 1.2 than 3.13 $\mu\text{g/g}$ dry weight (Rosas *et al.*, 1983; Villanueva y Botello, 1998 and Barrera *et al.*, 1999).

Crassostrea virginica bioaccumulates environmental cadmium readily, therefore the objective of this study was to investigate the relationship between accumulation of cadmium and histopathology effects on organisms fed and starved.

120 oysters and 2 water samples were collected from the Mandinga lagoon, Veracruz, in May and June, 1999. The water samples were acidified (pH2) and frozed until cadmium determination through spectrophotometry and atomic absorption (EAA) was carried out. The oysters were taken to the laboratory and kept for a 21 day period in order to let the metabolism adjust to a continuous closed flow system with quality water control. After that period 60 organisms were exposed to sublethal concentrations (100 $\mu\text{g/L}$) of cadmium for 96 h, in bioassays with food and without it. Afterwards, 30 they were transferred to clean free Cd. Important parameters such as temperature ($25\pm^{\circ}\text{C}$) and salinity (22‰) were controlled. Oysters sampling was done in two fases : uptake and depuration at 30 and 60 minutes and 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h were determined metal level and histological damage.

The concentrations of cadmium in water and organisms were examined por EAA and the hystopathological changes were analyzed on the anterior, medium and posterior segments of the organisms. The inmersion in paraffin technique was applied by hematoxilina-eosina (H-E) stained, the registred secretions were evaluated with the PAS technique.

In the accumulation phase there was an increase in the uptake rate during the first 72h. Uptake was adjusted to a first order mono compartmental model. Uptake rates were higher in feed organisms ($K_c = 32 \text{ ml/gps}\cdot\text{h}$) compared to starved animals ($K_c = 30 \text{ ml/gps}\cdot\text{h}$). Exposed organisms were able to depurate around 60% of the bioaccumulated cadmium; this phase showed a biphasic behavior. The half-life was different for fed (116 h) and starved (123 h) organisms. Histopathological results showed the activation of resistance mechanisms that allowed the oysters to survive the accumulation of up to 25 $\mu\text{g/gps}$. The histopathological effects ranged from inflammatory responses up to gonad necrosis, as well as to unspecific defense mechanisms with secretions of mucopolisacarids that were related with the exposition time. Brown cells were activated as a detoxification mechanism and a mediated cellular response, characterized by the presence of hemolymph cells, was observed.

This work showed that, when *Crassostrea virginica* is exposed to 100 $\mu\text{g Cd/L}$ uptake is favored during the first hours; subsequently the distribution and elimination processes are decisive on the toxic response. Even though there were no statistically significant differences between fed and starved organisms, a tendency can be observed in which fed animals appeared to have a better capacity to depurate the toxic. Oysters can accumulate cadmium concentrations above 2 $\mu\text{g/g}$ dry weight (quality criteria for mollusks as food) in 24 h, and histological damage can be easily observed, therefore these organisms are useful for short term monitoring studies.

1.0. Introducción.

El ostión *Crassostrea virginica* es un recurso valioso para la acuacultura mexicana, tanto por su volumen de producción, como por los niveles de consumo y la cantidad de empleos que se generan a través de su extracción. *Crassostrea virginica* es la especie de ostión más importante a nivel nacional y se cultiva en las lagunas litorales del Golfo de México (Secretaría de Pesca, 1990). Los riesgos asociados a este cultivo, se presentan cuando existe contaminación de las áreas ostrícolas. Desde el punto de vista microbiológico su calidad se ha visto deteriorada y no cubre los requerimientos para la exportación (Bardach *et al.*, 1992).

Los moluscos bivalvos, son organismos bentónicos que presentan dos estructuras calcáreas (conchas), controladas por un músculo abductor. Además presentan otros órganos internos como son: el manto, con función sensorial; las branquias, que participan en la respiración y alimentación, así como un sistema digestivo formado por la boca, el esófago, el estómago, y el intestino. En el intestino se distinguen dos ductos primarios especializados, llamados intestino medio y saco del estilete (tritador); una parte ascendente y la porción descendente del intestino que termina en el recto.

El intestino medio y el saco del estilete son dos ductos primarios con funciones digestivas diferentes y el resto de la glándula digestiva es un recinto tubular proveniente de la cámara del estómago y ductos secundarios. Las enfermedades, el estrés y el estado de ayuno modifican la apariencia de los túbulos digestivos presentando bajo epitelio de absorción entre otras anormalidades histológicas de la glándula, las cuales se han recomendado como indicadores de la condición fisiológica general de los bivalvos (Lowe *et al.*, 1981).

La alimentación se realiza por filtración de la columna de agua, hábito que facilita la incorporación de metales, tales como el cadmio, en sus

tejidos blandos.

Los efectos potenciales de éste y otros metales sobre la salud de los organismos y de sus consumidores, así como los factores biológicos y fisicoquímicos de control relacionados con este proceso son temas de interés para muchos investigadores (Roesijadi, 1997).

Estos moluscos se consideran buenos agentes de monitoreo para evaluar la contaminación de ambientes acuáticos. Dentro de los agentes considerados tóxicos, se encuentran los metales pesados que se transfieren a través de la cadena alimenticia mediante procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación, con alto grado de eficiencia hasta consumidores finales como el hombre (Spacie y Hamelinck, 1985).

El proceso de bioacumulación, ocurre cuando la tasa de incorporación del contaminante excede la tasa de eliminación. La bioacumulación, depende de factores que afectan la exposición y la distribución química de los contaminantes dentro del organismo, como son: el crecimiento, el tipo de alimento y procesos de biotransformación. La conducta y persistencia de los xenobióticos en el agua, dependen de sus propiedades físico-químicas, ya que existen diversos factores que afectan su biodisponibilidad como son: el pH, la temperatura, la salinidad y los fenómenos de adsorción con otras partículas, entre otros. Diferentes mecanismos de incorporación, distribución, metabolismo y excreción así como condiciones de ayuno y alimentación modifican el proceso de bioacumulación, por lo que se han propuesto modelos de balance toxicocinético que describen la dinámica de los residuos a través del tiempo y que permiten distinguir las rutas de incorporación desde el alimento y el agua, por procesos de difusión, transporte especial, adsorción y filtración (Rand y Petrocelli, 1985).

El cadmio, que es un elemento del grupo II de la tabla periódica con número atómico 48, es un metal maleable y dúctil, no tiene modificaciones

alotrópicas y en la mayoría de los compuestos que forma exhibe el estado de oxidación +2. Las soluciones de sales de cadmio tienen una reacción ácida; cuando se adiciona un álcali la mitad del cadmio es realmente soluble en agua y forma un gran número de compuestos. El cloruro de cadmio (CdCl_2), tiene una masa atómica de 183.31, una densidad de 4.04 (g/cm^3), y punto de ebullición de 964°C (Filov *et al* 1993). Se emplea en la preparación de aleaciones de bajo punto de fusión, para soldaduras, fusibles, recubrimiento de hierro para protegerlo de la oxidación y como constituyente de las baterías alcalinas, debido a su capacidad de absorber neutrones de baja energía. La industria constituye la principal fuente de contaminación por derrames, aunque también contribuyen las aguas residuales domésticas y municipales que se vierten sin tratamiento y que aportan materia orgánica, pesticidas, fertilizantes, detergentes y metales (Levi y Hodgson, 1987). En los ambientes acuáticos, el cadmio proviene del lavado de los suelos agrícolas donde se han depositado altas cantidades de agroquímicos con este elemento 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 efectos tóxicos del cadmio en vertebrados han sido ampliamente estudiados e incluyen: incremento en la salivación, vómito, dolores abdominales y diarrea, que pueden ser síntomas previos a la disfunción renal, enfisema, colapso cardiopulmonar e incluso efectos carcinogénicos y teratogénicos (Lippmann, 1992).

La absorción de cadmio en el tracto respiratorio de vertebrados, se ha estimado en un intervalo de 10-50% y en la vía gastrointestinal del 5-8% observándose un incremento de más del 10% en organismos experimentales con dietas deficientes en Calcio y/o en proteínas. Esto se debe a que las dietas bajas en calcio estimulan la síntesis de proteínas que se ligan al mismo, las cuales, pueden ser utilizadas para la absorción de cadmio (Lippmann, 1992). El estado de nutrición, también es importante en

el ostión, existen diferencias en las respuestas que reflejan la interacción entre la toxicidad del cadmio y el estado nutricional (Wilkfors *et al.*, 1994). Entre las dietas de alto valor nutricional para el ostión se encuentra el alga *Tetraselmis suecica*, la cual aporta gran cantidad de carbohidratos que son utilizados para las actividades metabólicas (Laing y Gil, 1991).

Recientemente se han utilizado las técnicas histopatológicas para evidenciar daños tisulares por metales pesados (Boyles *et al.*, 1991). Estas junto con otros biomarcadores, ayudan a la comprensión y caracterización de los efectos en diferentes niveles de organización biológica (Clark *et al.*, 1997).

Walsh y O'Halloran (1998), han reportado que existe un patrón de acumulación de metales en este orden: branquias, riñón, glándula digestiva, manto y músculo abductor, presentando alta correlación entre algunos de estos tejidos como son: glándula digestiva-riñón, y branquia-músculo abductor. Recientemente Roesijadi *et al.* (1997), han demostrado que en los hemocitos de ostión *Crassostrea virginica* expuestos a bajas concentraciones de cadmio (5-10 μM), se induce la formación de metalotioneinas y la producción de especies oxígeno reactivas (ROS), en tanto que en concentraciones altas (36-356 μM), decrecen las metalotioneinas y se inhibe la producción de ROS, probablemente como respuesta a la citotoxicidad del cadmio, lo cual sugiere que el cadmio puede ser "inmunotóxico" para *Crassostrea virginica*; si bien la "inmunidad" en los bivalvos comprende la respuesta celular inducida y mecanismos humorales (Cheng, 1990).

Existen estudios de cuantificación relativos a los niveles de cadmio en ostión, así como de respuestas celulares (Roesijadi *et al.*, 1996). Sin embargo, son escasos los estudios de respuestas integrales, que permitan dilucidar los mecanismos de absorción, distribución, eliminación y la evaluación de los efectos tóxicos.

En los invertebrados acuáticos, el impacto del cadmio depende de la forma química en la que se encuentre y de los factores que favorezcan su

bioacumulación. A pesar de su amplia utilización como indicadores de contaminación, los moluscos bivalvos, tienen la desventaja de que usualmente no alcanzan el estado de equilibrio dinámico, donde la concentración de un químico en tejido permanece esencialmente constante durante la exposición, ya que la magnitud de la concentración puede ser el principal factor que determine el factor de bioacumulación (EPA., 1984.a.).

La determinación de respuestas en ostiones adultos expuestos a altas concentraciones de contaminantes es difícil, toda vez que su gran adaptabilidad les permite permanecer cerrados por períodos largos, impidiendo así el contacto con el contaminante (APHA, 1995). Se ha considerado incluso que el período de cierre de valvas es proporcional a la concentración del tóxico, sin embargo, cuando la concentración del contaminante no es muy alta, las condiciones de estrés disminuyen, permitiendo el contacto del organismo con el contaminante. De manera análoga, la exposición a largo plazo a bajas concentraciones de contaminantes puede provocar daños irreversibles que incapaciten al organismo para sobrevivir o reproducirse, aumentando la susceptibilidad a agentes patógenos y/o parásitos, y disminuyendo la resistencia a situaciones de estrés, lo que puede poner en riesgo a la especie (Roesijadi *et al.*, 1997).

Se ha reportado que las intensas actividades comerciales, industriales y de la población agravan cada vez más el problema de contaminación por cadmio en diversas lagunas mexicanas (Villanueva y Botello, 1998). En algunas lagunas costeras mexicanas existen niveles de cadmio en agua que superan el Limite Máximo Permitido (LMP) de 0.0009 mg/L para la protección de la vida acuática en áreas costeras, señalada en el Reglamento para la Prevención y Control de la Contaminación de Agua (Diario Oficial de la Federación, 1973). En estos ambientes, por lo general salobres; la biodisponibilidad de cadmio está favorecida por la diferencia de salinidad, y los bajos contenidos de carbon orgánico. El cadmio libre divalente es la forma predominante, la precipitación por carbonato o

hidróxido y la formación de complejos solubles con cloruros, sulfatos, carbonatos e hidróxidos son de poca importancia; en contraste, en agua salina los complejos de cloruro de cadmio son predominantes (EPA., 1984.b.). La biodisponibilidad es un factor que determina la concentración de este metal en el tejido de organismos sesiles como el ostión.

Rosas *et al.*, (1983) señalaron que las concentraciones de Cadmio en ostión de la laguna de Mandinga, Ver., superaron LMP para consumo humano y que el factor de bioconcentración de Cadmio es alto en relación con otros metales tóxicos, por lo que son recomendables monitoreos frecuentes en esta zona litoral mexicana de alta productividad ostrícola. Es posible que las concentraciones registradas en la laguna pongan en riesgo a la especie *Crassostrea virginica*, y que se acumulen en los tejidos del ostión concentraciones peligrosas para el consumo humano, por lo que es importante conocer la toxicocinética de acumulación de cadmio y los efectos histopatológicos, con el fin de caracterizar el potencial de acumulación y depuración de la especie pretendiendo dar elementos que coadyuven en un futuro al establecimiento de la normatividad mexicana previendo así los efectos tóxicos sobre la especie y los consumidores.

2.0. Hipótesis.

Si la captación del tóxico en el molusco es proporcional a la concentración en el agua y al tiempo de exposición, considerando un proceso de eliminación menor al de incorporación, entonces el daño histológico y la acumulación aumentarán con respecto al tiempo, resultando estas tóxicas para el organismo además de alcanzar una concentración potencialmente dañina para el consumidor.

3.0. Objetivos

General

Evaluar la toxicocinética de cadmio en concentraciones subletales y los cambios histopatológicos en el ostión *Crassostrea virginica* de la laguna de Mandinga, Ver, Mex.

Específicos

3.1. Determinar el contenido de Cadmio en agua y ostión *Crassostrea virginica* procedente de la laguna de Mandinga, Ver., Mex.

3.2. Determinar las velocidades de captación y depuración de cadmio en ostiones en condiciones de ayuno y alimentados, expuestos a concentración subletal del metal.

3.3. Observar los cambios histopatológicos en algunos tejidos u órganos del ostión relacionados con el tiempo de intoxicación y la concentración subletal de cadmio.

4.0. Área de Estudio.

El presente estudio se desarrolló con ostión *Crassostrea virginica* proveniente de la laguna de Mandinga, Ver., que es una zona de gran extracción con consumo local y de amplia distribución.

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 1). 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 entre 0.9 a 35 ‰ (Reguero, 1994).

En la laguna de Mandinga, las actividades pecuarias son intensas con uso indiscriminado de agroquímicos y existe un arrastre de aportes por el río Jamapa y aportes de diversas industrias establecidas a lo largo de la cuenca de captación de los efluentes que influyen en el sistema (Hernández, 1996).

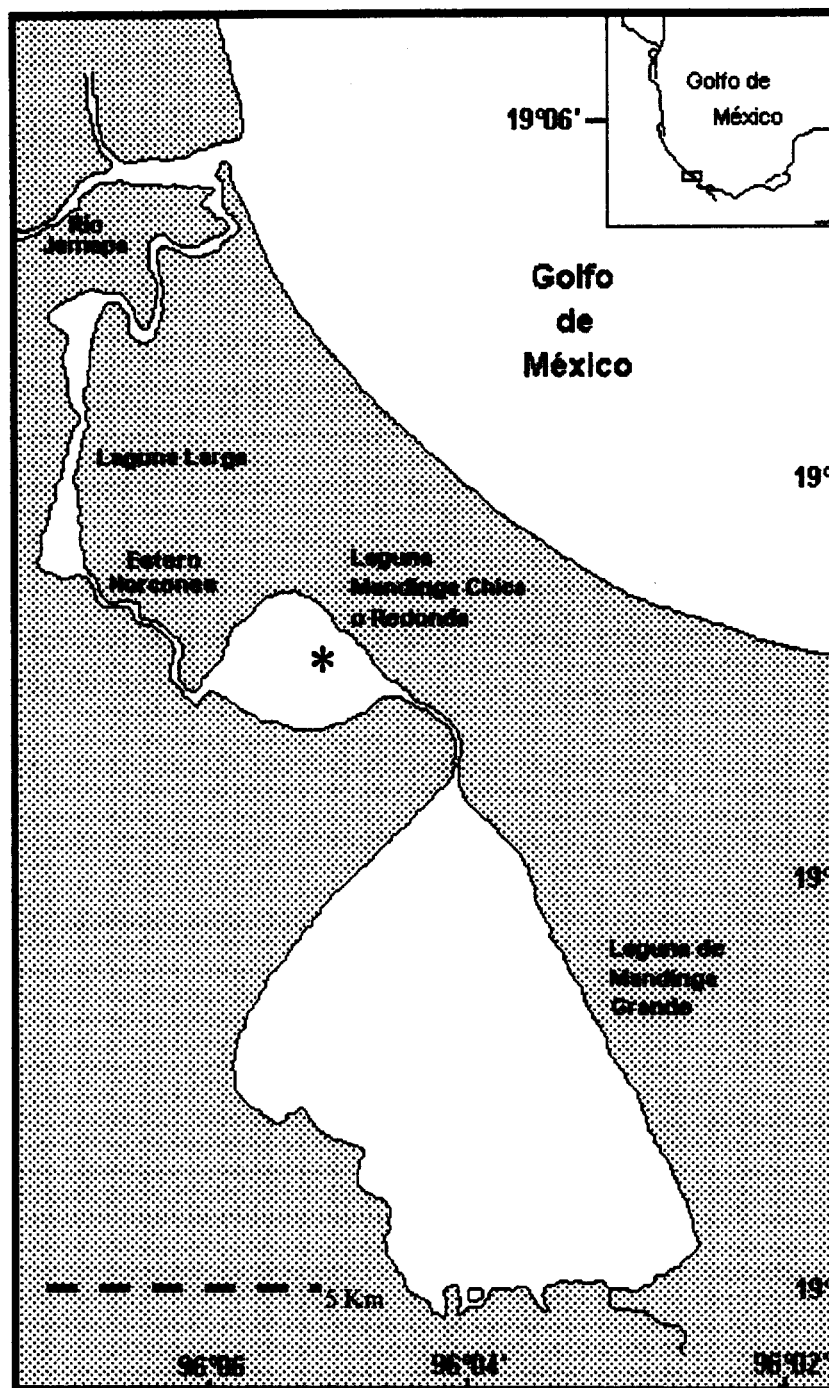


Fig. 1. Laguna de Mandinga (*zona de colecta)

5.0. Método

Se colectaron ejemplares de ostión y muestras de agua en Noviembre de 1998 así como en mayo y Junio de 1999, que permitieron la determinación de las concentraciones de cadmio presentes en la laguna de Mandinga, Ver., paralelamente se registraron parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura (°C), salinidad (‰) y oxígeno disuelto (mg/L) con un multianalizador HORIBA U-10.

Las muestras de agua, se tomaron 10 cm por debajo de la superficie, en recipientes de plástico de 1000 mL, estas fueron acidificadas con ácido nítrico concentrado (5ml) para obtener un pH de 2 y se congelaron inmediatamente hasta la determinación de Cadmio.

En cada colecta más de 120 ejemplares de ostión, se transportaron en bolsas de plástico y en hieleras a 4°C al laboratorio, antes de que transcurrieran 24 horas desde su colecta. Los ostiones se colocaron en el sistema de mantenimiento para lograr su ajuste metabólico.

5.1. Mantenimiento

Se seleccionaron 120 organismos y se colocaron por 21 días en un sistema de circulación cerrada con flujo continuo, de 520 L de agua de mar artificial Instan Ocean (Shumway y Koehn, 1982) con salinidad controlada (22 ± 0.05 ‰). El sistema fue adaptado con una bomba sumergible con un flujo aproximado de 120 L/h, un compresor de aire purificado, un filtro biológico y calentadores de inmersión de 3 Kw forrados con vitreosil para el mantenimiento de la temperatura ($25^\circ \pm 0.5$ °C). Se realizó además el registro periódico de pH (7.9 ± 0.005) y oxígeno disuelto (7.3 ± 0.05 mg/L) que son análogas a las condiciones promedio que se presentan en la laguna de Mandinga. Las heces se retiraron diariamente y se controló el

contenido de amonio por la técnica de Lind, (1985), dentro del nivel óptimo para la especie de NH_3 : $4.8 \mu\text{M/L}$ (Coll, 1982; Sepesca, 1988). Se registraron los siguientes parámetros morfométricos: longitud, ancho de la valva, altura, cavidad de la concha, y peso total húmedo como medida de control de los lotes, y se obtuvo el índice de condición con la ecuación de Walne (1984) :

$$\text{Índice de condición} = \frac{\text{Media del peso seco de la masa viva(g)} \times 1000}{\text{Media del volumen intervalvas (ml)}}$$

Considerándose los resultados de 120 como peso alto, 90 peso normal y de 70 a 80 peso bajo.

Durante el período de mantenimiento los ostiones fueron alimentados diariamente con cultivos de algas *Tetraselmis suecica*, como se describe a continuación.

5.2. Cultivo de Algas *Tetraselmis suecica*

Un mes antes de la colecta se desarrolló un cultivo escalonado en medio Guillard F/2 libre de cadmio, en recipientes de cristal con capacidad de 20 litros, colocados en iluminación y aireación constantes. Se realizaron conteos regulares de la densidad de población de la cepa obtenida en el laboratorio de contaminación y bioensayos de la UAMI, de *Tetraselmis suecica* con ayuda de una cámara Neubauer y por absorción con fotocolorímetro Spectronic 601 (Castrejon *et al.*, 1994).

El cultivo fue posteriormente centrifugado por 5 min a 3500 RPM y congelado a -4°C . Para alimentar a los organismos, se ajustó el cultivo a concentraciones de 10,000 cel/mL (para asegurar una proporción de 120

mL / ostión / h) con agua del sistema de mantenimiento (Coll, 1982).

5.3. Diseño Experimental

El diseño experimental consistió de dos fases (Figura 2); la primera fue denominada de "intoxicación" ; en ella los organismos fueron expuestos a cadmio; en la segunda fase, denominada de "desintoxicación", los organismos se colocaron en agua libre del metal.

Se realizó un bioensayo preliminar utilizando dos concentraciones 100 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Cd en la fase de intoxicación, que fue de utilidad para definir la concentración de prueba así como los tiempos de exposición y toma de muestras de ostión y agua. Posteriormente se realizaron los dos bioensayos definitivos. Estos se realizaron en dispositivos cerrados, con aireación continua y recambios parciales con reposición del metal (20 %) cada tercer día (Coll, 1982; APHA, 1995). La alimentación se suspendió 24 h antes de la exposición al metal. Durante estas pruebas se registraron también los parámetros físicoquímicos antes mencionados. El primer bioensayo definitivo se llevó a cabo con organismos sin alimentar y el segundo adicionando alimento, esto para establecer la influencia del alimento en el proceso de acumulación. El tiempo de experimentación, así como la frecuencia y número de muestras de los bioensayos definitivos se describen a continuación.

5.3.1. Bioensayo 1

Los bioensayos se realizaron en niveles de oxígeno disuelto arriba de 5 mg/L, pH entre 7 y 8 (Sepesca, 1988), salinidad de 22 ‰ y temperatura de 25° C, condiciones de exposición similares, a las utilizadas para la determinación de la concentración letal media (LC_{50}) para Cd

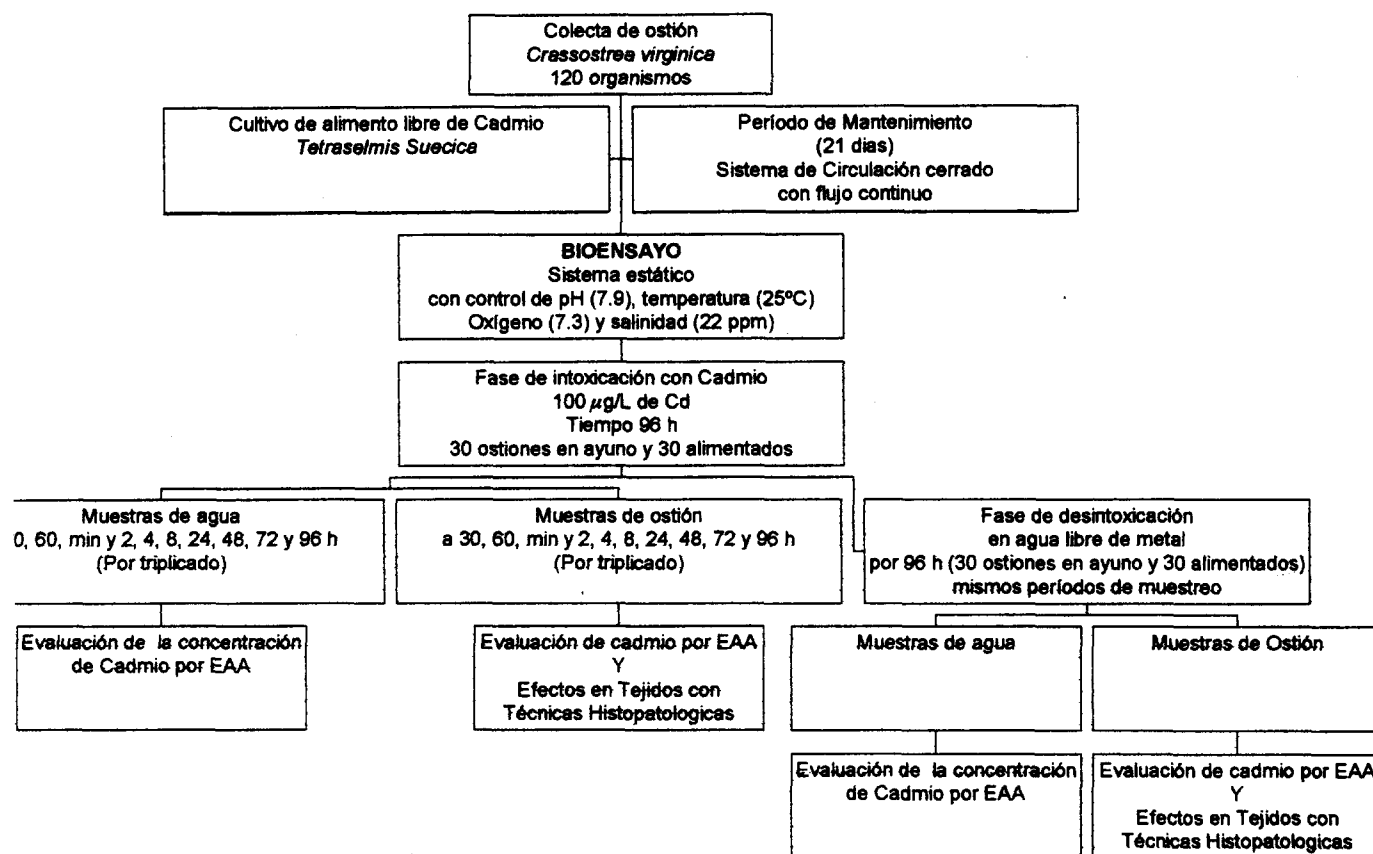


Fig.2. Diseño experimental para la evaluación de la toxicocinetica en *Crassostrea virginica*

A partir de la concentración Letal, se calculó la concentración subletal utilizada en este trabajo. En la fase de intoxicación se colocaron 10 organismos por acuarios de 40 L, un total de 60 organismos fueron expuestos a concentraciones de 100 $\mu\text{g/L}$ de Cadmio por 96 h. Se tomaron muestras de ostión por triplicado y agua del acuario a los: 30, 60, 120 min y 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h (30 organismos). En la fase de desintoxicación se colocaron los 30 organismos restantes en agua libre de cadmio y se tomaron las muestras en los mismos intervalos de tiempo.

5.3.3. Bioensayo 2

Se repitió el diseño del bioensayo anterior, pero en este caso se llevó a cabo la adición diaria de alimento *Tetraselmis suecica* en las cantidades antes descritas.

5.4. Determinación de Cadmio

Los ejemplares de ostión fueron medidos, pesados y cortados longitudinalmente; una mitad fue puesta a secar para la determinación de cadmio. Las muestras de agua fueron digeridas con ácido nítrico (APHA, 1995) en un horno de microondas CEM-MDS-81D y las muestras de ostión secas y molidas con la técnica de Huan (1994). La lectura de muestras se llevó a cabo con ayuda de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian AA-20 con flama de gas-acetileno, en el laboratorio de Instrumentación del Departamento de Ingeniería de Procesos Hidráulicos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Todos los recipientes utilizados fueron lavados previamente al bioensayo con detergente libre de fosfatos, ácido nítrico al 5% y enjuagados con agua de la llave, destilada y desmineralizada (FAO, 1993).

Se utilizó un modelo de un compartimiento, para determinar velocidades de incorporación y depuración (Figura 3). En este modelo, cada organismo es considerado un compartimiento. La tasa o velocidad de movimiento de un compuesto desde un compartimiento a otro, o "flujo", dentro de la cinética de primer orden, es dependiente de la concentración del compuesto y tiene una velocidad constante (K_c), relacionada con la biodisponibilidad del componente y con las condiciones experimentales en las que fue medida.



Fig.3. Representación de un Modelo de balance Toxicocinético, de un compartimiento.

Las "velocidades constantes condicionales" (Rand y Petrocelli, 1985); de este modelo, implican que el curso temporal de los residuos esté dado por:

$$dC/dt = \text{captación} - \text{pérdida} = K_c C_a - K_e C \quad (1)$$

donde

C_a : Concentración del tóxico en el agua ($\mu\text{g/mL}$)

C : Concentración del químico en el organismo expuesto ($\mu\text{g/g}$)

t : tiempo (h)

K_c : Constante de velocidad de captación en el organismo (mL/g.h^{-1}).

K_e : Constante de velocidad de eliminación

Para establecer la relación entre el metal captado por los organismos y la concentración de metal en el agua de exposición, se utilizó el factor de bioacumulación (Bruggeman, 1998), denominándose en este trabajo como factor de captación debido a el factor de bioacumulación y/o bioconcentración se calculan en el estado de equilibrio y este no se ha logrado en *Crassostrea virginica*. Sin embargo de manera análoga se calculó el factor de captación, a través de la siguiente relación:

$$FC = \frac{\text{Concentración de metal en el organismo } (\mu\text{g/g})}{\text{Concentración de metal presente en el agua } (\mu\text{g/mL})}$$

La velocidad de captación se determinó calculando la tangente en cada intervalo de muestreo y la velocidad de eliminación se calculó por la ecuación

$$dC/dt = -K_e C \quad (2) \quad \text{que de manera integrada se expresa:}$$

$$C_t = C_{t_0} e^{-K_e t} \quad (3)$$

Las velocidades de captación y eliminación fueron promediadas. La velocidad de eliminación se expresó en términos de vida media ($t_{1/2}$), representa el tiempo requerido para que la mitad del metal acumulado se eliminara, esta por linealización, sustitución y arreglo de la ecuación 3 se transforma:

$$\text{Sustitución } \ln(C_{t_0}/2) = \ln(C_{t_0}) - K_e t_{1/2}$$

$$\text{Arreglo } \ln(2) / K_e = t_{1/2}$$

$$\text{Finalmente } 0.693/K_e = t_{1/2}$$

5.5. Histopatología.

Para la evaluación histológica e histopatológica la mitad del organismo fue pesado y fijado en formol (10%). Los organismos fueron seccionados en tres porciones anterior, media y posterior (Figura 4), las cuales fueron deshidratadas en un procesador de tejidos automático marca Tissue-Tek Modelo 4640-B, posteriormente se incluyeron en parafina con punto de fusión de 60 °C y Se obtuvieron cortes seriados de 5-7 μ con un microtomo rotatorio. Los cortes fueron teñidos con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (topográfica) y PAS (histoquímica) esta última para evidenciar la presencia de carbohidratos neutros (Sheehan y Hrapchak, 1980).

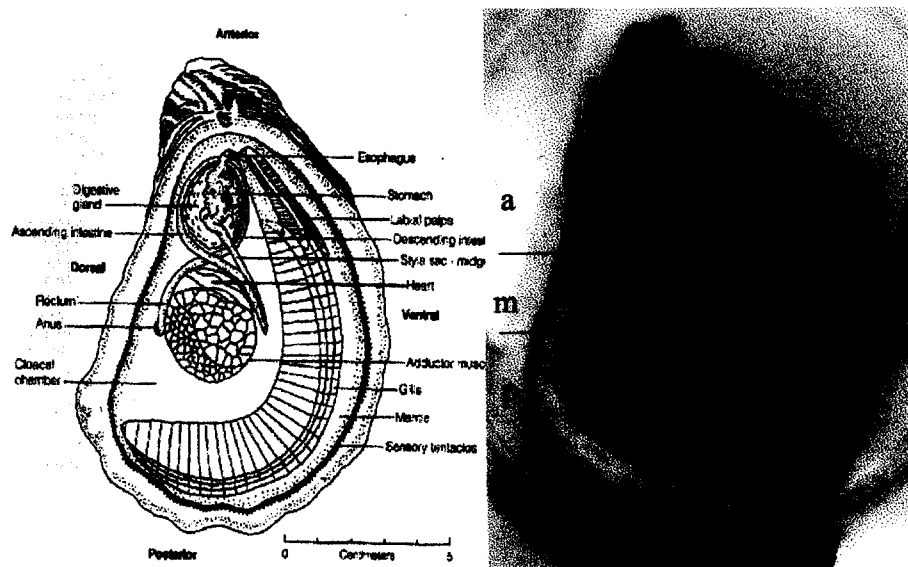


Fig.4 Esquema y figura del ostión *Crassostrea virginica*, en donde se observa su anatomía en la parte anterior (a), media (m) y posterior (p).

5.6. Análisis Estadístico

Se aplicó ANOVA para el análisis de los parámetros fisicoquímicos y diferencias en la concentración de metal de organismos en condiciones de ayuno y alimentación con ayuda del programa Statistica (Statsoft Ser. 1997).

6.0. Resultados

Los resultados de las colectas, el período de mantenimiento y de los bioensayos realizados: sin alimento y con alimento, se muestran a través del registro de los parámetros fisicoquímicos y datos morfométricos.

6.1. Parámetros Fisicoquímicos y Morfométricos

6.1.1. Parámetros Fisicoquímicos

Los parámetros óptimos para la especie (Coll, 1982), se compararon con los registrados en la laguna de Mandinga y los del sistema de aclimatación. Durante el bioensayo en condiciones de ayuno y alimentación, los parámetros se mantuvieron relativamente constantes y no tuvieron diferencias estadísticas significativas (ANOVA: $p > 0.05$), como se muestra en la tabla 1.

6.1.2. Morfometría

Los datos morfométricos de longitud, peso, ancho, alto, peso húmedo y seco fueron tomados con fines de control de los lotes, se muestran en la tabla 2. Los datos indican en términos generales, que los lotes fueron homogéneos y los organismos estuvieron sanos de acuerdo a su índice de condición.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos registrados en Mandinga, durante la aclimatación y en los biensayos (media $\pm$ desviación estándar).

Parámetro	pH	Oxígeno disuelto (mg/ml)	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)
Optimo para ostión*	7.9	7.3	25	22
Laguna de mandinga				
Nov-98	7.5	5.38	29.4	9.4
Feb-99	8.5	6.18	24.4	15.6
May-99	9.4	4.82	30.7	26.9
Sistema de aclimatación				
Feb-99	8.4 $\pm$ 0.3	6.34 $\pm$ 0.36	24 $\pm$ 0.9	18.24 $\pm$ 1.45
Jun-99	8.2 $\pm$ 0.2	7.14 $\pm$ 0.63	23.9 $\pm$ 1.7	24.5 $\pm$ 0.9
Bioensayo				
Nov-98	7.8 $\pm$ 0.4	6.66 $\pm$ 0.35	25 $\pm$ 1.9	22.3 $\pm$ 0.2
Feb-99	8.3 $\pm$ 0.3	6.17 $\pm$ 0.18	24.8 $\pm$ 0.7	22.1 $\pm$ 0.4
Jun-99	8.3 $\pm$ 0.1	7.07 $\pm$ 0.38	24.5 $\pm$ 0.8	22.3 $\pm$ 0.3

*SEPESCA, 1988.

Tabla 2. Promedios de los datos morfométricos en ostiones colectados (media $\pm$ desviación estándar).

Colecta	Indice de estado*	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso-húmedo (g)	Peso-seco (g)
Nov-98	110	72.0 $\pm$ 0.5	48.6 $\pm$ 0.4	27.6 $\pm$ 0.3	15.52 $\pm$ 3.63	1.7 $\pm$ 0.46
Mar-99	97	74.3 $\pm$ 1.0	43.4 $\pm$ 0.7	24 $\pm$ 1.1	13.65 $\pm$ 2.7	0.69 $\pm$ 0.4
Jun-99	130	66.4 $\pm$ 0.6	43.1 $\pm$ 0.6	23.3 $\pm$ 0.4	9.06 $\pm$ 4.75	0.69 $\pm$ 0.42
Promedio	112	70.9	45.05	25.02	12.74	1.02

*Indice de Estado = 90 (normal); 120 (alto); 70-80 (bajo).

6.2. Determinación de Cadmio.

6.2.1. Niveles de Cadmio en muestras de Mandinga, Ver.

Las concentraciones de cadmio en agua de la laguna de Mandinga, Ver. fueron de $66 \mu\text{g L}^{-1}$ y en ostión de $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco (Tabla 3). Los niveles de cadmio en agua superan el LMP mexicano aceptable para la protección de la vida acuática.

Tabla 3. Datos promedio de los niveles de cadmio en agua, ostión y sedimento registrados en la laguna de Mandinga, Ver.

Fuente	Rosas <i>et al.</i> , 1983	Villanueva y Botello, 1998	Barrera <i>et al.</i> , 1999	Este estudio 1999	LMP
Agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2 ± 0.1	ND	87	66	0.09 *
Ostión ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	1.54 ± 0.98	3.13 ± 1.25	2.3 ± 1.11	1.2	2.0**

6.2.2. Concentración de Cadmio en tejidos de ostión en condiciones de ayuno y con alimento.

Los niveles de cadmio en los organismos provenientes del periodo de mantenimiento (21 días) estuvieron por debajo del límite de detección del equipo ($0.05 \mu\text{g/ml}$). El cadmio en tejido de organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ por 96 h se muestra en la tabla 4, donde se pueden apreciar las concentraciones alcanzadas en condiciones de ayuno y alimentación.

Los organismos en condiciones de ayuno registraron niveles máximos de $27 \mu\text{g/gps}$ durante la fase de intoxicación y posteriormente en la fase de desintoxicación registraron un mínimo de $10 \mu\text{g/gps}$, liberando hasta un 63% de lo captado. En los organismos alimentados se alcanzaron $23 \mu\text{g/gps}$ a las 96 h, en este caso, durante la desintoxicación se liberó más del 90% de lo captado, registrandose niveles de $2 \mu\text{g/gps}$ a las 192 h.

Aunque las concentraciones alcanzadas en las dos condiciones experimentales (ayuno y alimentación) presentaron alta correlación ($r^2=0.8$) y no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p> 0.05$), la velocidad de captación fue diferente para cada condición experimental.

Tabla 4. Concentraciones promedio de Cadmio registradas en ostiones en ayuno y alimentados.

Tiempo (h) de intoxicación	Concentración de cadmio ($\mu\text{g/gps}$) en ostión en condiciones de AYUNO.	Concentración de cadmio ($\mu\text{g/gps}$) en ostión ALIMENTADO
0	0	0
0.5	6	7
1	7	6
2	9	7
4	9	7
8	10	5
24	15	17
48	15	-
72	25	15
96	27	23
Tiempo (h) de desintoxicación		
97	23	14
98	-	12
100	21	13
120	18	-
144	16	-
168	16	7
192	10	2
r^2	0.89	0.80
Promedio	15.08	9.6
$t_{1/2}$	123 h	116 h

6.2.3. Fracciones captadas de Cadmio

la fracciones captadas de cadmio se obtuvieron relacionando las concentraciones de Cadmio en ostiones expuestos, con los niveles registrados en agua en cada intervalo de tiempo, mismos que se muestran en la tabla 5. En organismos en ayuno se registró el valor máximo (192) a las 72 h de intoxicación y en los organismos alimentados el máximo valor (121) fue a las 96 h.

El factor de captación tuvo valores entre 10 y 100 hasta las 24 h de exposición en organismos en condiciones de ayuno y hasta las 72 h en organismos alimentados, posteriormente se presentaron concentraciones más altas (mayor de 100)

Tabla 5. Factor de captación parcial a diferentes tiempos de exposición en *Crassostrea virginica* en condiciones de ayuno y alimentados.

Tiempo de intoxicación (h)	Concentración de Cadmio en agua (µg/mL). Bioensayo en condiciones de ayuno.	Factor de Captación FC *(Cm/Ca)	Concentración de Cadmio en agua (µg/mL). Bioensayo con organismos alimentados.	Factor de Captación FC *(Cm/Ca)
0	0	-	0	-
0.5	0.11	63	0.11	63
1	0.17	41	0.13	46
2	0.14	64	0.12	58
4	0.16	56	0.10	70
8	0.38	26	0.13	38
24	0.12	125	-	-
48	-	-	0.18	-
72	0.13	192	0.16	93
96	0.17	158	0.19	121
Promedio	0.17	91	0.14	70

T0 = control y 0 corresponde a valores inferiores al límite de detección del aparato (0.05 µg/mL)

*(Cm/Ca)= (concentración en el molusco / Concentración en el agua)

6.2.4. Velocidad de captación y eliminación.

La concentración de cadmio registrada en los organismos experimentales con respecto al tiempo de intoxicación se presenta en la figura 5. La velocidad de captación, se ajustó a un modelo abierto de un compartimiento y velocidades ligeramente diferentes para las condiciones de ayuno y alimentación.

En bivalvos en ayuno, la velocidad de captación ($K_c = 32 \text{ ml/gps} \cdot \text{h}$) fue ligeramente mayor que en ostión alimentado ($K_c = 30 \text{ ml/gps} \cdot \text{h}$). En la figura 5 puede observarse las tendencias de la cinética de captación y desintoxicación de los organismos alimentados, en general captaron menos tóxico, que los organismos en condiciones de ayuno.

La velocidad de eliminación, fue mayor ($K_e = 0.006 \text{ 1/h}$) en organismos alimentados con respecto a organismos en condiciones de ayuno (0.0056 1/h), asimismo el tiempo de vida media fue de 116 h en organismos alimentados y de 123 h en condiciones de ayuno, lo cual podría sugerir que el alimento contribuye a que la permanencia del metal sea menor.

Como se observa también, en la figura 5 la eliminación de los organismos en ayuno se ajustó a un modelo monocopartamental y en los organismos alimentados existió una disminución de más del 10% de la concentración del tóxico en un periodo corto, posteriormente una velocidad constante hasta las 120 h y una eliminación rápida hasta las 192 h. menor velocidad durante el resto del proceso.

El ajuste cinético no es muy claro, pero durante la acumulación con alimento las concentraciones del cadmio permanecieron casi de manera general por debajo de las concentraciones registradas en organismos en ayuno. En los cortes histológicos se observaron respuestas secuenciales con respecto al tiempo de intoxicación. Mismas que se describen en detalle a continuación.

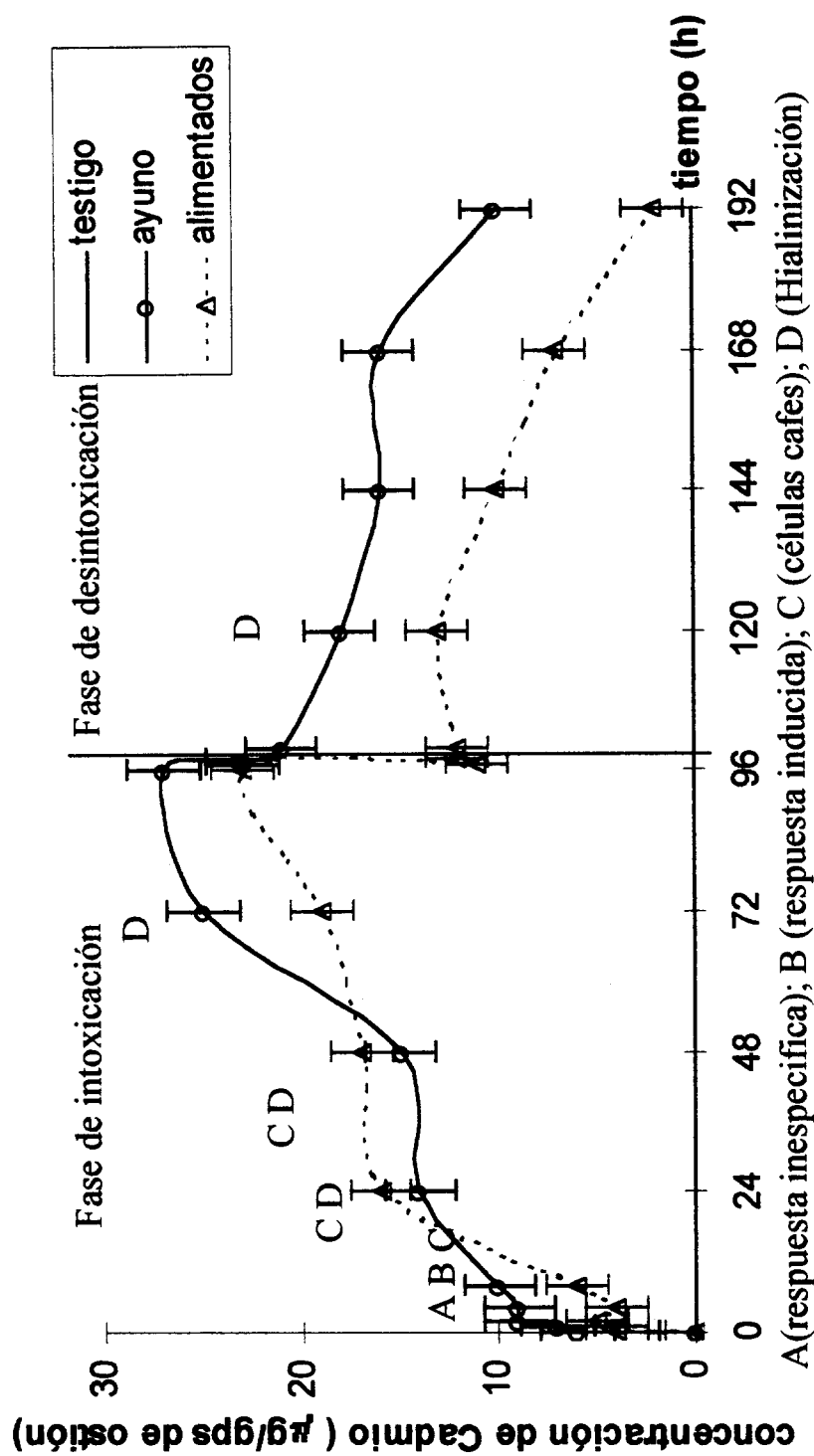


Fig.5. Concentración de cadmio y efecto histopatológico en ostión

6.2.4. Estudio Histopatológico

Las respuestas histológicas se clasificaron como A) respuesta inespecífica, B) respuesta celular inducida, C) células cafés y D) efecto de hialinización, las cuales pudieron ser asociadas al tiempo de intoxicación y depuración (Fig. 5).

En los cortes histológicos de la parte anterior de organismos testigo se caracterizó la anatomía microscópica del sistema digestivo; en cortes de la parte media: la glándula digestiva, el músculo abductor y la gónada; y en cortes de la parte posterior: la branquia y el manto. Solo se presentan las imágenes comparativas de los tejidos donde hubo los cambios histopatológicos evidentes relacionados con la exposición al cadmio.

A) Respuesta Inespecífica

La caracterización histológica del intestino evidenció que está rodeado por senos de hemolinfa, envuelto por tejido conectivo llamado de Leydig en esta especie y que presenta un epitelio columnar con cilios denominados tiflosoles (Fig. 6.A). Estas estructuras presentan un epitelio de transición ó grieta (Fig. 6.B) que separa el intestino medio del saco del estilete, que es el punto donde termina el epitelio denso ciliado, columnar simple, no-glandular del saco del estilete y empieza el tiflosol menor densamente ciliado, pseudoestratificado y columnar.

Se presentan regiones epiteliales en la luz de los túbulos de la glándula digestiva y el borde del manto (Fig. 6.C), el cual está dividido en tres proyecciones lobulares con distinta función sensorial.

En los casos en los que se registro la respuesta inflamatoria inespecífica, está estuvo caracterizada por secreciones que se observaron preferentemente en el epitelio ciliado de órganos y tejidos expuestos 30 min al cadmio (Fig. 7). Las secreciones en el epitelio del intestino, en los túbulos de la glándula digestiva, manto y entre el tejido de Leyding teñidas

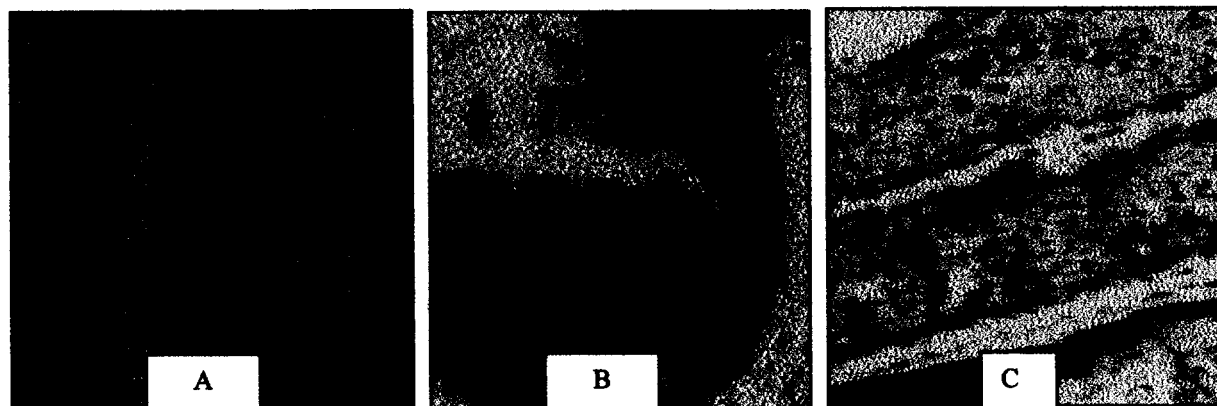


Fig. 6. Organismos no intoxicados A) Porción del complejo saco del estilete-intestino medio, grandes tiflosoles (GT) y el seno de hemolinfa (S) entre el tejido de Leyding. B) Grieta de terminación de GT de la parte media y C) lóbulos del manto con proyecciones sensitivas más fuertemente teñidas en el lóbulo interno (Tinción H-E: A 100X; B 400X y C 100X).

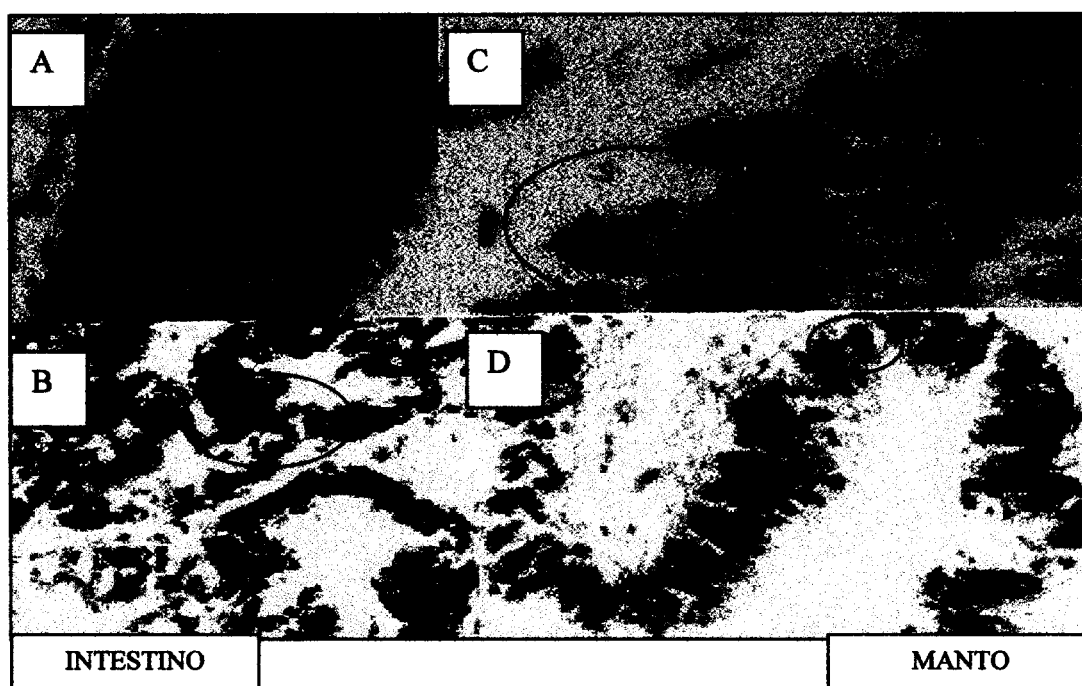


Fig. 7. Organismos intoxicados A) Secreciones (S), en la región luminal del epitelio cilíndrico estratificado del estómago; en los túbulos de la glándula digestiva (B) y en el manto (C-D) (Tinción H-E; A 400X; B , C y D 100X)

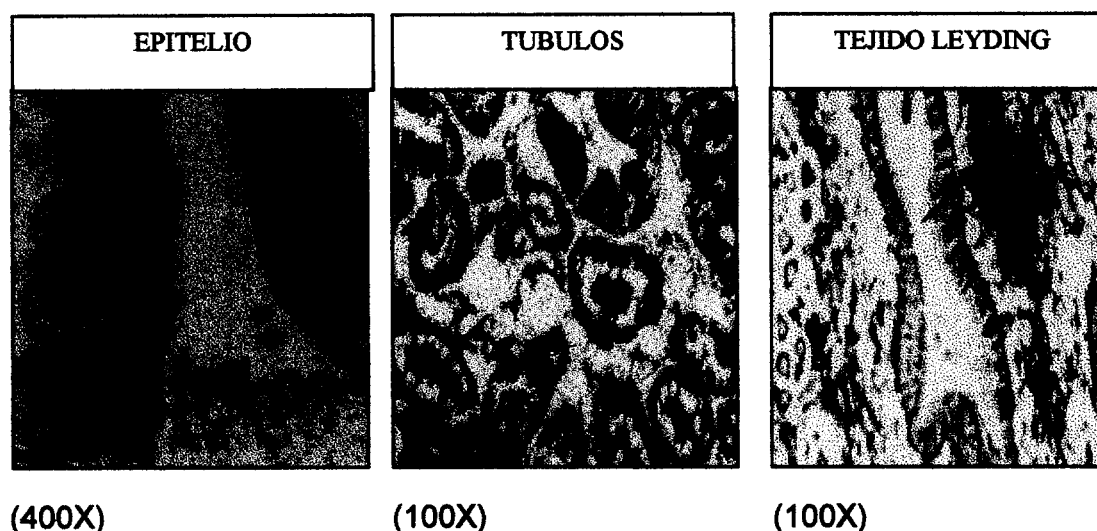


Fig. 8. Respuesta PAS-positiva (—>) que evidenció la presencia de mucopolisacaridos de tipo neutro, en las secreciones de ostiones expuestos a cadmio.

con la técnica de PAS, mostraron reacción positiva, revelando que correspondían a mucopolisacaridos de tipo neutro reportados como de baja viscosidad en estos organismos (Fig. 8).

B) Respuesta Celular inducida

El sistema circulatorio de *Crassostrea virginica* es abierto, los constituyentes de la hemolinfa se han denominado hemocitos y se han clasificado en dos categorías: granulocitos e hialinocitos. Estos grupos celulares intervienen en la reparación de heridas, reparación de la concha, digestión, transporte de nutrientes, excreción y en la defensa interna.

En organismos no intoxicado se observaron hemocitos en el tejido de Leydig, muy cerca de los senos linfáticos (Fig. 9); en contraste, grupos de

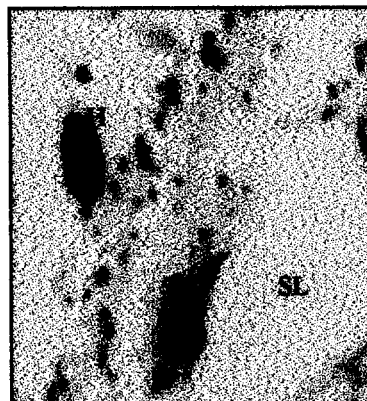


Fig. 9. En ostión testigo, corte posterior de los senos linfáticos (SL) de la branquia con un Hemocito (H) muy cerca del tejido de Leydig. (Tinción con H-E 100X).

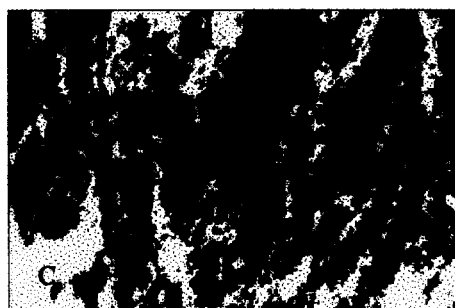
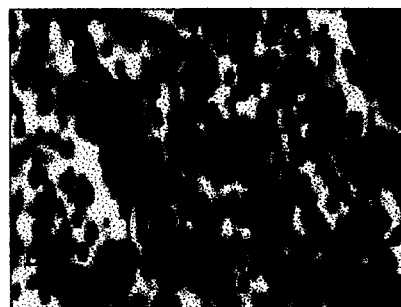
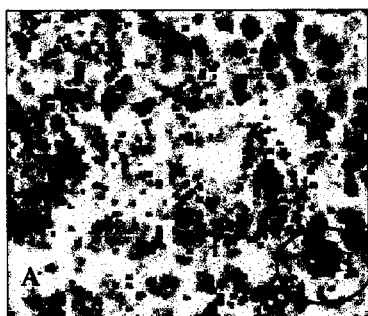


Fig.10. Respuesta celular inducida a las 2 (A), 8 (b) y 96 h (C) de exposición, se observan grupos celulares tipificados como granulocitos (G) y algunos hialinocitos (H). (Tinción de H-E A y C100X; b 400X).

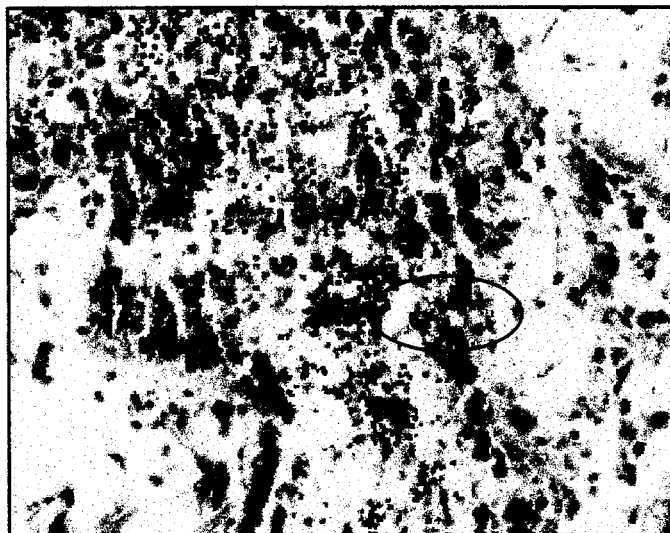


Fig. 11 Infiltración de granulocitos (G) en el tejido de Leydig (H-E 100 X)

hemocitos, fueron evidentes en la intoxicación con cadmio desde la segunda hora de exposición y hasta las 96 h, lo que manifiesta un mecanismo de defensa. En las figuras 10 y 11 se observa la aparición e infiltración masiva de estos grupos celulares con apariencia migratoria.

C) Células Café

En condiciones normales, el sistema excretor está reducido a células mesoteliales granulares, llamadas células cafés (Fig. 12), estas células se localizan en todo el cuerpo del ostión, pero están más concentradas en la parte anterior del músculo abductor. La presencia de estas células fue mayor desde los 60 min de exposición al cadmio (Fig. 13) y aparecieron en forma paralela a las células hemocíticas (Fig. 14).

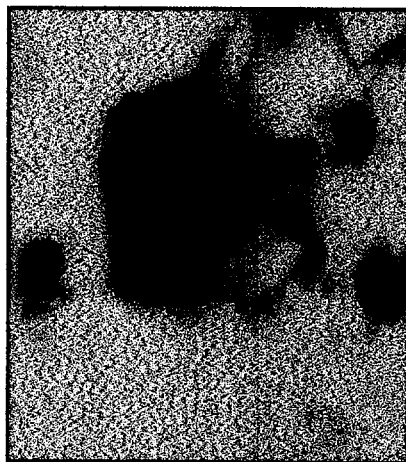


Fig.12. Célula café aislada en moluscos bivalvo, posiblemente de la glándula pericardial. Tinción H-E.(1000X)

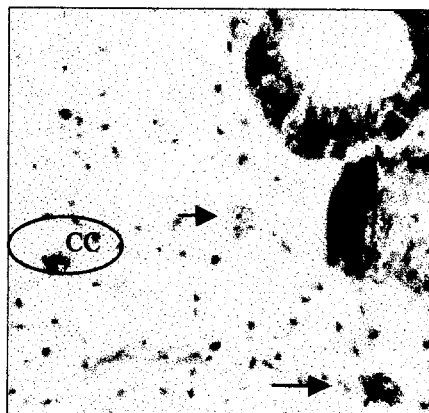


Fig.13. Después de dos horas de intoxicación ya se aprecia el pigmento café (CC) en el tejido de Leydig de *Crassostrea virginica* .(Tincion H-E 100X)



Fig. 14. Células café (CC) y hemocíticas (H) en laminas branquiales (H-E 100X)

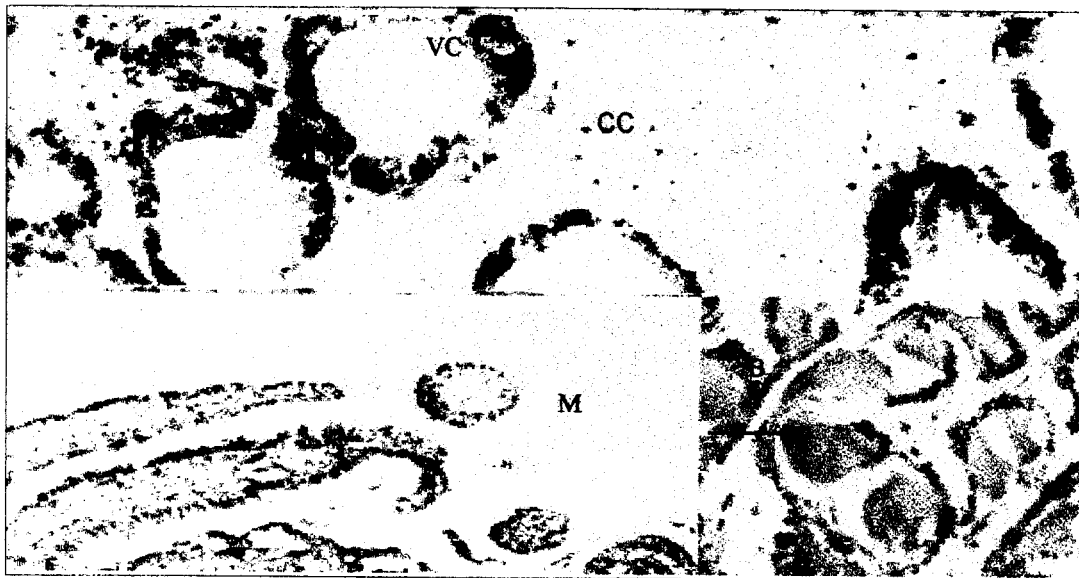


Fig. 15. Túbulos de la glándula digestiva, aparecen células café, en el tejido conectivo adyacente. Algunas de las células presentaron signos patentes de vacuolización citoplasmática (VC), y partes de lo que aparenta ser el manto (M) y las branquias (B) hialinizado. (H-E X100)

D) Hialinización

Los organismos expuestos más de 72 h, presentaron hialinización en algunos tejidos u órganos como las branquias, túbulos digestivos y el manto. En las células hialinizadas, el citoplasma es acidófilo y translucido característico de células con a lesión mortal. Este aspecto se observó todavía en las siguientes 96 h de la fase de desintoxicación, sin embargo también se observó la presencia de células cafés y hemocíticas (Fig 15).

E) Efectos en Gónada , Branquia y Músculo Abductor

Gónada

Las estructuras gonadales de *Crassostrea virginica* en organismos no intoxicados, se observaron dentro de una cápsula llamada ovígera que las rodea, los ovocitos presentaron un gran núcleo con el nucleolo aparente (Fig. 16). Estas estructuras se vieron fuertemente afectadas antes de las 12 hrs de exposición, tiempo en el que los efectos inflamatorios y de hialinización fueron evidentes, con una pérdida de la cápsula ovígera y de la relación núcleo-citoplasma como se observa en la figura 17, en tiempos consecutivos de exposición.



Fig. 16. Sección transversal de un ovocito en organismo testigo, teñido con Hematoxilina-Eosina (H-E) se observa el núcleo (N) y el nucleolo (NU) (400X)

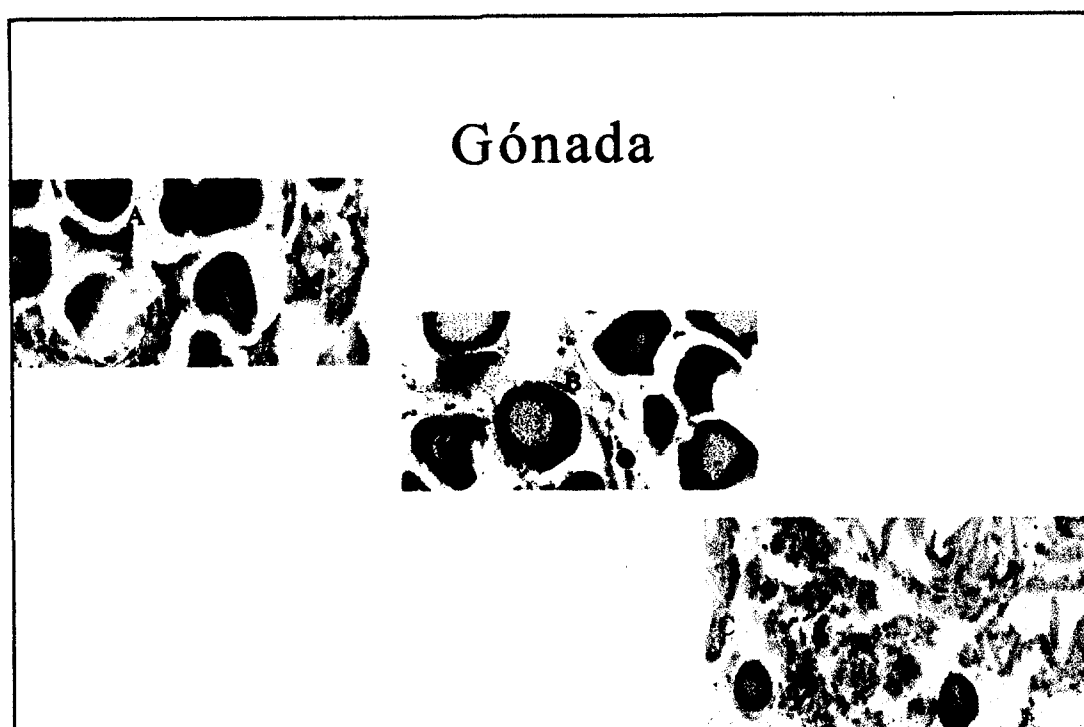


Fig. 17. Cápsulas ovigeras de los gametos con ruptura (A) a las 2 h de intoxicación; a las 4 horas basofilia citoplasmática (B) abundante con pérdida del nucleolo y alteración en la forma celular. Granulación basófila citoplasmática (C), con efectos claros de la hialinización a las 8 h. (H-E 100X).

Branquia

La branquia es el órgano de respiración y también participa en la selección de las partículas alimenticias, está compuesta por láminas como se observa en un corte de organismos de ambiente natural (Fig. 18). En los organismos intoxicados se observó un efecto gradual en la branquia hasta su hialinización a las 96 h de intoxicación, sin embargo en el periodo de desintoxicación es uno de los órganos donde aún se observaron células café y hemocíticas, evento al parecer importante, ya que al inicio de la intoxicación los hemocitos parecen migrar desde la branquia y el manto (Fig. 19).

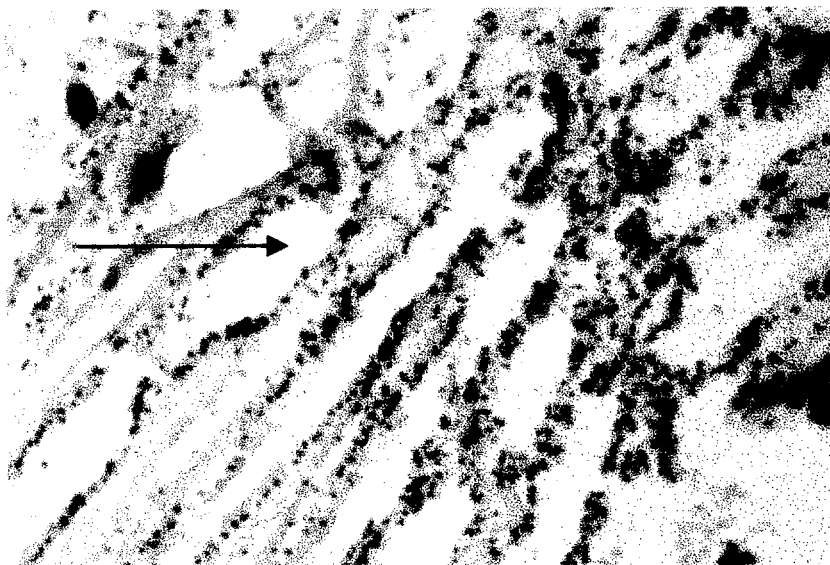


Fig. 18. Sección longitudinal de branquia normal, se observa la luz de los tubos de agua (Tinción H-E 100X).



Fig. 19. A) Sección longitudinal y B) transversal de la branquia expuesta a cadmio. La parte externa presenta una mayor tinción basófila.

Músculo Abductor

Normalmente las fibras del músculo abductor de ostión no expuesto permiten el cierre rápido y lento de la concha, estas fibras son estriadas y nucleadas (Fig. 20). En organismos intoxicados estas fibras fueron afectadas de manera no precisa durante la exposición, sin embargo durante el tiempo de desintoxicación no se observó un proceso de cicatrización evidente, lo cual sugirió que órganos y tejidos fueron afectados de manera diferente durante la intoxicación.

Un resumen comparativo de los cambios histopatológicos registrados en este trabajo se muestran en la Figura 21, en la parte superior se encuentran las imágenes de los organismo testigos.

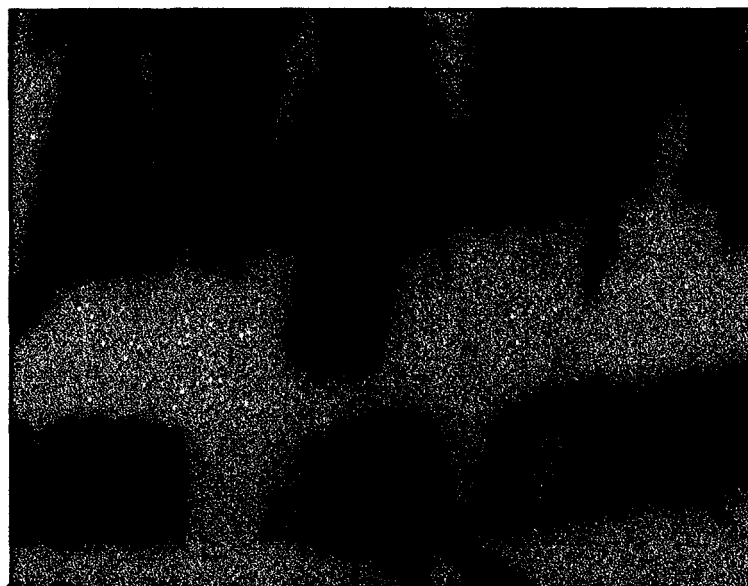


Fig. 20 Fibras del músculo abductor (MA), en la parte externa se aprecia parte del manto (Tinción H-E 100X)

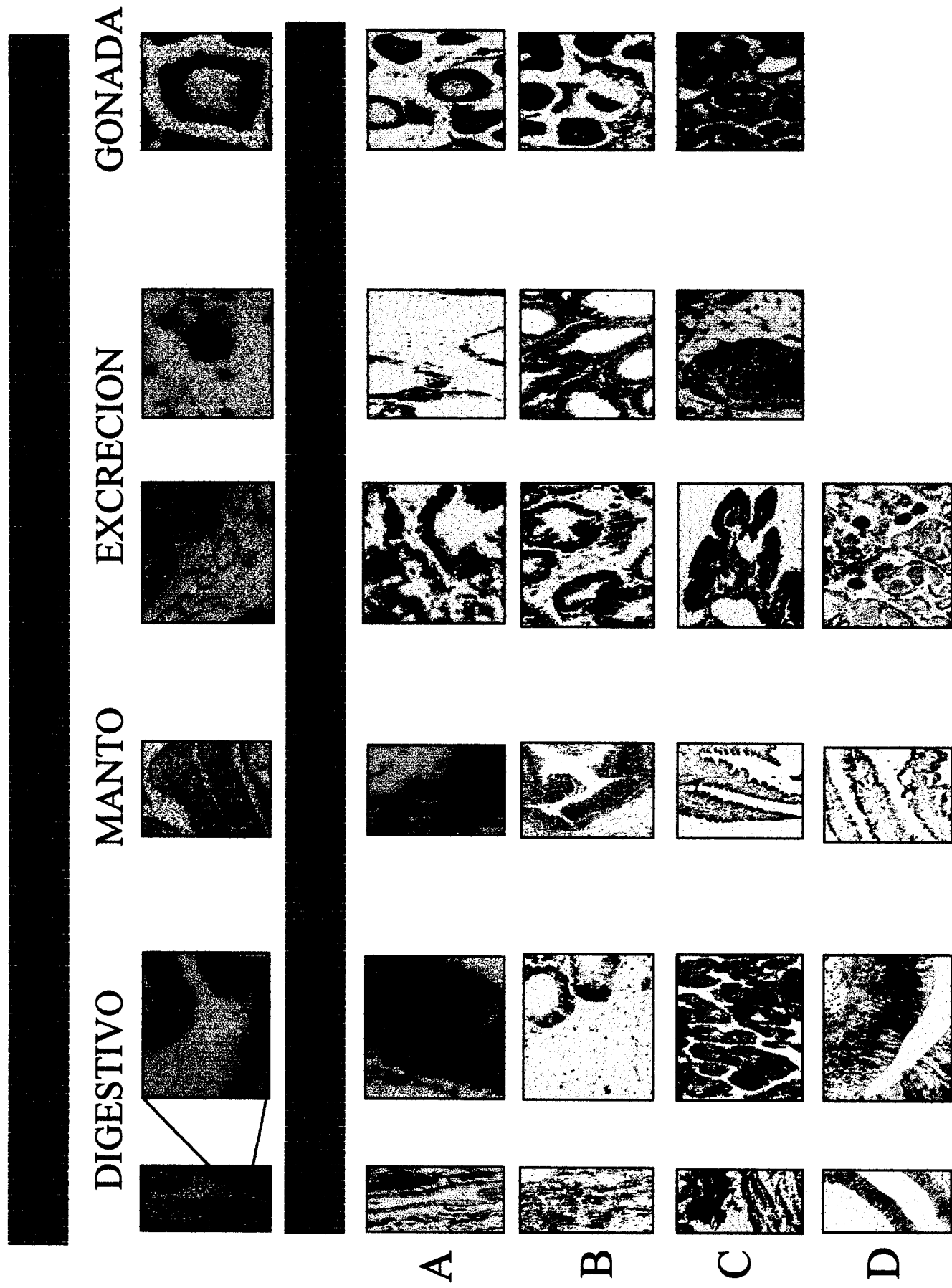


Figura 21. Cambios histopatológicos en órganos y tejidos del ostión.

7.0. Discusión

Los resultados indicaron que los organismos fueron capaces de adaptarse a las condiciones controladas de laboratorio. El alto índice de estado de los moluscos sugirió que tenían condiciones fisiológicas aceptables, antes de su exposición al tóxico. El periodo de mantenimiento fue adecuado ya que, los parámetros presentaron poca variación, y estuvieron cercanos a los recomendados para el cultivo de estos organismos. Los datos morfométricos indicaron que los organismos tuvieron más del 90% de agua y de acuerdo a su talla, esto indica que se puede tratar de organismos adultos; capaces de desovar, con un peso individual de más 0.65 gms, y 50 mm de longitud (Hayes y Nenzel, 1981). Powell *et al.*, (1992) establecieron un modelo de clasificación por tallas y desarrollo gonadal considerando 10 tamaños de clase. En esta, la clase 1-3 representa juveniles y de la clase 4 en adelante se consideran adultos con longitudes arriba de 50.0 mm. De acuerdo con esto, los organismos experimentales se encontraron en la clase 5, por lo que fueron clasificados como organismos recientemente reproductivos.

El mantenimiento y los datos morfométricos permitieron asegurar que el estado y tamaño de los lotes era aceptable y homogéneo. Lo cual evitó que la variación fisiológica complicara el análisis de la relación entre la cantidad total de metales en tejidos y el estado fisiológico de los organismos (Depledge y Bjerregard, 1989). Por otro lado, también es inevitable que llegen a presentarse, variaciones relacionadas con la emisión de gametos y las reservas energéticas almacenadas por la disposición de alimento, tamaño y estación climática (Nelson *et al.*, 1996).

Rosas *et al.*, (1983) reportaron concentraciones de 0.002 mg/L en agua y 1.54 $\mu\text{g/gps}$ en ostión *Crassostrea virginica*, señalando que, las concentraciones en ostión superaron el LMP para consumo humano de la FDA (1971)) que señala 0.135 $\mu\text{g g}^{-1}$; estudios posteriores han corroborado esto, al señalar niveles de 3.13 $\mu\text{g/gps}$ en ostión de dicha laguna (Villanueva y Botello, 1998). Las concentraciones de cadmio en el ostión de la laguna de Mandinga indican, que el recurso supera el LMP de cadmio de la FDA así como el de Nauen (1983) para consumo humano que señala 2.0 $\mu\text{g/gps}$ de cadmio.

El riesgo potencial para los consumidores, está en función de la frecuencia del consumo de este producto, además de las fuentes adicionales de exposición a cadmio. Se ha calculado que la tasa de incorporación por consumo de ostiones debe ser menor de 100 μg de Cd/día, Aunque en áreas contaminadas se ha estimado que llega a ser hasta de 150 $\mu\text{g/día}$ (Lippmann, 1992). En nuestro país las formas tradicionales de consumo son en promedio de 12 organismos ó 200 g de peso húmedo, lo que implicaría un concentración de 24 μg de Cd/día que podría ser peligroso solo en poblaciones con alto consumo de ostión.

En el agua de la laguna de Mandinga las concentraciones de cadmio superaron los niveles sugeridos como aceptables según los criterios de calidad del agua como límite para protección de la vida acuática (0.9 $\mu\text{g L}^{-1}$) e incluso el criterio de la EPA que señala que no se debe exceder nunca de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los concentraciones de cadmio en agua están sujetos a cambios ambientales y de aportes, sin embargo Rosas *et al* (1983) señalaron que existe un alto factor de bioconcentración de cadmio en relación con otros metales tóxicos en el ostión de esta zona.

En el sedimento, algunos metales han presentado rangos entre 10 y 60 % de biodisponibilidad. En la laguna de Mandinga, Se ha reportado $1.09 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd total, del cual $0.80 \mu\text{g g}^{-1}$ se encuentra en forma biodisponible (Villanueva y Botello *et al.*, 1998). Esto indica que más del 70% del cadmio registrado, se encuentra en forma biodisponible en los sedimentos de esta laguna salobre. La biodisponibilidad y en consecuencia los efectos en los organismo se incrementan cuando la salinidad es baja, lo cual se explica porque la concentración de iones cloruro decrece incrementándose la concentración de iones Cd^{++} libres al disminuir la salinidad, lo que aumenta su biodisponibilidad (McLusky *et al.*, 1986). Bjerregard y Deplege (1994), informaron que existe un decremento del 38% en la tasa de captación, cuando la salinidad se incrementa de 10 a 30 ‰.

Los intervalos de temperatura utilizados en el biensayo ($24.5 - 25^{\circ}\text{C}$) son semejantes en muchos cuerpos acuáticos mexicanos, incluyendo Mandinga. Estas temperaturas, una salinidad de 22‰ y pH neutro son factores combinados que influyen en la biodisponibilidad del cadmio (Denton y Burdon-Jones, 1981) y a su vez en la tasa de captación en moluscos (Rainbow *et al.*, 1990).

El pH bajo también puede favorecer la disolución de cadmio (U.S. EPA, 1979). Los cambios en temperatura y el medio osmótico están asociados con los cambios en la concentración de metales y su efecto sobre órganos de distribución (Depledge y Bjerregard, 1989).

Las condiciones de exposición de metal empleadas en este trabajo, así como las que existen en las lagunas costeras mexicanas, como Mandinga, podrían favorecer la toxicidad del Cadmio.

Las principales rutas de incorporación de metales en invertebrados acuáticos son el agua y el alimento (Timmermans *et al.*, 1992). La captación del cadmio en los moluscos está en función de las condiciones de exposición, de los estados fisiológicos, reproductivos y de excreción, que sufren variaciones, así que la interpretación de los mecanismos puede complicarse por estos y otros factores que intervienen durante la fase de exposición y toxicocinética.

El control de los parámetros fisicoquímicos durante los bioensayos de exposición a cadmio fue importante, toda vez que, la incorporación del metal desde la solución acuosa, depende en gran parte de estos (Louma, 1983), además de tener un efectos fisiológico a corto plazo (Phillips y Rainbow, 1993).

En diversos trabajos toxicológicos *Crassostrea virginica* ha sido expuesta a dosis subletales de cadmio por periodos que van de 21 días hasta 40 semanas con bajo porcentaje de mortalidad (Zaroogian, 1979, Zaroogian y Morrisson, y 1981; Frazier y George, 1983). En el presente trabajo, la tasa de mortalidad fue nula, por lo que se consideró apropiada para la evaluación de efectos subletales en *Crassostrea virginica*.

La acumulación de cadmio a 96 h en *Crassostrea virginica* mostró niveles entre 23 y 27 $\mu\text{g/gps}^{-1}$, que son análogos a los que se han reportado para *Crassostrea gigas* ($21\mu\text{g g}^{-1}$) expuesto por 12 semanas a las mismas concentraciones de cadmio (APHA, 1995). También se han reportado concentraciones de alrededor de 274 $\mu\text{g/gps}^{-1}$ en *Crassostrea virginica* expuesto durante 40 semanas a 0.015 ppm de cadmio (Zaroogian, 1979), lo que sugiere que la bioconcentración se relaciona con el tiempo de exposición, sin embargo los resultados de este trabajo señalan que hay

cambios morfofisiológicos importantes desde antes de las 96 h de exposición y que no hubo recuperación en la fase de desintoxicación, por lo que es importante dilucidar las reacciones metabólicas que le permiten sobrevivir largos periodos de exposición con altas concentraciones de cadmio.

El factor de captación fue de alrededor de 140 para organismos en ayuno y alimentados, un factor similar (149) al reportado por Eisler (1972) al exponer *Crassostrea virginica* por 21 días a cloruro de cadmio.

Las concentraciones máximas captadas por los organismos en el estado de ayuno y con alimento no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.95$), lo que significa desde una perspectiva toxicocinética que casi la misma cantidad de tóxico es captada por el tejido independientemente del estado (ayuno, alimentado). Los organismos que fueron alimentados, presentaron concentraciones del metal menores que los organismos en ayuno, lo cual sugiere que el estado nutricional puede otorgar a los organismos ventajas para ejecutar sus mecanismos de desintoxicación y excreción.

En ambos experimentos el aumento en la velocidad de captación podría asociarse con cambios en la permeabilidad, con la saturación de mecanismos de desintoxicación o con un decremento en la tasa de eliminación, que favorecen la concentración de cadmio. Los tejidos de los animales de ambos experimentos señalan estados fisiológicos parecidos en intervalos similares de tiempo.

Al incrementarse paulatinamente los niveles de cadmio en tejidos, los organismos que no pueden controlar un cambio fisiológico sobre su permeabilidad (Campbell y Jones, 1990), y esto tienen un subsecuente

efecto sobre la tasa de captación. La captación de metales puede explicarse a través de un proceso de difusión facilitada (Simkiss y Taylor, 1989), de pinocitosis de partículas ricas en metal a través de las branquias de los moluscos (George y Pirie, 1980), o por transporte activo por bomba de calcio (Wright, 1980). Una vez que ha sido captado el metal este puede interactuar con gran cantidad de proteínas antes de su distribución por todo el organismo. Como consecuencia, durante la depuración, la liberación del metal se ve limitada por la alta afinidad que tienen los metales pesados por las moléculas orgánicas, al unirse a nitrógeno o azufre.

Dentro de las respuestas fisiológicas, evidentes a nivel histológico, se observaron las secreciones presentes desde los primeros 30 minutos de exposición, estas fueron identificadas como mucopolisacaridos neutros (NMPS) de baja viscosidad, de acuerdo a su reacción positiva para la técnica de APS. Este tipo de secreciones se han asociado con funciones de exclusión de partículas en moluscos bivalvos (Beninger y St-Jean, 1997). En algunos invertebrados acuáticos se ha reportado la formación de gránulos inertes, posiblemente de glucógeno, como un mecanismo común de desintoxicación. Estos gránulos no son redisueltos y en consecuencia pueden ser excretados (George y Pirie, 1980).

La interacción de los organismos con el metal propicia también respuestas derivadas de la interacción con compuestos endógenos. Así, las sales de cadmio pueden ser modificadas al contacto con el pH del ácido gástrico y transformadas en cloruro de cadmio, que podría tener tendría un efecto inflamatorio sobre las mucosas del estómago e intestino.

El incremento en el número de las células cafés después de los 60 min de exposición, que se observó en el tejido conectivo intersticial de los

túbulos que conforman la glándula digestiva, así como en las zonas de inflamación; concuerda con los resultados reportados por Zaroogian y Yevich (1994) en *Crassostrea virginica*, señalando dichos autores, que las células cafés poseen glutatión reductasa, fosfatasa ácida y lisoenzimas lo cual indica, que las células y las vesículas cafés pueden participar potencialmente en los procesos degradativos y de desintoxicación.

Una respuesta que al parecer interviene en la sobrevivencia de los organismos, y se presentó paralelamente con las células cafés fue la inducción de gran cantidad de células nucleadas algunas reconocidas morfológicamente como hialinocitos y otras semejantes a las reportadas como granulocitos, que actúan como un mecanismo de defensa interno. Sin embargo, se requiere identificar con técnicas específicas esta respuesta humoral, ó "respuesta celular inducida" , respuesta análoga a la reportada por Cheng (1990) en *Crassostrea virginica*. Y que en *Crassostrea gigas* se ha establecido como una asociación de metal a amibocitos (Thomson *et al.*, 1985).

Existen otros procesos de desintoxicación que están bien identificados, como el relacionado con las metalotioneinas, las cuales son proteínas ricas en sulfuro de bajo peso molecular que tienen gran afinidad por el cadmio (Roesijadi, 1981 y 1982). También se ha señalado que cuando existe la captación de un metal no esencial, este presumiblemente es biotransformado a una forma no disponible mediante ligandos a moléculas de alto peso molecular (Nelson *et al.*, 1996). De acuerdo con esto, es posible que los moluscos, expuestos a cadmio, excreten el metal en forma no tóxica o bien este se mantenga en "pools" metabólicamente disponibles, o en forma no disponible, originando quizás un incremento en

la velocidad de captación, Cuando estos mecanismos de desintoxicación se saturan, la tasa de incorporación excede a la de desintoxicación.

El hecho de que el cadmio se enlace fuertemente a macromoléculas celulares que no estén implícitas en la respuesta tóxica como las metalotioneinas podría provocar que aparentemente, no exista una correlación entre los niveles de cadmio de tejido corporal total y el efecto adverso, como lo indican los estudios histopatológicos.

La aparición de gránulos (posiblemente de glucógeno) o de la respuesta celular inducida, coincide con el incremento de la velocidad de captación. Esta respuesta se mantuvo hasta las 96 h, y la gran cantidad de células impidió la caracterización de los tejidos u órganos. Sería recomendable la utilización de la técnica PAS-diestasa para corroborar la presencia de glucógeno en futuros estudios.

La alta tolerancia de estos moluscos al cadmio posiblemente se vincule con la naturaleza de los gránulos observados y con ajustes metabólicos durante la fase de exposición al metal. Uma (1996), señaló que la relación glucógeno-proteína decrece al cuarto día (96 h) de exposición a cadmio, debido a que el consumo de oxígeno disminuye y se incrementa la utilización de glucógeno-carbohidratos; si bien, esta relación tiene posibilidades de recuperarse e incluso superar los niveles iniciales de glucógeno-proteína al décimo día, ya que la activación de la anaerobiosis se activa como un mecanismo para enfrentar las condiciones de estrés al cadmio.

La determinación de metal en el organismo completo, fue adecuada para la interpretación de los resultados, ya que conceptualmente la

determinación de metal también se aplica a la compartimentalización en tejidos u órganos, ya que el contenido de metal en todo el cuerpo es la suma del contenido en tejidos separados, en tanto que, uno o más órganos pueden actuar como sitios de acumulación para todo el cuerpo (Depledge y Rainbow, 1990).

Los resultados indicaron que *Crassostrea virginica* fue tolerante a 100 µg/L de cadmio, y que se presentaron cambios metabólicos importantes antes de las 96 h de exposición.

La fase de desintoxicación nos permitió calcular el tiempo de vida media el cual fue mayor, en los organismos en estado de ayuno.

En la primera fase de la desintoxicación, se observó la desaparición de los grupos celulares inducidos y un efecto de hialinización en órganos y tejidos que prevaleció posteriormente hasta el final de la fase de desintoxicación. No fue posible observar en el tiempo de la depuración la recuperación de los tejidos, por lo que se recomienda prolongar el tiempo de desintoxicación.

En el caso de la gónada podemos decir que morfológicamente fueron afectadas durante la intoxicación, las cápsulas ovígeras y los gametos. Hubo una evidente pérdida de la relación núcleo-citoplasma, basofilia y picnosis del nucleolo, que sugieren cambios importantes en el DNA.

Los resultados de este trabajo sugieren que, los bioensayos subletales en estos organismos bentónicos deberían ser efectuados en espacios menores a las 72 h y que, las pruebas de exposición a cadmio en

periodos largos deberían considerar la activación de las respuestas fisiológicas.

La biodisponibilidad del metal, la variabilidad individual que depende del estado fisiológico y el tamaño de los organismos, pueden complicar la interpretación de la acumulación de metal. Encontrar niveles "normales" en poblaciones naturales resulta complicado, por la gran cantidad de fuentes de cadmio sin embargo las concentraciones "basales" de cadmio en los organismos de prueba, se encontraron debajo de los límite de detección del aparato de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), permitiendo con esto, hacer las comparaciones en las concentraciones captadas. Estas comparaciones son posibles, particularmente cuando incluyen poblaciones expuestas a concentraciones inusuales biodisponibles (100 µg/L) y son la base de algunos programas de biomonitoreo de metales (Phillips y Rainbow, 1993)

Algunos estudios abordan el perfil toxicocinético, particularmente en el proceso de bioconcentración, sin embargo no existe o es muy escasa la información sobre la relación de la toxicocinetica y la histopatología para el cadmio en *Crassostrea virginica*. Es claro que la respuesta biológica fue la prueba más discriminativa del daño tóxico.

El reconocimiento del potencial ecotoxicológico del cadmio en condiciones análogas a las lagunas mexicanas, es de suma importancia, toda vez que las condiciones ambientales de exposición y la dinámica metabólica de los organismos puede favorecer la acumulación con respecto a lugares no tropicales, ubicando nuestros recursos en peligro ya que no se tiene una legislación generada con pruebas de estos ambientes de manera

adecuada. Sin embargo la sobrevivencia puede depender del tiempo de exposición y de la capacidad de regeneración de los tejidos.

Crassostrea virginica presentó dinámicas de respuesta rápidas y muy posiblemente de recuperación, sin embargo su papel como organismo apto para biomonitoreo de contaminación debería incluir la interpretación de sus respuestas fisiológicas, que le permiten una rápida tolerancia en periodos cortos de exposición.

Conclusiones

- Los antecedentes bibliográficos y los datos puntuales de este trabajo señalaron una tendencia general a incrementarse de los niveles de cadmio en la laguna de Mandinga, en agua y ostión encontrándose este último en concentraciones no aptas para el consumo humano.

- Los resultados indican que la concentración de 100 µg/L de cadmio fue adecuada para la evaluación de efectos subletales en esta especie

- Los resultados indicaron que entre las 24 y las 48 h se presentó un proceso de acumulación semiestabilizado que coincide con la activación de mecanismos de tolerancia -resistencia.

- El incremento en la velocidad de captación se relacionó con una velocidad de eliminación menor y bifásica.

- La toxicocinética en *Crassostrea virginica* expuesta a 100 µg/L favorece la absorción en las primeras horas de exposición, posteriormente los procesos de distribución y eliminación junto con las respuestas metabólicas son determinantes en la respuesta tóxica.

- La vida media de Cd fue de alrededor de 116 h en organismos alimentados y de 123 h en condiciones de ayuno.

- Se vislumbra que el ostión tiene cierta capacidad de recuperación del tejido en un medio libre de metal y se sugiere prolongar el tiempo de

depuración para evidenciar los mecanismos de reparación de los organismos expuestos.

- *Crassostrea virginica* en un medio libre de metal depuró más del 60% de cadmio por lo que se considera buen indicador de monitoreo a corto plazo.

- Es importante evaluar las respuestas fisiológicas de estos organismos en zonas con ambiente tropical, como las lagunas costeras mexicanas para el establecimiento de los LMP y las normas de conservación, cultivo y explotación.

8.0. Bibliografía

APHA (American Public Health Association). 1995. Standard Methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association**, Washigton, DC. Sections: 3000, 3500 y 8610.

Bardach, J., Ryter J. y W. Clarney. 1992. **Acuacultura**. AGT ED. México, D.F. 73 pp.

Barrera, E. G., Wong, Ch. I, Guzmán G. X., y R.P. Ramírez, 1998. Lethal effects of Cadmium and Cromium in the American oyster *Crassostrea virginica*. **SETAC** 19th Annual Meeting. 15 -19 de Noviembre. pHA007 : 257 p.

Beninger, P.G. y S.D. St-Jean. 1997. The role of mucus in particle proccessing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. **Mar. Biol.** 129 : 389 - 397 p.

Bjerregaard, P y M. H. Deplege. 1994. Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*; the influence of salinity and calcium ion concentrations. **Mar. Biol.** 119 : 385 - 395 p.

Boyles, S.A. , Powell, E.N., Taylo, R. y J. Gauthier. 1991. Gulf of Mexico oysters: Histopathology, parasites and heavy metals. **J. Shellfish. Res.** Portland. USA . 10 (1) : 276 - 277 p.

Bruggeman, W.A. 1998. Bioaccumulation. **Aquatic Toxicology**. John Wiley & Sonss, Inc. USA : 149 - 1153 p.

- Campbell, R. S. and M. B. Jones. 1990. Water permeability of *Palaemon longirostris* and other euryhaline caribbean prawns. *J. Exp. Biol.* 150: 145 - 158 p.
- Castrejón, O.L., D. D. Porras, y S. Ch. Band. 1994. Cultivo de alimento vivo para la acuicultura. Ed. INI-UNI. Del Mar, Oax. Mexico : 118 pp.
- Cheng, T.C. 1990. Effects of in vivo exposure of *Crassostrea virginica* to heavy metals on hemocyte viability and activity levels of lisosomal enzymes. *Pathology in Marine Science*. Academic-Press. 513 - 524 p.
- Coll, M. 1982. Acuicultura Marina Animal. **Mundi-Prensa**, Madrid, España. 669 p.
- Clark , S.L., Werner, I., Kaufman y D.E. Hinton. 1997. Histopathology, metallothionein, stress and enzyme and inmunohistochemistry as biomarker for cadmium exposure in Asia clam. *Potamocorbula amurensis*. SETAC. USA. PTPO 099.
- Denton, G. R. W. y C. Burdon-Jones. 1981. Influence of temperature and salinity on the uptake, distribution and depuration of mercury, cadmium and lead by the black-lip oyster *Saccostrea echinata*. *Mar. Biol.* 64: 317 - 326 p.
- Depledge. M.H. y P. Bjerregaard. 1989. Explaining individual variation in trace metal concentrations in selected marine invertebrates: the importance of interactions between physiological state and environmental factors. In. J.C. Aldrich (Ed.) Phenotypic responses

and individuality in aquatic ectotherms. **JAPAGA**, Ashford, Ireland : 121 - 126 p.

Depledge, M. H. y P.S. Rainbow. 1990. Models of regulations and accumulations of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol.* 97 : 1 - 7 p.

Diario Oficial de la Federación . 1973. Reglamento para la prevención y control de la contaminación de las aguas, México, 29 de marzo.

EPA (Environmental Protection Agency). 1979. Ambient water quality criteria for cadmium. Washington, D.C. **EPA44015-80-025** : C-110 p.

EPA (Environmental Protection Agency). 1984 a. Ambient water quality criteria for cadmium. Washington, D.C. **EPA440/5-84-029** : C-124 p.

EPA (Environmental Protection Agency). 1984 b. Ambient water quality criteria for cadmium. Washington, D.C.USA. **EPA B 440/5-84-032** : C-87 p.

Eisler, R. 1972. Cadmium uptake by marine organisms. *Jour. Fish. Res. Board Can.* 29 : 1367 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1993. Manual de Métodos de Investigación del Medio Ambiente Acuático. Parte 9. Análisis de la presencia de metales y organoclorados en los peces. **FAO. Doc. Tec. Pesca 212** : 35 p.

- Filov, V.A., A.L. Badman y B.A. Ivin. 1993. Harmful Chemical substances. **Ellis Horwood**, N. Y. 722 p.
- Frazier, J.M. y S.G. George. 1983. Cadmium kinetics in oysters a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. **Marine Biology**. 6 : 55 - 61 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ªed. Enriqueta García de Miranda, México, D.F. : 220 p.
- George, S. G. y B.J.S. Pirie. 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis*: a combined ultraestructure and bioquímicaal study. **J. Mar. Biol. Assoc.** 60 : 575 - 590 p.
- Hayes, P. F. y R. W. Nenzel. 1981. The reproductive cycle of early settling *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the northern Gulf of Mexico, and its implications for population recruitment. **Biol. Bull (Woods Hole)** 160 : 80 - 88 p.
- Hernández, V.E. 1996. Estudios de metales tóxicos y esenciales. Su biodisponibilidad en sedimento y organismos de la laguna de Mandinga, Veracruz, México. Reporte final de Servicio social para la carrera de Hidrobiología. **UAMI, México**. 45 p.
- Huan, SCh. T. 1994. General Guidelines for the Acid Digestion of Fish and Shellfish. Executive Yuan Environmental Protection Agency, Republic of China. Reference 83 Method Number NIEA C303 01T. **Official Gazette** 7 : 1 - 6 p.

- Laing, L y C. Gil, 1991. Nutritional value of spray-dried *Tetraselmis suecica* for juvenile bivalves. ***Aquaculture*** . 92 : 207 - 218 p.
- Levi, P., y Hodgson, E. 1987. Modern Toxicology program North Carolina State University Raleigh, North Carolina. **Elsevier**. N. Y. : 386 p.
- Lind, O. 1985. Hadbook of Common Methods in Limnology. **Kendal/Hunt**. USA : 199 p.
- Louma, S.N. 1983. Bioavailability of trace metal to aquatic organisms. A review. ***Sci. Total Environ.*** 28 : 1 - 22 p.
- Lowe O. M. , M.N. Moore y K.R. Clarke. 1981. Effects at oil on digestive cells in mussels. Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. ***Aquat. Toxicol.*** 1 : 213 - 226 p.
- Lippmann, M. 1992. Environmental Toxicants: Human Exposures and their health effects. **Van Nostrand Reinhold**. N.Y.: 588 - 593 p.
- McLusky, D.S., Bryant V. y Campbell R. 1986. The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates . ***Oceanogr. Biol. A. Rev.*** 24 : 481 - 520 p.
- Nauen, C.E. 1983. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery Products. **FAO. Fis. Circ.** : 764 : 1102 p.
- Nelson, B. W. , Heinz, G. H. y A. Redmon-Norwood. 1996. Environmental contaminants in wildlife, interpreting tissue concentrations. Lewis Publishers N.Y. **SETAC** : 400 - 425 p.
-

Powell, E.N., E.E. Hofmann, J. M. Klinnck y S.A. Ray. 1992. Modeling oyster population. *Jour. Shell. Res.* :11(2) : 287 - 398 p.

Phillips, D. J. H. and P.S. Rainbow. 1993. Biomonitoring of trace aaquatic contaminats. *Elsevier Applied Science*. London : 371p.

Pringle, B. y C. Shuster .1977. A Guide to trace metal level in Shellfish. 6th **National Shellfish Sanitation Workshop**. February 7-9 : 967 - 987 p.

Rainbow, P.S., Phillips, J.D. y M. Depledge. 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. 21(7) : 321 - 324 p.

Rand, G. y S. Petrocelli. 1985. Fundamentals of Aquatic toxicology. **Hemisphere publishing Corporation**. USA : 666 p.

Reguero, R.M.M. 1994. Estructura de la comunidad de moluscos en lagunas costeras de Veracruz y Tabasco, México. Tesis Doctoral, Fac. Ciencias, **Biología, UNAM**, México : 280 p.

Roesijadi, G. 1981. The significance of low molecular weight metallothionein-like proteins in marine invertebrates: current status. *Mar. Environ Res.* 4 : 167 - 179 p.

Roesijadi, G. 1982. Uptake and incorporation of mercuty into mercury-binding proteins of gill of *M. edulis* as a ferration of time. *Mar. Biol.* 66 : 151 - 157 p.

Roesijadi, G. 1996. Enviromental factors: response to metals. *In: The eastern oyster Crassostrea virginica*. Kennedy, S. Y Newell, R. Eds **Sea Grant**. Maryland : 520 p.

Roesijadi, G., L. Brubacher, M. Unger y R.S. Andersen. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxigen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in vitro*. **Comp. Bioche. Physiol. Pharmacol. Toxicol. & Endocrinology**. 118 (2) : 171 - 176 p.

Rosas, I. , A. Baez, R. Belmont. 1983. Oyster (*Crassostrea virginica*) as an indicator of heavy metal pollution in some lagoons of the Gulf of Mexico. **Water Air and Soil Pollution**. 20 : 127 - 135 p.

Secretaría de Pesca, 1990. Anuario Estadístico de Pesca. Dirección General de Programación e Informática, México, D.F. 42 p.

Secretaria de Pesca (SEPECSA) 1988. Manual Técnico para la operación de centros acuícolas productores de ostión. **SEPECSA**, México, D.F. 324 p.

Sheehan, D. Y Hrapchak, B. 1980. Theory and practice of Histotechnology. The C.V. **Mosby Company**. 600 p.

Simkiss, K., y M.G. Taylor. 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. **CRC Rev. Aquat. Sci**. 1 : 173 - 189 p.

Shumway, S. E. y R.K. Koehn. (1982). Oxygen Consumption in the American Oyster *Crassostrea virginica*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 9 : 59-68 p.

Spacie A y L. Hamelink. 1985. *Bioaccumulation*. In: *Fundamentals of Aquatic toxicology*. Rand, G. y S. Petrocelli. Eds. Hemisphere publishing Corporation. USA. : 495 - 546 p.

Timmermans, K.R., E. Soijkerman, M. Tonkes y H.Govers. 1992. Cadmium and Zinc uptake by two species of aquatic invertebrate predators from dietary and aqueous sources. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 49 : 655 - 662 p.

Thomson, J. D., B. J.S. Pirie, y S.G. George. 1985. Cellular metal distribution in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* determined by quantitative X-ray microprobe analysis. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 85: 37 - 45 p.

Uma, D. V. 1996. Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (Recluz). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 31 : 47 - 53 p.

United Nations Enviroment Programme (UNEP) 1985 Regional seas: GESAMP: cadmium, lead and tin in the marine environment. **UNEP regional Seas Report and Studies N 56 GESAMP Report and Studies**. UNEP, Paris. 22 : 1 - 62 p.

- Villanueva, F. y A.V. Botello. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 157: 53 - 94 p.
- Walsh, A.R. y J. O'Halloran. 1998. Accumulation of chromium by a population of mussels (*Mytilus edulis* (L.)) exposed to leather tannery effluent. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 17 (7) : 1429 - 1438 p.
- Walne, P. R. 1984. The influence of current speed, bodysize and water temperature on the filtración rate of five species of bivalves. **J. Mar. Biol. Assoc. U. K.** 52 : 345 - 374 p.
- Wilkfors, G. H., Twarog, J. W., Ferris, G. E., Smith, B.C. y R. Ukeles, 1994. Survival and growth of post-set oysters and clams on diets of cadmium-contaminated microalgal cultures. **Mar. Environ. Res.** London. 37 (3) : 257 - 281 p.
- Wright, D. A. 1980. Cadmium and Calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. **Freshwater Biol.** 10 : 123 -133 p.
- Zaroogian, G. y P. Yevich. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. **Marine environmental research.** 37(4) : 355 - 373 p.
- Zaroogian G.E. y G. Morrison. 1981. Effect of cadmium Body Burdens in Adult *Crassostrea virginica* on fecundity and viability of larvae. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.** 27 : 344 - 348 p .

Zaroogian, G.E. 1979. Studies on the depuration of Cadmium and copper by the American Oyster *Crassostrea virginica*. **Bull. environ. Contam. Toxicol.** 23 : 117 - 122 p.

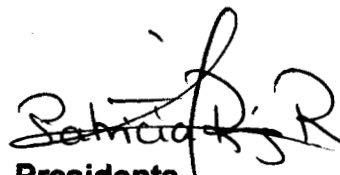
**El jurado Designado por la División de Ciencias Biológicas y
de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó**

Xochitl Guzmán García

El 22 de noviembre del 2001.

Integración del jurado

Dra. Patricia Ramírez Romero.


Presidenta

Dra. Laura Martínez Tabche.

Vocal 

M. en C. Beatriz Ramírez Mora.

Vocal 

M. en C. Emma Olga Arciniega Ruíz de Esparza.

Vocal 

M. en C. Guadalupe Barrera E.

Secretaria 