



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

“Determinación del estado de salud de dos poblaciones de *Pteria sterna* presentes en sitios con diferente grado de contaminación mediante la evaluación de biomarcadores bioquímicos y genéticos”

T E S I S

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental**

P R E S E N T A

Hidrobióloga Mayra Olivares Eslava

Directora

Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa

Asesores

Dr. José Luis Gómez Olivares

Dr. Noe Salinas Arreortua

COMITÉ TUTORAL

Directora

Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa

Profesor Titular C

Laboratorio Alejandro Villalobos

Departamento de Hidrobiología

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

coco@xanum.uam.mx

Asesores

Dr. José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

Laboratorio de Biomembranas

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

gool@xanum.uam.mx

Dr. Noe Salinas Arreortua

Profesor Titular B

Laboratorio de Biomembranas

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

noes_77@hotmail.com

COMITÉ TUTORAL



Directora

Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa



Asesor

Dr. José Luis Gómez Olivares



Asesor

Dr. Noe Salinas Arreortua

Este proyecto fue realizado en las instalaciones del Laboratorio Alejandro Villalobos del departamento de Hidrobiología y Laboratorio de Biomembranas del departamento de Ciencias de la Salud pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, así como en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México.

El presente trabajo derivó del proyecto “Evaluación del estado de salud de organismos de importancia ecológica y/o económica presentes en sistemas acuáticos” a cargo de la Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa de la UAM-I.

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Para la realización del estudio en la Maestría en Biología Experimental la alumna Mayra Olivarse Eslava percibió el apoyo de la beca CONACYT con Número de registro: 398209

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis titulada: "Determinación del estado de salud de dos poblaciones de *Pteria sterna* presentes en sitios con diferente grado de contaminación mediante la evaluación de biomarcadores bioquímicos y genéticos".

Presentó

Hidrobióloga Mayra Olivares Eslava

El día 15 de Diciembre del año 2016



PRESIDENTE

Dr. José Luis Gómez Olivares

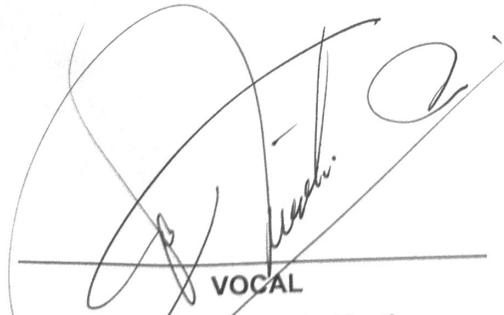
Laboratorio de Biomembranas
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



SECRETARIO

Dr. Noe Salinas Arreortua

Laboratorio de Biomembranas
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

**Dr. Felipe Fernando Martínez
Jerónimo**

Laboratorio de Hidrobiología Experimental
Departamento de Zoología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto
Politecnico Nacional



VOCAL

Dr. Edmundo Bonilla González

Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y llevar acabo con éxito este proyecto. Por todo el apoyo dado en el ámbito académico y personal, por la confianza que deposito en mí y por su paciencia. Gracias por tomarme en cuenta en todo momento para la toma de decisiones de este proyecto y por enseñarme parte de su experiencia en el ámbito académico, así como por haberme incentivado a seguir adelante en todo momento y por su calidad de ser humano.

- ❖ Al Dr. José Luis Gómez Olivares por darme la oportunidad de trabajar con su grupo de trabajo y aprender cosas nuevas, por su paciencia para explicar las cosas, por su apoyo brindado en todo momento, por su disposición e interés en el proyecto, por sus aportaciones y comentarios acertados, así como por los consejos en el ámbito académico y personal. Gracias por el ambiente cálido y de respeto en el laboratorio.

- ❖ Al Dr. Noe Salinas Arreortua por aceptar formar parte de este proyecto, por su interés y apoyo brindado.

- ❖ Al Dr. Carlos Cáceres Martínez y su grupo de trabajo de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) y a la empresa “Perlas del Cortez” por su apoyo brindado en la realización de este proyecto ya que sin ellos no

hubiera sido posible la realización de del mismo. Gracias por el trabajo realizado, por la obtención, mantenimiento y cuidado de las ostras con las que se trabajaron, por su hospitalidad, entusiasmo, disposición y ayuda para trabajar en cada colecta de organismos, así como el préstamo de instalaciones.

- ❖ A Andrés Caloso Ruiz por su apoyo incondicional durante este periodo de vida, por sus consejos, por compartir conmigo todos estos momentos y por alentarme siempre a seguir adelante en el aspecto profesional y personal.

- ❖ A mis amigos Diana, Felipe y Faby por su amistad brindada durante la Maestría. Por todos los momentos que pasamos juntos y por su apoyo brindado.

- ❖ A mis compañeros del Laboratorio de Biomembranas Gaby y Armando a quienes conocí de primera instancia y quienes me enseñaron, apoyaron y brindaron su amistad. También a Eli, Sol, Jazmín, Alicia, David y Chris por su compañerismo y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres Elvia Eslava y Manuel Olivares a quienes les agradezco el trabajo que realizaron en mi persona, ya que gracias a su educación, exigencia, apoyo y consejos he llegado hasta este punto. A mis hermanos Elma Olivares y Rodrigo Olivares quienes me apoyaron, escucharon y aconsejaron.

Gracias a mi familia por creer en mí y alentarme a su manera a ser mejor persona y seguir adelante. LOS QUIERO MUCHO.

RESUMEN

El proceso de urbanización en Ensenada de La Paz B.C.S, México ha aumentado en gran medida los aportes antrópicos en la zona costera originando así un aumento en los niveles de xenobióticos que junto con los cambios climáticos, constituyen un riesgo para el estado de salud de la ostra perlera *P. sterna* (en cultivo), la cual es de gran importancia económica en la zona. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los contaminantes originados por actividad antrópica en el estado de salud de *P. sterna* en condiciones de cultivo en Ensenada de La Paz. Para lo cual, se establecieron dos cultivos de *P. sterna* en dos localidades en Ensenada de la Paz: el sitio control con poca actividad antrópica frente a la Isla Gaviota y el sitio experimental La Marina con influencia antrópica directa. Se colectaron 20 organismos de cada sitio en dos épocas: verano e invierno de 2015-2016. Se evaluó el índice de crecimiento (IC), índice de rendimiento (R) y tasa de crecimiento (TC) mediante relación de medidas morfométricas. En branquia se determinó el grado de lipoperoxidación (TBARS), actividad de glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y presencia de micronúcleos (MN). Se evaluó la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en tejido del pie. Los resultados en la época de verano fueron los siguientes: el crecimiento e índice de rendimiento en las ostras control fue mayor. La actividad CAT fue mayor en el cultivo experimental. En lipoperoxidación, actividad de GPx y SOD no se encontraron diferencias significativas entre las ostras de ambos sitios a pesar de que los bivalvos del cultivo experimental de La Marina tuvieron mayor grado de lipoperoxidación y mayor actividad de GPx y

SOD. La actividad de AChE fue menor en el cultivo experimental en comparación con el control y la frecuencia de MN fue mayor en el cultivo experimental. En la época de invierno el IC, R, CAT y MN no mostraron diferencia significativa entre cultivos. Las ostras control presentaron mayor crecimiento e índice de rendimiento. La actividad CAT fue mayor en las ostras control en comparación con las experimentales. Así la presencia de MN fue mayor en las ostras control. La actividad AChE y el grado de lipoperoxidación en las ostras control fueron mayores que en las experimentales mostrando diferencia significativa. La actividad SOD fue menor en las ostras control. En cuanto a la tasa de crecimiento de los bivalvos de Isla Gaviota esta fue mayor que los de La Marina en las dos épocas del año. Los datos obtenidos de la evaluación de los biomarcadores indica que los organismos expuestos a niveles más altos de contaminantes como los reportados en La Marina de La Paz provocan un efecto deletéreo sobre *P. sterna* afectando su estado de salud en la época de verano e invierno. Mientras, que el estado de salud de *P. sterna* en época de invierno en el cultivo de Isla Gaviota fue afectado por el incremento de la temperatura del agua del sitio a causa del fenómeno meteorológico de “El Niño”, registrado en 2015-2016.

ABSTRACT

The urbanization process of Ensenada de La Paz Baja California Sur, México has increased the anthropic activities in the coastal, which together with climate change, is causing an increase of xenobiotic levels. This represents a health threat to pearl oyster *P. sterna* (farmed), which is economically significant for this region. The aim of this project was to determine the effects of pollution caused by anthropic activities on pearl oysters health (*P. sterna*) in farming conditions in Ensenada de la Paz. We established two pearl oyster cultures in two different locations: The control site with little anthropic activity in front of Gaviota Island and the experimental site La Marina with direct anthropic activity. We collected twenty organisms from each site (control and experimental site) at two different times: summer and winter of the year 2015-2016. We evaluated the growth index (IR), the performance rate (R) and growth rate (GR) by means of morphometric measurements. Lipoperoxidation levels (TBARS), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, the presence of micronuclei (MN), and the activity of acetylcholinesterase (AChE) in foot tissue were also evaluated. The summer results were the following: growth and performance index in control oysters were higher in comparison to the experimental group. The activity of CAT was higher in the experimental group. We did not find any difference in the lipoperoxidation activity of GPx and SOD between the control and experimental groups, in spite of the experimental oyster's culture of La Marina having high levels of lipoperoxidation and more activity of GPx and SOD. The activity of AChE was lower in the experimental group in comparison with the control

group; frequency of MN was higher in experimental group. In summer the IC, R, CAT and MN did not show any changes between the control and experimental groups. The control group showed more growth and performance index. The activity of CAT was higher in the control group in comparison with experimental group. Thereby the presence of MN was higher in control group. The activity of AChE and the lipoperoxidation level in control group was higher showing a statistically significant difference. The activity of SOD was lower in control group. In respect to bivalve growth rates in both summer and winter Gaviota Island was higher than La Marina. The data obtained by the evaluation of biomarkers indicates that exposure to higher levels of pollution such as those reported at La Marina provokes a deleterious effect on *P. sterna*, disrupting its state of health during summer and winter. Whereas, the health of *P. sterna* in winter in Gaviota's culture was affected by the increment of water temperature because of the E Niño meteorological phenomenon, recorded in 2015-2016.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Mecanismos de toxicidad por xenobióticos.....	5
1.1.1. Estrés oxidativo.....	5
1.2. Biomarcadores.....	9
1.2.1. Índices Biométricos.....	11
1.2.2. Biomarcadores bioquímicos y genéticos.....	11
1.2.2.1. Enzimas antioxidantes.....	12
1.2.2.1.1. Glutación peroxidasa.....	13
1.2.2.1.2. Superóxido dismutasa.....	13
1.2.2.1.3. Catalasa.....	14
1.3. Daños generados por xenobióticos.....	14
1.3.1. Lipoperoxidación.....	14
1.3.2. Micronúcleos.....	15
1.3.3. Neurotoxicidad – Acetilcolinesterasa.....	17
2. ANTECEDENTES.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23

5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1. Objetivos particulares.....	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
6.1. Área de estudio.....	24
6.2. Trabajo de campo.....	25
6.3. Trabajo de laboratorio.....	26
6.3.1. Obtención de muestras.....	28
6.3.2. Evaluación de actividad acetilcolinesterasa.....	29
6.3.3. Evaluación de lipoperoxidación.....	29
6.3.4. Evaluación de actividad glutatión peroxidasa.....	30
6.3.5. Evaluación de actividad superóxido dismutasa total.....	31
6.3.6. Evaluación de actividad catalasa.....	33
6.3.7. Estimación del contenido total de proteína.....	33
6.3.8. Determinación de frecuencia de micronúcleos.....	34
6.4. Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1. ÉPOCA DE VERANO.....	36
7.1.1. índice de condición, Rendimiento y Tasa de crecimiento.....	36
7.1.2. Actividad de acetilcolinesterasa.....	38

7.1.3. Grado de lipoperoxidación.....	39
7.1.4. Actividad de glutatión peroxidasa.....	40
7.1.5. Actividad de superóxido dismutasa total.....	41
7.1.6. Actividad de catalasa.....	42
7.1.7. Frecuencia de micronúcleos.....	43
7.2. ÉPOCA DE INVIERNO.....	44
7.2.1. Índice de condición, rendimiento y tasa de crecimiento.....	44
7.2.2. Actividad de acetilcolinesterasa.....	46
7.2.3. Grado de lipoperoxidación.....	47
7.2.4. Actividad de glutatión peroxidasa.....	48
7.2.5. Actividad de superóxido dismutasa total.....	49
7.2.6. Actividad de catalasa.....	50
7.2.7. Frecuencia de micronúcleos.....	51
7.3. Comportamiento de acetilcolinesterasa en verano e invierno.....	52
8. DISCUSIÓN.....	54
9. CONCLUSIÓN.....	63
REFERENCIAS.....	65

1. INTRODUCCIÓN

El acelerado proceso de industrialización ocurrido en nuestro país en las últimas cinco décadas ha incrementado los problemas de contaminación en los ecosistemas acuáticos debido a la emisión de contaminantes antrópicos (compuestos o agentes generados por la actividad del hombre), siendo la zona costera una de las más vulnerables al aporte de xenobióticos (sustancias o compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente que suelen producir efectos tóxicos en los seres vivos)⁽¹⁾. Los aportes antrópicos originan un aumento en los niveles de metales y compuestos orgánicos persistentes (COPs), hecho que constituye un riesgo para actividades como las pesquerías y el cultivo de organismos (acuicultura), ambas realizadas en la zona costera⁽¹⁻³⁾.

La Ensenada de La Paz se encuentra localizada al sureste de la Península de Baja California Sur, México. Esta región ocupa el cuarto lugar en la producción de bivalvos en América Latina después de Chile, Brasil y Perú, la cual se lleva a cabo casi exclusivamente en el Golfo y costas de Baja California. Las especies producidas por su importancia económica son: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Argopecten ventricosus* y *Pteria sterna*, ésta última conocida como concha nácar u ostra perlera⁽³⁾.

Pteria sterna es un molusco bivalvo que presenta valvas convexas irregulares relativamente delgadas siendo su superficie externa rugosa cuando no está desgastada, las valvas están cubiertas de densas espinas o escamas radiales

aplanadas, las cuales son más largas e imbricadas cerca del borde ventral de la concha, cuya forma es ovalada y posee una extensión en forma de ala, el color de la concha es café oscuro presentando ligeras variaciones, la capa de nácar es de color rosáceo a púrpura (Figura1). La talla promedio de los organismos adultos es aproximadamente de 10 cm de longitud y 8.5 cm de altura, con una talla máxima de 12 cm. Cuenta con organización funcional compuesto por sistema nervioso, sistema digestivo, sistema respiratorio y sistema circulatorio (Figura 2). Su sistema nervioso es de tipo ganglionar (cúmulo de cuerpos neuronales compuestos de una cápsula de tejido conectivo, fibras reticulares y colágenas) al igual que los moluscos bivalvos en general; formado por tres pares de ganglios nerviosos principales: ganglio cerebropleural (transmite estímulos nerviosos al músculo aductor posterior y palpos labiales), visceral (controla el sistema digestivo) y pedal (controla los músculos de los sifones, el musculo anterior y el pie), así como un par de cordones nerviosos (Figura 3)^(4,5).



Figura 1 – Morfología externa de *Pteria sterna*⁽⁵⁾. El exterior de las conchas es de color café oscuro y está cubierto de espinas y escamas concéntricas características del proceso de crecimiento (tomado de Puig, 2012).

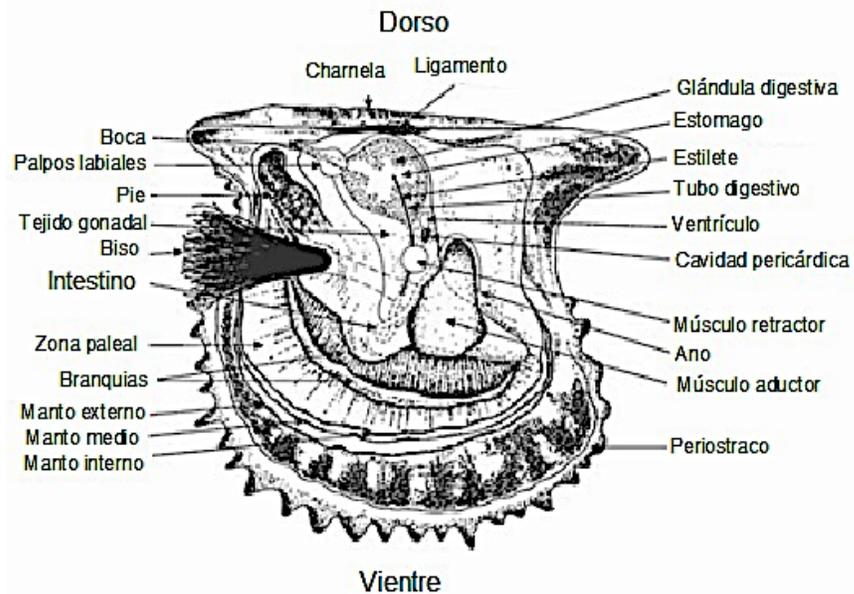


Figura 2 – Anatomía interna de *Pteria sterna*⁽⁵⁾. Presenta sistema nervioso, sistema digestivo, sistema respiratorio y sistema circulatorio (tomado y modificado de Puig, 2012).

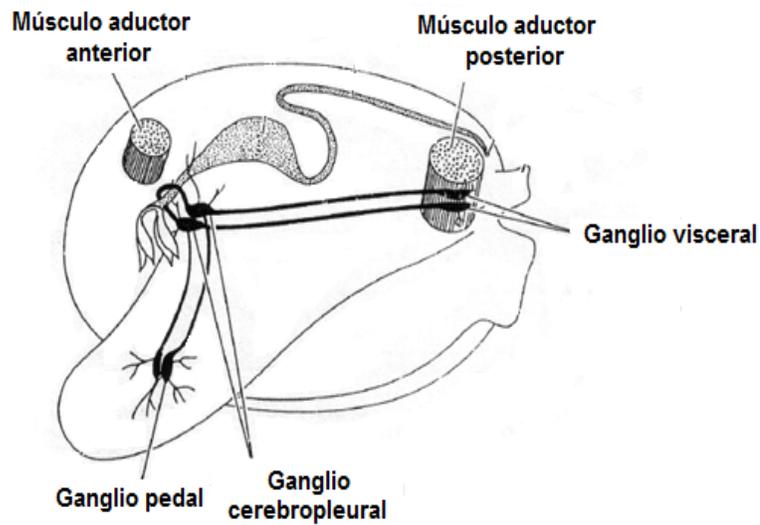


Figura 3 – Anatomía interna del sistema nervioso de bivalvos⁽⁸⁸⁾. De manera general el sistema nervioso de los bivalvos está constituido por ganglio cerebro-pleural, visceral y pedal (tomado y modificado de Brusca, 2003).

La ostra *P. sterna* (Gould 1851) u ostra perlera, produce perlas de alta calidad las cuales son muy apreciadas en el mercado internacional debido a su forma y color. El músculo aductor de estos organismos se utiliza para consumo humano y el nácar producido por su manto se usa como uno de los ingredientes principales para elaborar productos cosméticos y farmacéuticos. Entre los que incluyen, cremas para la cicatrización de la piel y acné, además de que la concha se utiliza para la elaboración de artesanías y joyería⁽⁴⁾. Cabe destacar que el nácar tiene un gran potencial en la industria biomédica, algunos estudios han demostrado su capacidad de promover regeneración y aceleración en la soldadura en huesos rotos⁽⁸⁷⁾.

La pesca de las ostras perleras se realiza en la Bahía y Ensenada de la Paz desde la época precolombina, pero durante el siglo pasado la explotación de este recurso se efectuó de manera intensiva, lo que ocasionó que las especies estuvieran en peligro de extinción. En 1940 se decretó su veda total, posteriormente *P. sterna* fue elevada a la categoría de “Protección Especial” (Diario Oficial de la Federación, 1994)⁽⁵⁾. En la actualidad *P. sterna* ya no se encuentra en carácter de protección especial (Diario Oficial de la Nación, 2002) a reserva de que las poblaciones naturales no se han recuperado del todo debido a que continúa la explotación furtiva de los bancos naturales. Asimismo el incremento de la contaminación y la alteración de la zona costera, debido al desarrollo de los asentamientos humanos y las actividades turísticas, llevó a la declinación de numerosas poblaciones que se localizaban en la Bahía y Ensenada de La Paz⁽³⁾.

El desarrollo económico, urbano y turístico en la Bahía y Ensenada de la Paz, está generando residuos que contienen sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables

(STPBs), como metales pesados, entre los que se encuentran el Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Magnesio (Mg), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Vanadio (V) y Zinc (Zn), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y posiblemente plaguicidas; los cuales son transportados y depositados en la bahía a través del drenaje, de manera directa o por arrastre pluvial⁽³⁸⁾.

La parte sur de la Bahía de La Paz, resulta de interés debido a que esta zona recibe los aportes de materiales continentales originados de la erosión de la formación geológica Monterrey, el funcionamiento de la termoeléctrica de Punta Prieta, además de los desechos originados por los asentamientos humanos costeros, los astilleros, la actividad minera (que se realiza en la parte norte de la Bahía por la empresa ROFOMEX y que llega a la parte sur por las corrientes marinas) y las descargas de aguas residuales provenientes de la Ciudad de La Paz, B.C.S.⁽²²⁾.

Hasta la fecha no se han realizados estudios de manera integral para detectar el efecto de los contaminantes presentes en los sitios de cultivo de la ostra perlera, a pesar de que sean detectado niveles de éstos que podrían causar efectos adversos en los organismos.

1.1. Mecanismos de toxicidad por xenobióticos

1.1.1. Estrés oxidativo

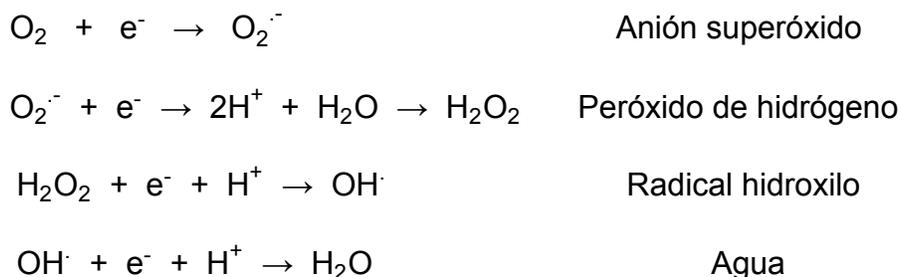
El incremento de aportes de xenobióticos a los ecosistemas acuáticos ha promovido el interés de estudiar su relación con el estrés oxidativo reportado en diversos

organismos como peces y bivalvos. Se sabe que en los ambientes acuáticos los diversos contaminantes químicos pueden acumularse en el sedimento, distribuirse en la columna de agua o ser acumulados y/o metabolizados en los organismos, o bien ser excretados por ellos. Una vez que los contaminantes químicos están en el interior del organismo estos pueden producir un efecto tóxico de manera directa o indirecta tras la biotransformación de los contaminantes⁽⁸⁶⁾.

La toxicidad que generan los contaminantes químicos se debe a su capacidad para incrementar la generación de moléculas tóxicas, como los radicales libres (moléculas que tienen uno o varios electrones desapareados en su último orbital, lo que les confiere una alta reactividad química), los cuales generan un desequilibrio en la producción de agentes prooxidantes y mecanismos de defensa antioxidante, a lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual conduce al daño de macromoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos y ADN), de componentes celulares y de tejidos, favoreciendo la aparición de diversos procesos patológicos. A pesar de que estas moléculas prooxidantes se generan de forma natural durante el metabolismo basal, la exposición y acumulación de contaminantes químicos puede incrementar su concentración y por consiguiente los efectos negativos derivados de su presencia. Las principales moléculas prooxidantes son los propios contaminantes y sus metabolitos generados por el proceso de biotransformación, los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (EROs)⁽⁸⁶⁾.

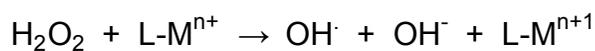
Las EROs pueden ser radicales libres, como los radicales peróxido (ROO^\cdot), hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot); y especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (O_2). Las EROs se producen endógenamente en las

mitocondrias durante la respiración celular, debido a la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua, en las que se forman distintos radicales de oxígeno parcialmente reducidos y altamente inestables⁽⁸⁶⁾, mediante las siguientes cuatro reacciones:

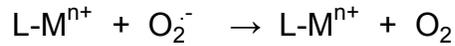


Por otra parte la generación de EROs también se puede incrementar de manera exógena por compuestos orgánicos y metálicos. Los compuestos orgánicos pueden incrementar la generación de EROs durante su proceso de detoxificación. Así también los metales de transición como el Hierro (Fe^{2+}), Cobre (Cu^{2+}), Cromo (Cr^{2+}) y Vanadio (V^{2+}) promueven la generación de EROs en presencia de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 favoreciendo la oxidación de estas moléculas en radical OH^{\cdot} por medio de la reacción de Fenton y de Haber y Weiss⁽⁸⁶⁾.

Reacción de Fenton



Reacción de Haber y Weiss



donde:

L-M^{n+} = Metal de transición.

Existen diferentes mecanismos celulares de defensa enzimáticos y no enzimáticos en contra de factores pro-oxidantes encargados de evitar la formación de radicales libres, capturar los que ya se han formado y remover o reparar las biomoléculas ya dañadas.

El mecanismo de defensa antioxidante no enzimático impide la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, convirtiéndolas en moléculas menos dañinas para el organismo. Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los carotenoides, vitaminas A, C y E, y el glutatión.

Mientras que el mecanismo antioxidante enzimático confiere a las moléculas que donan sus electrones a los radicales libres, neutralizando y evitando reacciones en cadena. Entre los mecanismos antioxidantes enzimáticos que facilitan la eliminación de radicales libres y EROs se encuentran las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-s-transferasa (GST)⁽⁸⁶⁾.

Por lo anterior el proceso de estrés oxidativo se ha considerado un mecanismo de toxicidad significativo sobre los organismos a los que afecta y se ha permitido su uso como herramienta de diagnóstico, con capacidad predictiva de evidenciar el impacto de los contaminantes sobre la salud de los organismos acuáticos. Así, la cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo en sistemas biológicos se emplea como bioindicador para evaluar efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales.

1.2. Biomarcadores

En la actualidad existen una variedad de herramientas de análisis químicos ambientales que tienen como objetivo dar a conocer los niveles de contaminantes químicos en los medios acuáticos, pero que no permiten conocer si estos niveles de contaminantes presentes en el medio marino provocan efectos deletéreos sobre los organismos y/o suponen una amenaza para los ecosistemas.

Lo anterior ha llevado a que se desarrollen una serie de metodologías que permitan evaluar la respuesta biológica asociada a la contaminación y/o presencia de xenobióticos. Entre estas metodologías se encuentran los biomarcadores o biosensores, los cuales permiten evaluar la respuesta a nivel celular y/o molecular de las especies marinas que habitan en áreas impactadas de manera antrópica o de especímenes de laboratorio expuestos a algún contaminante para detectar, cuantificar y comprender el impacto o repercusión de la exposición a los químicos

presentes en el ambiente, que podrían desencadenar efectos deletéreos sobre la fisiología de los organismos⁽⁶⁾.

Un biomarcador son señales identificables (evaluación de cambios a nivel molecular, bioquímico, celular, estructural y/o tejidos en un organismo vivo) que proporcionan advertencias tempranas del daño provocado por los contaminantes⁽⁷⁾. El uso de biomarcadores se basa en el hecho de que la primera interacción entre un agente xenobiótico y el organismo ocurre a nivel molecular-celular⁽⁸⁾. El estudio de estas interacciones permite establecer las reacciones causa-efecto determinando los mecanismos de acción de los contaminantes sobre el organismo y en muchos casos predecir con anticipación los daños sobre éste. Por lo que, los biomarcadores se consideran un sistema de alarma temprana que indican que un organismo estuvo o está expuesto a algún agente contaminante antes de que éste presente alteraciones que representen un riesgo de muerte^(7,9).

Por lo anterior, los biomarcadores son herramientas importantes para revelar los efectos biológicos de los contaminantes en los organismos marinos; en este caso, los bivalvos son comúnmente utilizados para la determinación de biomarcadores en ambientes acuáticos, debido a que son organismos filtradores, con hábitos sésiles, amplia distribución, fácil trasplante en el sitio de estudio, fácil mantenimiento en el laboratorio y lo más importante su capacidad para acumular altas concentraciones de una amplia gama de contaminantes en sus tejidos, incluyendo metales pesados y HAPs⁽⁸⁵⁾.

Bajo este contexto es importante determinar el estado de salud en el que se encuentran las ostras perleras de los bancos de cultivo, a través de la evaluación de

biomarcadores bioquímicos, genéticos e índices biométricos; definiendo así estado de salud como el óptimo desarrollo (progresión de estados vitales desde la fecundación hasta la senescencia) y crecimiento físico de *P. sterna*, así como la ausencia de mortalidad de los organismos en etapas tempranas.

1.2.1. Índices Biométricos

Los índices biométricos son sensores que determinan efectos adversos en el crecimiento, reproducción y desarrollo de los organismos causados por algún contaminante, factores físicos y/o químicos del ambiente acuático. Algunos de estos índices son el Índice de Condición (IC) e Índice de Rendimiento (R). El Índice de Condición es un porcentaje que establece el estado de fortaleza física del organismo aportando información acerca de su capacidad de crecimiento a través de una relación entre el peso de carne fresca (Pcf) y el peso de las valvas (Pv)⁽⁵⁸⁾.

Mientras que el Índice de Rendimiento se refiere al porcentaje de carne fresca (Pcf) del organismo por su peso total (Pt)⁽⁵⁸⁾. El IC y R aportan información del crecimiento y desarrollo del organismo con lo que se puede llegar a establecer si las condiciones ambientales son óptimas, indicando algún problema en el espécimen^(10,58).

1.2.2. Biomarcadores bioquímicos y genéticos

Los análisis de actividad y niveles *in vivo* y/o *in vitro* de enzimas, son las técnicas más utilizadas como biomarcadores. Ejemplos de éstas, son el aumento o disminución en la actividad de enzimas antioxidantes, como glutatión peroxidasa (EC

1.11.1.9: oxido-reductasa de glutatión reducido, GPx), superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1: dismutasa de superóxido, SOD) y catalasa (EC 1.11.1.6: oxidoreductasa de peróxido de hidrógeno, CAT), la inhibición en la actividad de acetilcolinesterasa (E.C.3.1.1.7: acetil-hidrolasa, AChE) y el aumento de subproductos de lipoperoxidación inducidos por la formación de oxiradicales en las células, como respuesta originada a exposición de diferentes xenobióticos. Por ejemplo; los metales, los hidrocarburos, los plaguicidas y los detergentes. La interacción entre el xenobiótico y el organismo puede provocar daños a nivel celular y molecular; a su vez los contaminantes genotóxicos causan efectos adversos en el ADN alterando su estructura o su reparto entre las células hijas⁽¹¹⁾.

Algunos biomarcadores como la actividad de las enzimas AChE, GPx y el grado de lipoperoxidación, se relacionan a parámetros fisiológicos relevantes como cambios en la tasa de respiración, alimentación, crecimiento y excreción, además de cambios en la conducta de los moluscos, que determinan los efectos subletales de tóxicos⁽¹²⁻¹⁴⁾.

1.2.2.1 Enzimas antioxidantes

Otros biomarcadores que reflejan la toxicidad de contaminantes o sus derivados sobre el balance entre las EROs y los antioxidantes son la actividad de las enzimas GPx, SOD y CAT⁽¹¹⁾ que en la célula son consideradas como las principales enzimas de defensa contra el estrés oxidativo, debido a que son antioxidantes intracelulares

enzimáticos implicados en diferentes sistemas de defensa contra los radicales generados por los contaminantes ambientales⁽¹⁹⁾.

1.2.2.1.1. Glutación peroxidasa

La enzima glutación peroxidasa, participa en las transformaciones de especies reactivas de oxígeno, catalizando la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) a su correspondiente alcohol, para lo cual utiliza como agente reductor al glutación reducido (GSH) utilizando NADPH como donante de electrones. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutación⁽²⁰⁾.

1.2.2.1.2. Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa está presente en las membranas celulares, encargada de catalizar la reacción de degradación de los radicales superóxido (O_2^-) mediante su transformación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con el fin de generar un radical menos dañino. La SOD juega un papel antioxidante fundamental, puesto que el radical superóxido es la ERO más abundante que se genera en múltiples procesos metabólicos como la oxidación de moléculas endógenas y en el metabolismo de xenobióticos como bifenilos y metales de transición^(20,86).

1.2.2.1.3. Catalasa

En organismos aeróbicos, la enzima CAT es la principal vía de catálisis para el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) formado por parte de la enzima SOD. Así la CAT se encarga de la transformación del H_2O_2 en oxígeno y agua (compuestos no tóxico). Esta enzima antioxidante es fundamental, debido a que el peróxido de hidrogeno es una ERO muy peligrosa dada su toxicidad directa e indirecta como precursor del radical hidroxilo, la especie más reactiva del oxígeno^(20,86).

1.3. Daños generados por xenobióticos

1.3.1. Lipoperoxidación

La estabilidad de las membranas plasmáticas es esencial para las funciones vitales de la célula, debido a que contienen receptores, agentes reguladores del líquido extra celular, enzimas, canales y antígenos implicados en la interacción con otras células.

La estructura básica de las membranas celulares es una doble capa lipídica rica en ácidos grasos saturados y poli-insaturados, que las hace especialmente vulnerables al ataque de radicales libres. Dentro de las principales lesiones en los organismos expuestos a contaminantes, se encuentra la oxidación de las membranas lipídicas que es extremadamente compleja y no solo se puede producir a nivel de lípidos poli-insaturados, sino que también puede dañar a las biomoléculas asociadas a las membranas afectando su dinámica lateral (fluidez) y organelos celulares, llegando incluso a provocar la muerte celular⁽⁸⁵⁾.

La lipoperoxidación ha sido sugerida como uno de los mecanismos moleculares involucrados en la toxicidad inducida por plaguicidas y por la presencia de radicales libres generados por metales pesados como: Cu^{1,2}, Cd², Cr^{2,3,6}, Fe^{2,3}, Co^{2,3}, Pb^{2,4}, entre otros. Los radicales libres llevan a cabo un proceso de oxidación sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares capturando electrones de los lípidos de las membranas, dando como consecuencia su destrucción paulatina. La alteración de la estructura de la membrana genera una variedad de compuestos (alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres) entre los que se destaca el malondealdehído (MAD). En las células, la concentración de los productos de lipoperoxidación se relacionan directamente con el nivel peroxidante en las células. Una vez que se formó el MAD se difunde desde el sitio de origen atacando moléculas blancas para oxidarlas actuando como un mensajero tóxico, por lo que la concentración de MAD da información del nivel de estrés oxidativo⁽¹⁸⁾.

1.3.2. Micronúcleos

El daño genotóxico representa un daño producido sobre el ADN. Este daño al ADN puede ser producido de manera endógena por las especies reactivas de oxígeno y radicales libres generados como metabolitos en los procesos metabólicos o bien de manera exógena por exposición a compuestos químicos. En este último el daño generado al ADN puede producirse por acción directa de los xenobióticos o indirectamente por un incremento en la generación de metabolitos tóxicos y especies reactivas de oxígeno o la inhibición de la síntesis y reparación del ADN⁽⁸⁵⁾.

La capacidad que tienen algunos contaminantes presentes en ecosistemas marinos para causar efectos deletéreos en el material genético de su biota ha llevado a fomentar el desarrollo de técnicas para evaluar el grado de efecto en el ADN, una de estas técnicas es la evaluación de Micronúcleos (MN).

Los MN son fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos que no consiguen migrar durante la anafase a alguno de los dos núcleos de las células hijas y permanecen en el citosol tras el proceso de mitosis. Los MN pueden ser de origen clastogénico o aneugénico. Los MN de origen clastogénico son generados por compuestos clastógenos que inducen la ruptura de la doble hélice del ADN, lo que conduce a la formación de fragmentos acéntricos de cromosomas, que son incapaces de adherirse a las fibras del cinetocoro en el centrómero del cromosoma e integrarse en los núcleos de las células hijas. Mientras que los MN de origen aneugénico son generados por compuestos aneunógenos, los cuales, evitan la formación del huso acromático, con lo que las cromátidas completas se quedan fuera del núcleo⁽⁸⁴⁾.

La prueba citogenética de MN se basa en la identificación de células que contienen masa de cromatina fuera del núcleo, producida por la fragmentación del ADN debido a los efectos de compuestos genotóxicos⁽⁸⁵⁾. La presencia de MN también ha sido asociada a efectos producidos por radicales libres originados por los iones de metales pesados en organismos acuáticos como los bivalvos⁽¹⁸⁾.

La evaluación de los biomarcadores de estrés oxidante y daño genético han sido evaluados en la branquia de los bivalvos debido a que el tejido está más expuesto a los contaminantes del medio ambiente, aunado con su función de filtración y

constante división celular, por lo que la branquia es un órgano blanco para llevar a cabo la evaluación de distintos biomarcadores⁽⁵⁴⁾.

1.3.3. Neurotoxicidad - Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima hidrolasa que pertenece al grupo de las colinesterasas (ChEs) responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh), la cual es liberada en las sinapsis colinérgicas. La AChE es una enzima imprescindible para el control normal de la transmisión de los impulsos nerviosos, que van desde las fibras nerviosas hasta las células musculares, glandulares y de los ganglios autónomos, así como también hacia el sistema nervioso central (SNC)⁽¹⁵⁾.

En todos los casos de intoxicación aguda causada por plaguicidas y metales pesados se ha determinado una inhibición de la actividad AChE⁽³⁴⁾. Por lo que, el nivel de la actividad enzimática es uno de los mejores indicadores biológicos del efecto de la exposición aguda o crónica a los plaguicidas organofosforados y carbámicos inhibidores de la AChE. Se ha observado que una disminución de un 25% de la actividad de esta enzima reduce la esperanza de vida de los organismos^(16,17) debido a que al no haber actividad de la AChE se origina una alta concentración de ACh en las uniones colinérgicas del músculo esquelético provocando una hiperexcitación y causando espasmos musculares. En el SNC las altas concentraciones de ACh provocan alteraciones sensoriales de comportamiento, incoordinación, depresión de las funciones motoras y depresión respiratoria⁽¹⁵⁾.

La evaluación de la actividad AChE en bivalvos se ha realizado en el músculo del pie, debido a que es el órgano en donde se presenta actividad colinérgica por la

presencia del ganglio pedal, lo que lo hace un buen órgano blanco para la evaluación de la enzima⁽³⁹⁾.

Como se mencionó antes, no se han realizados estudios de manera integral para detectar los efectos de los contaminantes en la ostra perlera, que están presentes en los sitios donde se cultiva y habita de manera natural éste organismo. Bajo este contexto es importante determinar el estado de salud en el que se encuentran los organismos de la especie *P. sterna* utilizando una batería de biomarcadores.

2. ANTECEDENTES

En sedimentos de la Ensenada de La Paz Baja California Sur, se ha registrado la presencia de agentes tóxicos y genotóxicos relacionado a los aportes de las surgencias y de las aguas residuales provenientes de los muelles, marinas y zonas turísticas.

“La Marina de la Paz” es uno de los sitios de muestreo del presente trabajo. En esta localidad se reportó la presencia de metales, como: Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V, Zn y HAPs⁽³⁵⁾. Las concentraciones de estos xenobióticos (Tabla 1) fueron las siguientes: Cd $3.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Co $42 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Cr $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Cu $73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Fe $64.43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Mg $0.87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Mn $31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Ni $14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Pb $19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, V $45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Zn $81 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. También se encontró en este sitio contaminantes orgánicos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos en una concentración de $0.83 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de HAPs⁽³⁵⁾.

De acuerdo con las tablas de referencia para metales en sedimentos marinos SQUIRTS (Screening Quick Reference Tables) emitidas por la NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), las concentraciones de Cd ($3.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Co ($42 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y Cu ($73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) registradas en los sedimentos de La Marina La Paz, se encuentran entre las concentraciones que causan un efecto deletéreo en los organismos.

En la zona de Isla Gaviota, los niveles de metales fueron más bajos, si se comparan con los registrados en La Marina de La Paz. No se encontraron concentraciones de metales que causen efectos adversos en los organismos, esta Isla se considera como un sitio de referencia debido a que no tiene influencia de actividades antrópicas (Tabla 1).

En cuanto a las concentraciones reportadas para los HAPs en las dos localidades, estas no presentaron niveles que puedan causar daño a los organismos de acuerdo con las SQUIRTS⁽²²⁾.

Cabe señalar que las tablas de referencia SQUIRTS emitidas por la NOAA de los Estados Unidos de Norteamérica se utilizan como referencia en México, debido a que en nuestro país aún no existen éste tipo de instrumentos de referencia en cuanto a la calidad de sedimentos.

Por otra parte solo se han realizado algunos estudios en moluscos bivalvos presentes en la Bahía de La Paz como: *Megapitaria squalida*^(23,24) y *Argopecten ventricosus*⁽¹³⁾ en los cuales se reportan alteraciones en el factor de condición y biomarcadores bioquímicos y genéticos; como la disminución en la actividad AChE en el órgano del pie de los organismos y en el tejido de las branquias un aumento en

niveles de MAD, aumento de enzimas antioxidantes: GPx, SOD y CAT, así como presencia de MN debido al daño genético. Lo anterior como resultado a la exposición a agentes tóxicos como metales pesados principalmente y HAPs introducidos a la zona costera por actividades antrópicas.

Los biomarcadores anteriormente mencionados se han empleado en el análisis ecotoxicológico en diferentes bivalvos, como en las almejas *Tapes philippinarum*⁽¹¹⁾, *Anodonta cygnea*⁽²¹⁾, *Scrobicularia plana*⁽²⁸⁾, *Ruditapes decussatus*^(46-48,75,82), *Ruditapes philippinarum*⁽⁷⁵⁾, *Chlamys islandica*⁽⁸¹⁾, *Pecten jacobaeus*⁽¹⁶⁾ y *Anadara trapezia*⁽⁸²⁾; en mejillones *Mytilus galloprovincialis*^(11,48,79-81,85), *Mytilus edulis chilensis*⁽³⁰⁾, *Mytilus edulis*^(25,27), *Mytilus californianus*⁽²⁶⁾, *Perna perna*⁽⁴¹⁾ y en el ostión *Crassostrea corteziensis*⁽²⁹⁾ y *Crassostrea gigas*⁽⁶⁴⁾.

Tabla 1. Concentración de metales pesados y HAPs en sedimentos de La Marina e Isla Gaviota, La Paz B.C.S 2015 ⁽³⁵⁾.

Metales pesados y HAPs	La Marina ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Isla Gaviota ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Cd	3.5*	1.1
Co	42.0*	9.0
Cu	73.0 *	16.0
Cr	15.0	7.0
Fe	64.4	27.8
Mg	0.8	1.3
Mn	31.0	23.0
Ni	14.0	8.0
Pb	19.0	6.5
V	45.0	32.0
Zn	81.0	23.0
HAPs	0.8	0.3

* = concentraciones que causan efectos negativos en organismos de acuerdo a los criterios establecidos por la NOAA en las SQUIRTs para sedimentos marinos (Screening Quick Reference Tables).

Efectos biológicos ERL (Effects Range Low) **Fe:** nr, **Mg:** nr, **Cd:** 1.2, **Co:** nr, **Cr:** 81 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **Cu:** 34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **Mn:** nr, **Ni:** 20.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **Pb:** 46.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **V:** nr, **Zn:** 150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y **HAPs:** 4.02 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Efectos biológicos considerados letales AET (Apparent Effects threshold) **Co:** 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **Mn:** 260 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **V:** 57 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

nr: no registrado

3. JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que hasta la fecha no se han realizados estudios de manera integral para establecer el efecto de los contaminantes presentes en los sitios de cultivo de la ostra perlera *P. sterna* y que esta especie es de gran importancia económica para la Bahía de La Paz. Es fundamental que se lleve a cabo el análisis de su estado de salud a través de índices biométricos (índice de condición y rendimiento), biomarcadores bioquímicos (actividad de acetilcolinesterasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, y el grado de lipoperoxidación) y biomarcador genético (micronúcleos). De esta manera será importante determinar por medio de los biomarcadores si las condiciones de los lugares donde se encuentran los cultivos de este organismo son las adecuadas para su crecimiento y desarrollo; y si la variación estacional de algunos parámetros tales como la temperatura y el aporte de xenobióticos, influyen en el estado de salud de las ostras. Asimismo la información generada en este estudio permitirá proponer una batería de biosensores para la realización de estudios de monitoreo de las poblaciones de *P. sterna* para su conservación.

4. HIPÓTESIS

El nivel de contaminación de Ensenada de La Paz donde se encuentran los cultivos de *P. sterna* provocará cambios en los biomarcadores bioquímicos y genéticos que indicarán el estado de salud del organismo.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los contaminantes originados por actividad antrópica en el estado de salud de *P. sterna* en condiciones de cultivo en Ensenada de La Paz.

5.1. Objetivos Particulares

- I. Determinar la respuesta morfofisiológica del organismo cultivado en una zona de alta actividad antrópica, a través de índices biométricos, para establecer si las condiciones de crecimiento de los organismos son óptimas.
- II. Evaluar la respuesta de los organismos cultivados en una zona de alta actividad antrópica por medio de la determinación de biomarcadores (actividad de acetilcolinesterasa, lipoperoxidación, estrés oxidante y daño genético).
- III. Integrar la información obtenida en la evaluación de biomarcadores en *P. sterna* cultivada en una zona de alta actividad antrópica, para establecer el estado de salud de los organismos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El estudio se realizó en dos localidades de Ensenada de la Paz B.C.S., la primera (A) frente a la “Isla Gaviota” (24°17'21.75" N y 110°20'26.9" O) lugar donde se encuentra actualmente la línea de cultivo de la empresa “Perlas del Cortez”, la segunda localidad (B) en “La Marina de La Paz” (24°09'09.77" N y 110°19'25.75" O) (Figura 4).

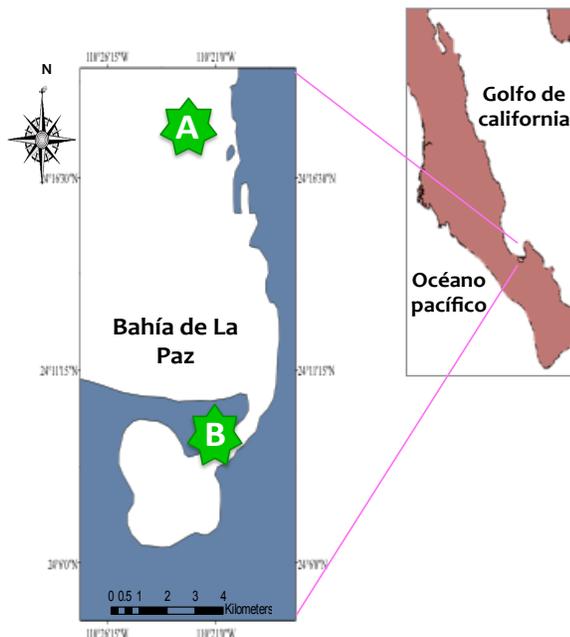


Figura 4. Ubicación de los cultivos de *P. sterna*. El cultivo control se encontrara en la zona de la “Isla Gaviota” marcada con la letra (A) y el cultivo experimental en “La Marina de la Paz” marcada con la letra (B).

6.2. Trabajo de campo

Para la realización de este estudio se utilizaron organismos juveniles de *P. sterna* procedentes de la Empresa “Perlas del Cortez”; ya que en esta etapa de crecimiento, los organismos son más susceptibles a los daños generados por contaminantes.

Se establecieron dos cultivos en dos sitios con diferente grado de contaminación. El cultivo control fue ubicado en las instalaciones de la empresa Perlas del Cortez en Isla Gaviota en una jaula de cultivo tipo “triangulo” con medidas de 30 cm de alto, 45 cm de ancho y un metro de largo, con luz de malla de 16 mm. Para el cuidado de los organismos se aplicaron las rutinas de mantenimiento de la empresa. El sitio (A) se definió como la zona de referencia (control), por no presentar actividades antrópicas. Para el cultivo experimental se realizó una resiembra de *P. sterna* en el sitio (B) “La Marina de la Paz” (sitio que presenta una actividad antrópica alta) en una jaula con las mismas características que las del grupo experimental situado en La Marina.

Se colectaron 20 ejemplares por cada cultivo a principios del mes de noviembre de 2015 (época de verano). Las condiciones de temperatura y salinidad que se registraron durante la colecta correspondieron a las registradas durante el verano (Temperatura > 30 °C. Salinidad > 35 UPS). Para la época de invierno fueron colectados 20 ejemplares por cada cultivo a principios del mes de abril del 2016. Las condiciones de temperatura y salinidad que se registraron durante la colecta no correspondieron a las registradas durante el invierno (Temperatura > 23 °C. Salinidad > 33 UPS), debido a la presencia del Fenómeno de El Niño durante el año

2015 y parte del 2016, el cual se hizo más notable en la época de invierno del 2015-2016 al registrarse de 2 a 3 °C por arriba del promedio en aguas del Océano Pacífico.

6.3. Trabajo de laboratorio

Los organismos colectados se trasladaron en una hielera con agua marina del sitio donde fueron colectados a las instalaciones de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), donde se realizó la evaluación de parámetros morfométricos y se tomaron muestras de los tejidos de branquia y pie de los moluscos, los cuales se homogenizaron.

Los bivalvos fueron lavados con agua marina del mismo sitio y con un cepillo se retiró la fauna epibionte, con la finalidad de que esta no interfiriera con el peso y talla de los organismos.

Posteriormente las ostras fueron medidas con un vernier ± 0.01 de precisión (Figura 5) y balanza analítica ± 0.001 g de precisión. Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo del índice de condición (IC), rendimiento (R) y tasa de crecimiento (TC)⁽⁵⁸⁾.

- El IC se determinó mediante la siguiente formula:

$$IC = \left(\frac{Pcf}{Pv} \right) * 100$$

Donde:

Pcf: peso de carne fresca.

Pv: peso de las valvas.

- El R se calculó mediante la fórmula:

$$R = \left(\frac{Pcf}{Pt} \right) * 100$$

Donde:

Pcf: peso de carne fresca.

Pv: peso total del organismo.

- La tasa de crecimiento se obtuvo mediante el siguiente calculo:

$$TC = \frac{\textit{Altura de la concha}}{\textit{Nº de días de cultivo de las ostras}}$$

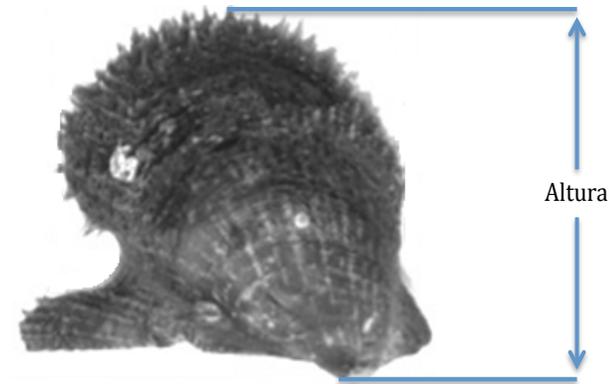


Figura 5. Alto de la concha de *P. sterna*

6.3.1. Obtención de muestras

Una vez tomadas las medidas morfométricas se realizó la extracción de las branquias y tejido muscular del pie de cada uno de los organismos con ayuda de pinzas y tijeras.

Las branquias y el tejido muscular del pie se homogeneizaron con un triturador de tejidos de cuchillas de acero inoxidable (Ultra-Turrax T8) en una solución buffer amortiguadora de fosfato a pH 7.2, el homogeneizado se mantuvo en ultracongelador para el posterior análisis de biomarcadores bioquímicos.

Se tomó una fracción de las branquias de cada organismo para la evaluación de micronúcleos. Las fracciones, fueron colocadas en tubos de ensayo y fijadas con solución de etanol absoluto y ácido acético en relación 3:1 (V/V); de esta manera las muestras se trasladaron a la UAM-I para su posterior análisis.

Del homogenizado total de las de las muestras de branquia se separó 1 mL para la evaluación de lipoperoxidación (análisis que se realizó en las instalaciones del laboratorio de moluscos de la UABCS), el resto de los homogeneizados (branquia y pies), obtenidos de cada organismo, se guardaron en tubos de ensayo y se mantuvieron en un ultracongelador hasta su traslado a las instalaciones de la UAM-I.

Para el traslado de las muestras a la Ciudad de México, éstas se colocaron en una hielera en frío con bolsas de gel congeladas, una vez que las muestras se encontraron en la UAM-I fueron colocadas nuevamente en un ultracongelador.

6.3.2. Evaluación de actividad acetilcolinesterasa

La actividad de la enzima AChE se evaluó en el músculo del pie de los bivalvos por medio de un microensayo (Ellman *et al.* 1961)⁽³⁰⁾. El método de Ellman se basa en el empleo del tioanálogo de la acetilcolina, que al ser hidrolizado genera acetato y tiocolina, ésta última ataca al ácido ditio-benzoico (generando un conjugado incoloro) y al tiobenzoato (cromóforo) cuya producción se puede seguir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm.

Se tomó una alícuota de 1 mL del homogeneizado de la muestra y se centrifugó (Science Med D1008) a 5, 000 x g durante 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante para determinar la actividad AChE. Se colocaron 50 µL de muestra en los pozos de una microplaca junto con un blanco (amortiguador fosfato, pH 7.2). Se añadieron 250 µL de mezcla de reacción (DTNB - 5,5 ditiobis (2 ácido nitrobenzoico) 10 mM - amortiguador fosfato, pH 7.2 - acetiltiocolina 0.075 M. Posteriormente se procedió a leer la absorbancia a 405 nm de longitud de onda (Multiskan Spectrum, USA) y se registró la absorbancia cada minuto durante 5 minutos. Se evaluó la cantidad de proteína en cada una de las muestras por el método de Bradford (1976). La actividad específica de la enzima se expresó como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de acetiltiocolina por minuto por mg de proteína.

6.3.3. Evaluación de lipoperoxidación

El análisis de lipoperoxidación se realizó mediante el método espectrofotométrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés)

desarrollada por Buege y Aust (1978)⁽³²⁾, el cual se fundamenta en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con los subproductos de la peroxidación lipídica, como el malondealdehído (MDA), que es la principal sustancia reactiva al TBA⁽³⁶⁾. Para ello se tomó 1 mL de cada muestra de homogenizado total de branquia y se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se le agregaron 2 mL de la mezcla de reactivos para lipoperoxidación (TCA-TBA-HCL: Ácido Tricloroacético 15% w/v, Ácido Tiobarbitúrico 0.375% y Ácido Clorhídrico 0.25 N). Las muestras se incubaron a 90°C en baño maría durante 15 minutos, después de la incubación se colocaron en un recipiente con agua fría por unos minutos y posteriormente, se transfirieron a tubos Eppendorf de 3 mL y se centrifugaron (Science Med D1008, USA) a 5,000 x g durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se leyó a 535 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Helios Alpha, USA), usando como blanco la mezcla de reactivos para lipoperoxidación. Se evaluó la cantidad de proteína en cada una de las muestras por el método de Bradford (1976). Los resultados se expresaron en nmol de TBARS por mg de proteína⁻¹.

6.3.4. Evaluación de actividad glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se determinó espectrofotométricamente en tejido de branquia de las ostras mediante el método modificado de Lawrence y Burk (1976)⁽⁷⁸⁾ basado en la actividad catalítica de GPx en la reacción del peróxido de hidrógeno con glutatión reducido, mediante el principio del decremento u oxidación continua de NADPH por glutatión reductasa.

Los homogenizados del tejido de la branquia fueron centrifugados (Science Med D1008, USA) a 5,000 x g durante 10 min, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos Eppendorf, que fueron colocados en frío. En tubos de ensayo se preparó la mezcla de reacción (200 μ L) la cual contenía 50 μ L de Tris-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 70 μ L de azida de sodio (NaNO_3 10 mM), 14 μ L peróxido de hidrógeno (H_2O_2 10 mM), 43.5 μ L de agua deionizada, 17.5 μ L de glutatión reducido (GSH 10 mM) y 5 μ L de glutatión reductasa (todos los reactivos fueron preparados con agua deionizada). A la mezcla de reacción se le agregaron 500 μ L del homogenizado de la muestra de branquia dejando incubar durante 2 minutos a 37 °C en baño maría. Posteriormente, se le agregaron 42 μ L de NADPH y se homogenizó rápidamente, siendo transferida la mezcla a una cubeta de cuarzo para leer la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en el espectrofotómetro (Thermo Spectronic Helios Alpha, USA) usando como blanco el amortiguador fosfato (pH 7.2) con el que se realizó el homogenizado de la muestra. Se realizaron dos lecturas en el espectrofotómetro una inicial y otra después de un minuto. Los resultados se expresaron en μ mol NADPH por minuto por mg de proteína.

6.3.5. Evaluación de actividad superóxido dismutasa total

La actividad de superóxido dismutasa total se determinó por el método modificado para microplaca de Winterbourn *et al.* (1975). Esta técnica se basa en la capacidad de la enzima para inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el radical

superóxido generado por la reacción de foto-reducción de la riboflavina (vitamina B₁₂) y el oxígeno⁽³³⁾.

La actividad de SOD se evaluó en homogenizados de tejido de branquia. El homogeneizado se centrifugó a 16,000 x g durante 20 min a 4 °C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se separó en tubos Eppendorf, que fueron colocados en hielo.

En una placa de microtitulación de 96 pozos se añadieron las muestras en diferentes volúmenes: 0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µL (por duplicado), a cada muestra se añadió amortiguador fosfato 0.1 M (pH 7.8) con el fin de que cada pozo tuviera un volumen final de 230 µL (muestra más amortiguador). Posteriormente a cada pozo se añadieron 30 µL de mezcla de reacción compuesta EDTA 0.1M y nitroazul de tetrazolio (NBT 1.5 mM), se incubó durante 10 min., en exposición a iluminación intensa (1000 Lux). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 10 µL de vitamina B₁₂ y se incubó durante 20 min en exposición a luz intensa (1000 Lux). Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 560 nm. La cantidad de proteína en cada una de las muestras se determinó por el método de Bradford (1976). La actividad de SOD se reportó en unidades por mg de proteína⁻¹. Cada unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50 % la reacción del NBT.

6.3.6. Evaluación de actividad catalasa

La actividad de catalasa se determinó por el método de Beutler (1975) basada en la utilización de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁽³⁷⁾. La actividad de catalasa se determinó en homogeneizados de tejido de branquia, que se centrifugó a 3,000 x g durante 5 min y el sobrenadante se recuperó para la evaluación de la enzima. De cada muestra se utilizaron 40 μL que se depositaron en una celda de cuarzo y se les añadieron 1,260 μL de amortiguador de fosfato de potasio (20 mM pH 6.5), posteriormente se le agregó 700 μL de H_2O_2 (30 mM) dando un volumen final de 2 mL. La muestra se mezcló perfectamente y se midió la absorbancia de cada muestra a 240 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV/VIS, inmediatamente al inicio de la reacción y después de 1 min. La cantidad de proteína en cada una de las muestras se midió con el método de Bradford (1976). Los resultados se expresaron en μmol por min por mg de proteína⁻¹. Cada unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para degradar un μmol de H_2O_2 en un minuto.

6.3.7. Estimación del contenido total de proteína

La determinación de proteínas en cada una de las muestras utilizadas para la evaluación de los biomarcadores bioquímicos se realizó por el método de Bradford (1976). El cual se basa en la capacidad del azul de Coomassie para unirse a los residuos de aminoácidos básicos⁽³¹⁾. Se elaboró una curva patrón usando como proteína estándar la albúmina sérica bovina, en un intervalo de 0-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La absorbancia se leyó a 630 nm de longitud de onda (Multiskan Spectrum, USA). A

partir de los valores de proteína se procedió a estimar los valores resultantes de cada muestra para la evaluación de los biomarcadores: AChE, lipoperoxidación, GPx, SOD y CAT.

6.3.8. Determinación de frecuencia de micronúcleos

La frecuencia de micronúcleos se estimó de acuerdo a la técnica modificada de Márquez (1993)⁽⁵⁶⁾. De las muestras de branquia fijadas con etanol absoluto y ácido acético 3:1 (V/V) se obtuvo una fracción y se lavó con solución salina de NaCl 0.9% (P/V), posteriormente el tejido se dejó en la solución salina durante 20 min. Una vez que transcurrió el tiempo, el tejido se disgregó a través de una malla de nylon de 40 μm de diámetro de poro en NaCl 0.9% (P/V). Se tomó una muestra del disgregado con una pipeta Pasteur y se dejó caer la muestra sobre un portaobjetos. Las preparaciones fueron fijadas con etanol absoluto y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez secas, estas fueron teñidas en Giemsa al 2% en amortiguador buffer a pH7.0 (V/V) durante 5 min y se lavaron con agua corriente, dejándolas secar a temperatura ambiente.

La frecuencia de MN se evaluó en cada organismo observando 1000 células con citoplasma completo y con morfología definida, en un microscopio óptico Motic a 1000X. Para el análisis se consideraron los parámetros propuestos por Wrisberg *et al.* (1992), Venier *et al.* (1997) y Sotil *et al.* (2007)^(57,59,60) donde se considera que un MN debe mostrar un tamaño igual o menor a un tercio del núcleo principal (Tabla 2). La frecuencia de MN fue expresada en porcentaje.

Tabla 2. Criterios de selección para el conteo de células y micronúcleos ^(72,74,75)

Criterios para identificación de células	Criterios para Micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente.	Diámetro igual o no mayor a 1/3 del núcleo.
Membrana citoplasmática y nuclear intactas.	Intensidad de tinción similar al núcleo principal.
Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina.	No conectados con el núcleo principal.
Células solas o juntas pero no traslapadas.	

6.4. Análisis estadístico

Para la inferencia estadística de los resultados obtenidos en los biomarcadores evaluados en los dos sitios de muestreo y por temporada, se realizó una prueba de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk con el fin de verificar si los datos cumplían con una distribución normal.

Dado que los datos cumplieron con la normalidad se aplicó una prueba paramétrica t-Student para su análisis con un nivel de significancia de $*p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 7a.

7. RESULTADOS

7.1 ÉPOCA DE VERANO

7.1.1. Índice de condición, rendimiento y tasa de crecimiento

Los índices biométricos de Condición y Rendimiento fueron evaluados en 40 organismos de *P. sterna*. Estas variables morfométricas dan una primera aproximación del estado de salud en el que se encuentra el organismo en relación a su crecimiento y desarrollo. Los resultados obtenidos en el IC en los dos cultivos en la época de verano fueron los siguientes: los cultivos control y experimental mostraron diferencia estadística ($p < 0.05$). Teniendo una mayor biomasa los organismos controles de Isla Gaviota (77.913 ± 35.71 %) en comparación con los experimentales de La Marina (41.264 ± 7.681 %) (Figura 6). El índice de rendimiento en los organismos control mostró un mayor porcentaje (41.77 ± 10.79 %) que en los organismos experimentales (29.02 ± 3.703 %) encontrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los dos grupos (Figura 7). De acuerdo con el patrón de crecimiento se observó que los organismos de La Marina mostraron un crecimiento menor que los de Isla Gaviota.

El valor de la tasa de crecimiento de los bivalvos de la Isla Gaviota fue de 0.552 mm/día⁻¹ y en las ostras de la Marina de 0.467 mm/día⁻¹ esta tasa es menor a la que presentaron los organismos de la isla Gaviota (Figura 8).

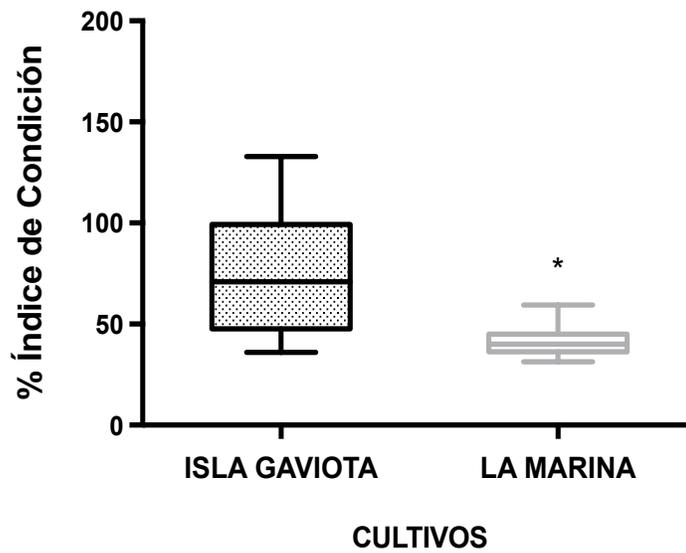


Figura 6. Índice de condición en *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

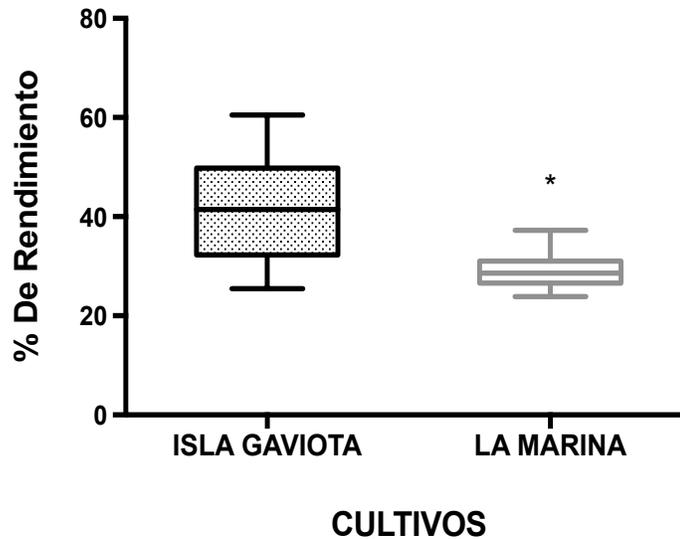


Figura 7. Índice de rendimiento en *P. sterna* durante la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

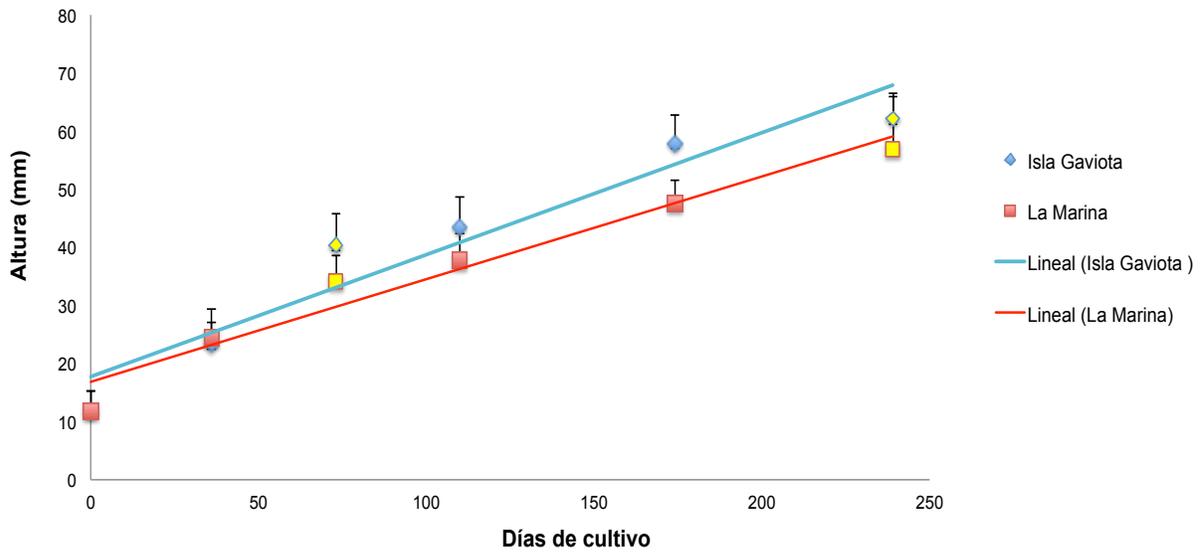


Figura 8. Comparación del patrón de crecimiento de *P. sterna* en las dos épocas verano/invierno en las estaciones La Gaviota (Control) y La Marina (Experimental). Cada uno de los períodos de tiempo considerado representa en promedio de 40 ostras y su respectiva desviación estándar.

7.1.2. Actividad de acetilcolinesterasa

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad específica de acetilcolinesterasa, mostraron que los bivalvos colectados en La Marina tuvieron una actividad menor (3.243 ± 1.271 nmol/min/mg de proteína⁻¹) en comparación con la actividad obtenida de las ostras de Isla Gaviota (4.214 ± 1.122 nmol/min/mg de proteína⁻¹), El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los cultivos (Figura 9).

El porcentaje de inhibición de la actividad de AChE en las ostras perleras obtenidas en La Marina fue de 27.951 %.

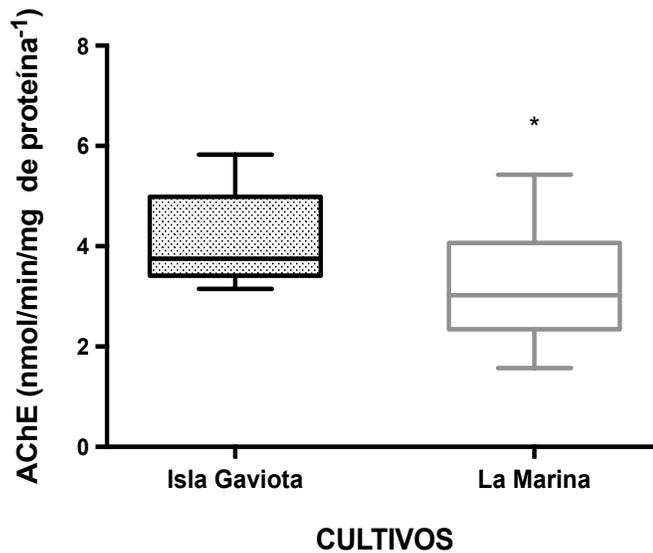


Figura 9. Figura 6. Actividad específica de AChE en extracto de pie de *P. sterna* en época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.1.3. Grado de lipoperoxidación

El posible efecto de los radicales libres sobre el tejido de la branquia se obtuvo por medio de la evaluación del grado de lipoperoxidación, expresada como TBARs (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Los valores obtenidos de TBARs no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos cultivos. Aunque el cultivo experimental de La Marina (1.745 ± 0.730 nmol TBARS/mg de proteína⁻¹) mostró mayor grado de lipoperoxidación en comparación con el cultivo control de Isla la Gaviota (1.372 ± 0.471 nmol TBARS mg/ de proteína⁻¹) (Figura 10).

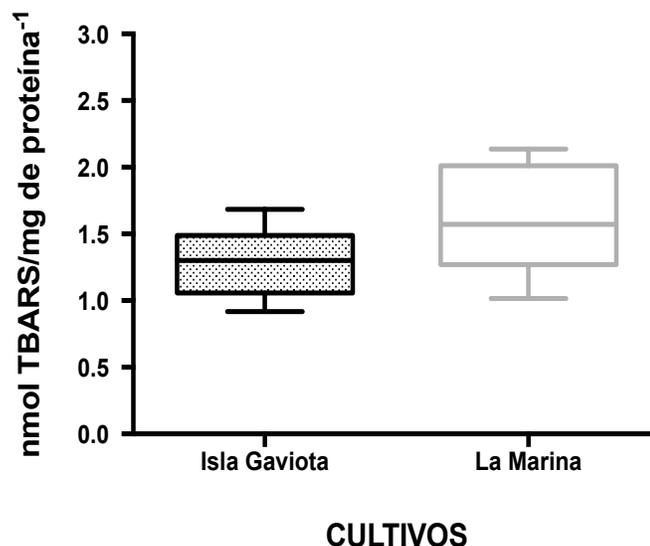


Figura 10. Lipoperoxidación en extracto de branquia de *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.1.4. Actividad de glutatión peroxidasa

La actividad de GPx que presentaron las ostras de los cultivos de Isla Gaviota y La Marina en época de verano no presentaron diferencia significativa estadísticamente ($p < 0.05$); a pesar de que las ostras del cultivo experimental de La Marina tuvieron mayor actividad de GPx ($12.097 \pm 5.465 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg de proteína}^{-1}$) en comparación con la actividad registrada en las ostras del cultivo control de Isla Gaviota ($11.450 \pm 7.807 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg de proteína}^{-1}$) como se observa en la Figura 11.

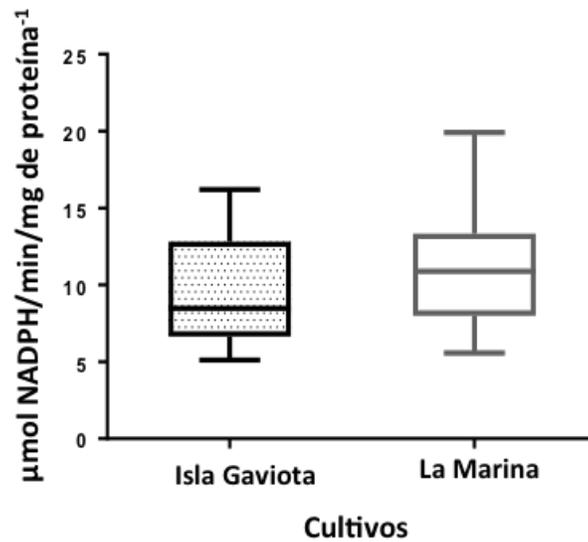


Figura 11. Actividad de GPx en extracto de branquia de *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.1.5. Actividad de superóxido dismutasa total

Los resultados que se obtuvieron en la evaluación de la actividad SOD de los bivalvos obtenidos en la Isla Gaviota y La Marina no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$), a pesar de que se observó un aumento en la actividad de la enzima en el cultivo experimental de La Marina (5.120 ± 1.635 U/mg de proteína⁻¹) en comparación con los del cultivo control de Isla Gaviota (4.701 ± 1.486 U/mg de proteína⁻¹) (Figura 12).

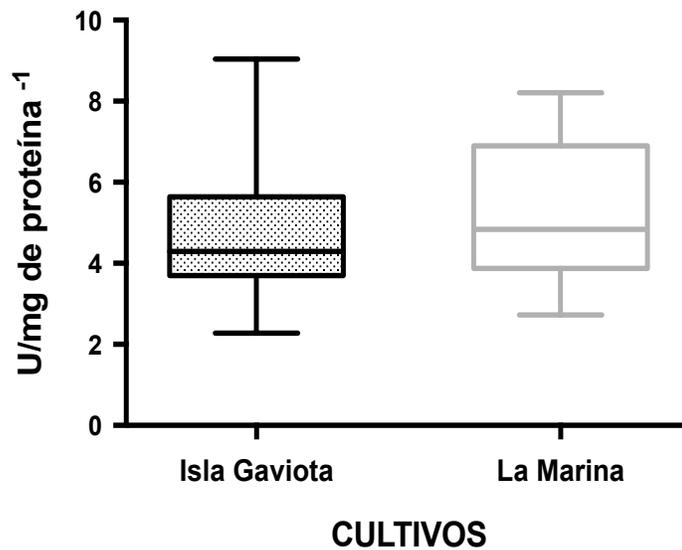


Figura 12. Actividad de SOD en extractos de branquia de *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.1.6. Actividad de catalasa

La evaluación de la actividad de CAT entre los dos cultivos mostró diferencia significativa entre éstos. La actividad más alta de esta enzima se registró en las ostras del cultivo experimental de La Marina ($27.53 \pm 10.439 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹) en comparación con el cultivo control de Isla Gaviota ($22.80 \pm 18.40 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹) (Figura 13).

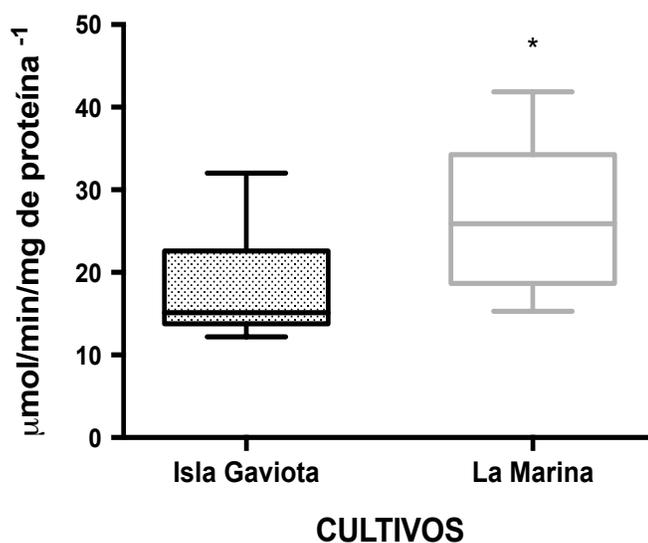


Figura 13. Actividad CAT en extractos de branquia de *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.1.7. Frecuencia de micronúcleos

La frecuencia de micronúcleos entre los dos cultivos fue estadísticamente diferente.

La frecuencia de MN en el cultivo experimental de La Marina (1.114 ± 0.399 %) fue mayor que en el cultivo control de Isla Gaviota (0.166 ± 0.123 %) (Figura 14 y 23).

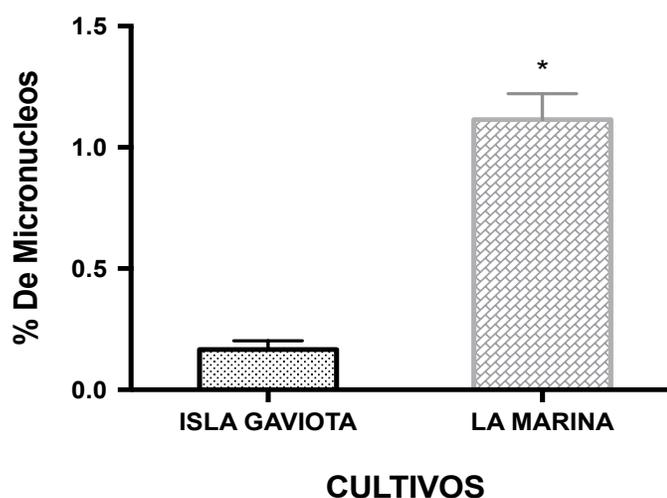


Figura 14. Frecuencia de micronúcleos en branquia de *P. sterna* en la época de verano. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2. ÉPOCA DE INVIERNO

7.2.1. Índice de condición, rendimiento y tasa de crecimiento

En el caso de los organismos colectados en la época de invierno el IC de los bivalvos del grupo control de Isla Gaviota (41.990 ± 6.118 %) y experimental de La Marina (41.380 ± 6.934 %) no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 15), de la misma manera comparando los resultados del Índice de rendimiento de los organismos del cultivo control (29.450 ± 2.982 %) y del experimental (29.110 ± 3.507 %) no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos (Figura 16). El valor de la tasa de crecimiento de las ostras de Isla Gaviota fue de $0.260 \text{ mm día}^{-1}$ y en las de La Marina de $0.238 \text{ mm día}^{-1}$ siendo esta tasa menor a la que presentaron los organismos de la Isla Gaviota (Figura 8).

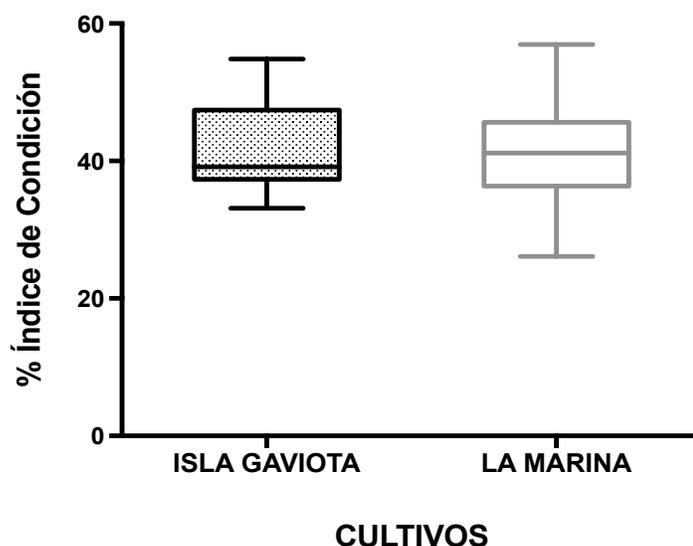


Figura 15. Índice de condición en *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No se encontró diferencia significativa $*p < 0.05$ (control vs experimental).

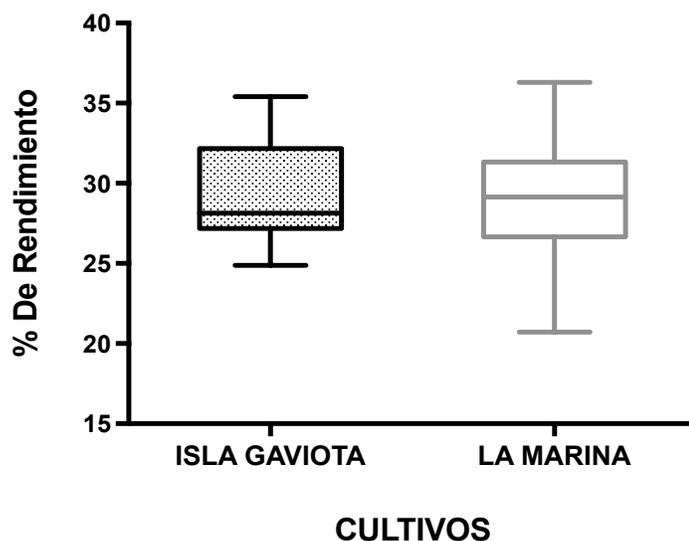


Figura 16. Índice de rendimiento en *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No se encontraron diferencias significativas $*p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.2. Actividad de acetilcolinesterasa

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad específica de AChE en los dos cultivos en la época de invierno mostraron que los organismos del cultivo experimental tuvieron una actividad menor de AChE (7.961 ± 2.226 nmol/min/mg de proteína⁻¹) en comparación con la actividad obtenida de las ostras del cultivo control (10.240 ± 4.296 nmol/min/mg de proteína⁻¹), mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 17). El porcentaje de inhibición de la actividad de AChE en los cultivos experimentales de La Marina fue de 24.374 %.

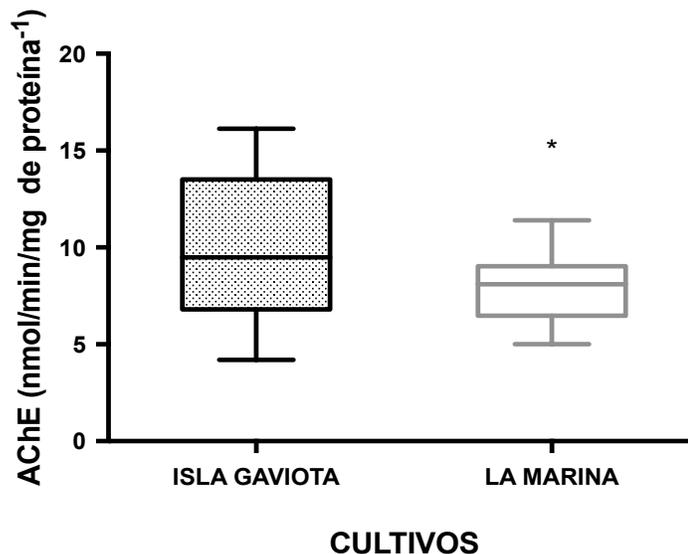


Figura 17. Actividad específica de AChE en extracto de pie de *P. sterna* en época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos por grupo. Cada determinación se realizó por cuadruplicado. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.3. Grado de lipoperoxidación

El grado de lipoperoxidación en el cultivo control de invierno fue mayor (1.120 ± 0.389 TBARS/mg de proteína⁻¹) que en los organismos del cultivo experimental (0.704 ± 0.225 TBARS/mg de proteína⁻¹) mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos cultivos (Figura 18).

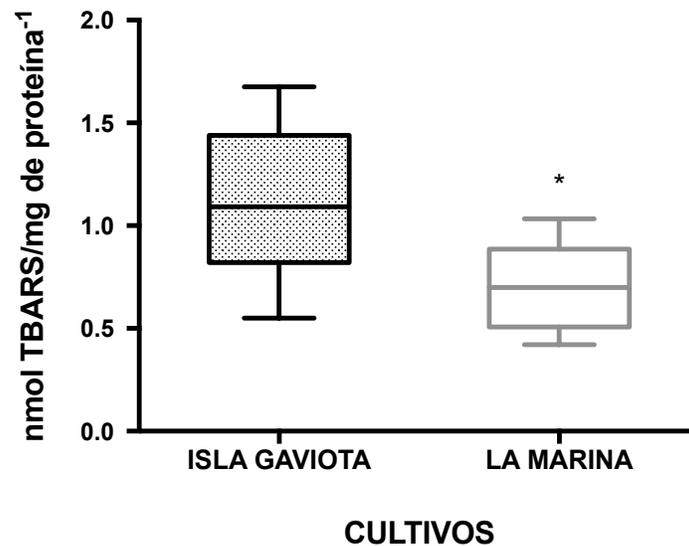


Figura 18. Lipoperoxidación en extracto de branquia de *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.4. Actividad de glutatión peroxidasa

La evaluación de la actividad de GPx entre los dos cultivos mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en época de invierno. La actividad de GPx fue mayor en el cultivo control de Isla Gaviota ($15.306 \pm 32.779 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹) en comparación con el cultivo experimental de La Marina ($4.908 \pm 3.796 \mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹), como se muestra en la Figura 19.

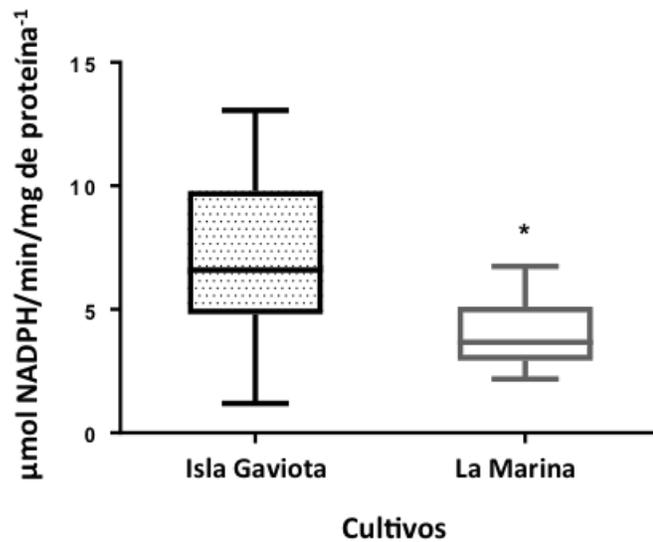


Figura 19. Actividad de GPx en extracto de branquia de *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.5. Actividad de superóxido dismutasa total

Los resultados que se obtuvieron en la estimación de la actividad SOD total en las ostras colectadas en invierno, mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$). Los organismos del cultivo experimental (0.806 ± 0.399 U/mg de proteína⁻¹) tuvieron mayor grado de actividad de SOD en comparación con los organismos del cultivo control (0.535 ± 0.311 U/mg de proteína⁻¹) (Figura 20).

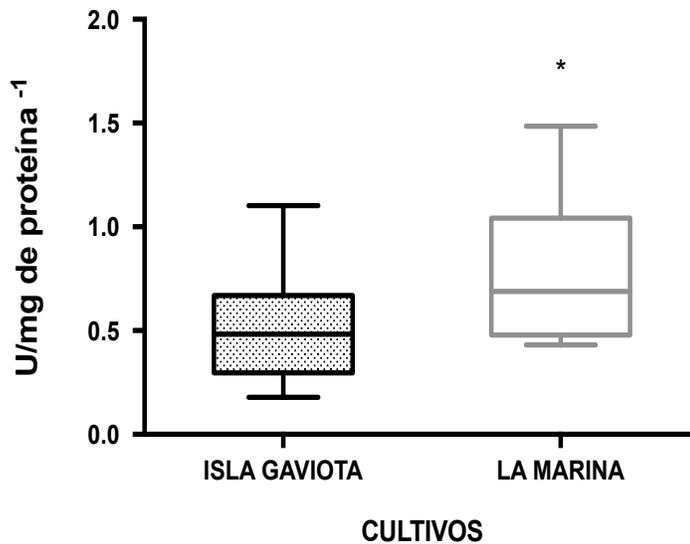


Figura 20. Actividad de SOD en extractos de branquia de *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. Se encontró diferencia significativa * $p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.6. Actividad de catalasa

La evaluación de la actividad de CAT no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos cultivos a pesar de que la actividad de la enzima fue mayor en el cultivo control ($17.720 \pm 9.217 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹) en comparación con el cultivo experimental ($15.800 \pm 2.947 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína⁻¹) (Figura 21).

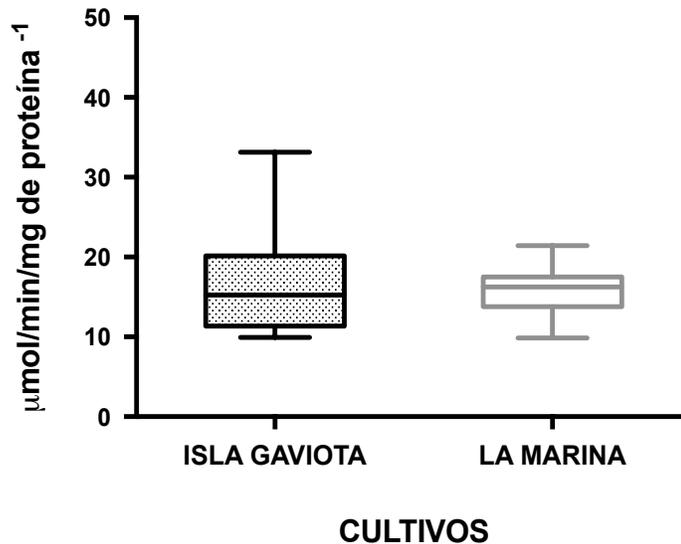


Figura 21. Actividad CAT en extractos de branquia de *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No mostró diferencia significativa $*p < 0.05$ (control vs experimental).

7.2.7. Frecuencia de micronúcleos

La frecuencia de micronúcleos en los dos cultivos de la época de invierno no fue diferente estadísticamente ($p < 0.05$), no obstante la frecuencia de MN en el cultivo control ($0.405 \pm 0.256 \%$) fue mayor que en el cultivo experimental ($0.330 \pm 0.271 \%$) (Figura 22 y 23).

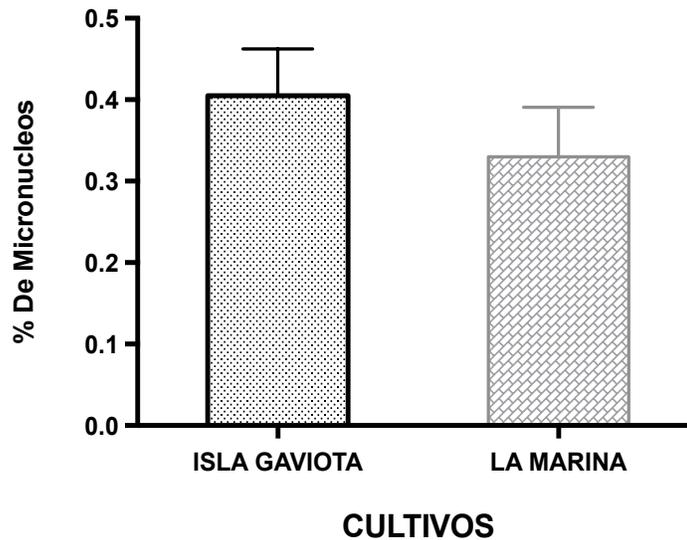


Figura 22. Frecuencia de micronúcleos en branquia de *P. sterna* en la época de invierno. Los valores representan la media y la desviación estándar de 20 organismos en cada grupo. No mostró diferencia significativa. * $p < 0.05$ (control vs experimental).

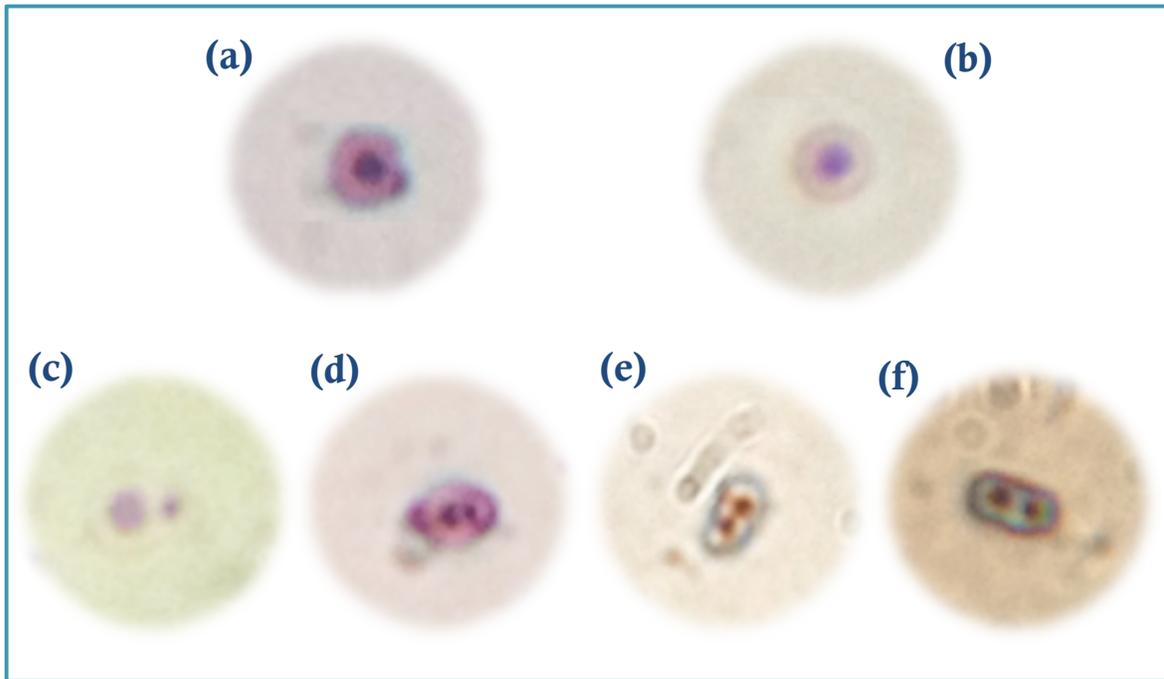


Figura 23. Células observadas en tejido de branquia de *P. sterna* en época de verano e invierno. (a) y (b) células mononucleadas (sin daño), (c), (d), (e) y (f) células con micronúcleo.

7.3. Comportamiento de actividad acetilcolinesterasa en época de verano e invierno

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de los biomarcadores en los organismos de *P. sterna* en época de verano e invierno, el único biosensor que presentó diferencias significativas en las dos estaciones del año fue la actividad específica de AChE. La actividad de esta enzima en las ostras de los cultivos experimentales colocados en La Marina fue menor en la época de verano (3.243 ± 1.271 nmol/min/mg de proteína⁻¹) e invierno (7.961 ± 2.226 nmol/min/mg de proteína⁻¹).

¹) en comparación con la registrada en las ostras del cultivo control de la Isla Gaviota en verano (4.214 ± 1.122 nmol/min/mg de proteína⁻¹) e invierno (10.240 ± 4.296 nmol/min/mg de proteína⁻¹).

Asimismo el porcentaje de inhibición de la actividad de AChE de los organismos obtenidos en los cultivos experimentales de La Marina de las dos épocas presentan un porcentaje similar, siendo 27.951 ± 22.451 % de inhibición para el cultivo experimental en verano y de 24.374 ± 18.050 % para el cultivo experimental en invierno, los cuales no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellos (Figura 24).

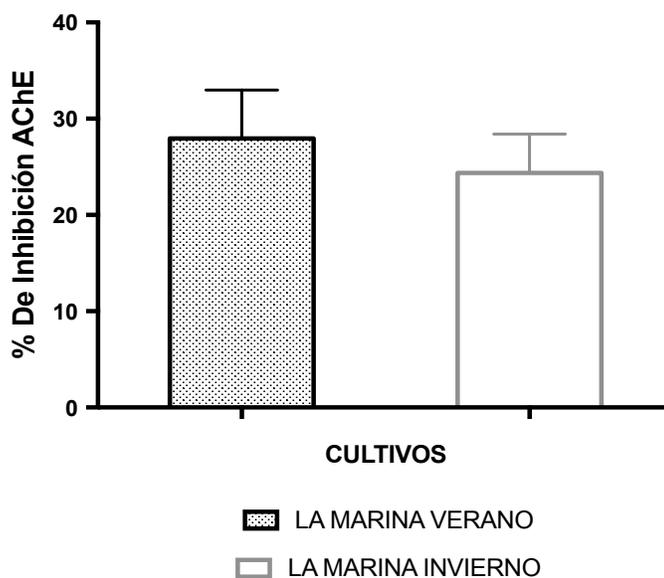


Figura 24. Porcentaje de inhibición en la actividad específica de AChE en los cultivos experimentales (La Marina) en época de verano e invierno. No mostró diferencia significativa * $P < 0.05$ (control vs experimental).

8. DISCUSIÓN

La Bahía de La Paz desde hace algunos años se ha caracterizado por un aumento en la actividad antropogénica proveniente de asentamientos humanos, actividades turísticas, descargas de aguas residuales, actividades de minería, y por erosión geológica que se da de manera natural. Estas actividades han aumentado el aporte de xenobióticos a la zona costera como: metales pesados (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V y Zn), HAPs y posiblemente plaguicidas, los cuales se caracterizan por ser sustancias tóxicas y bioacumulables^(22,38).

Existen distintos biomarcadores bioquímicos y morfofisiológicos (variables morfométricas) que sirven como herramientas importantes para detectar los efectos biológicos de los contaminantes y/o xenobióticos sobre la biota presente en el ambiente marino. En este caso distintas especies de bivalvos son comúnmente utilizados como bioindicadores para la determinación de distintos biomarcadores, los cuales sirven para la evaluación del estado de los organismos acuáticos, así como el biomonitoreo de la calidad del agua del ecosistema⁽³⁹⁾.

Se han hecho grandes progresos en la identificación de biomarcadores bioquímicos en los bivalvos marinos que se utilizan para evaluar su estado de salud. Los biomarcadores más analizados en los bivalvos son los relacionados con estrés oxidante, como: el grado lipoperoxidación (TBARS), la actividad de las enzimas GPx, SOD y CAT, y la inhibición de la AChE para determinar efecto neurotóxico. Los anteriores biomarcadores bioquímicos han sido evaluados para determinar los efectos que causan los metales como el Cd, Co, Cr, Cu, Pb, entre otros, sobre los

moluscos en tejido de pie, branquia y glándula digestiva en relación con el estrés oxidante causado por los radicales libres^(30,40). Se sabe que los metales constituyen una fuente importante de estrés oxidante que da como resultado el aumento en el grado de lipoperoxidación, un incremento en la actividad antioxidante de las enzimas GPx, SOD y CAT, y una modificación en la actividad de AChE⁽⁴⁰⁾.

Los datos obtenidos en este estudio en la evaluación de lipoperoxidación, actividad de GPx, SOD, CAT y AChE en las ostras de *P. sterna* del cultivo experimental de La Marina en la época de verano e invierno probablemente podrían estar relacionados con las concentraciones de Cd y Co del sitio, las cuales se encuentran en niveles superiores que causan efectos negativos en los organismos y con los niveles Cu que causan efecto letal. Lo anterior de acuerdo con los niveles establecidos en las tablas de referencia SQUIRTS emitidas por la NOAA⁽³⁵⁾ (Tabla 1).

El aumento en la lipoperoxidación en el tejido de la branquia de los organismos experimentales, respecto al tejido de los organismos control en la época de verano refleja un deterioro en la integridad de la membrana celular indicado un daño oxidante en las células causado probablemente por especies reactivas de oxígeno. El aumento en la alteración de los fosfolípidos de membrana a través de la peroxidación de ácidos grasos se considera uno de los eventos clave del daño oxidante. Varios estudios han evidenciado que la peroxidación de lípidos aumenta en los tejidos de diferentes especies de organismos acuáticos, como resultado de la exposición a contaminantes ambientales⁽⁴¹⁾, en este caso posiblemente por la presencia de metales.

En trabajos anteriores en bioensayos y re-siembra de organismos en zonas contaminadas se ha observado que en concentraciones altas de cobre en sedimentos aumenta significativamente el daño lipídico, mientras que a concentraciones menores la lipoperoxidación disminuye⁽⁴²⁾.

La disminución en la actividad de AChE en el pie de los organismos del cultivo experimental en verano e invierno respecto a los organismos control, implica un daño en la transmisión neuromuscular y nerviosa, estableciendo así neurotoxicidad causada probablemente por metales pesados. En diferentes trabajos se ha establecido que uno de los efectos de los metales: Cd, Cu, Co, Cr, Hg, Pb y Zn, es provocar una inhibición en la enzima AChE similar a lo que ocurre con plaguicidas organofosforados, carbamatos e HAPs^(34,39,43-45).

El porcentaje de inhibición que presentó la actividad de AChE en *P. sterna* en el cultivo La Marina, tanto en verano (27.951 ± 22.451 %) como en invierno (24.374 ± 18.050 %) probablemente es un indicio de peligro para la salud de las ostras, ya que si se hace una extrapolación de los resultados de inhibición de la enzima en los bivalvos a los valores establecidos en individuos expuestos a contaminantes (pesticidas, metales e HAPs), se considera que a partir de un 25% de inhibición en la actividad de AChE, la salud del individuo se encuentra en peligro y se recomienda que los organismos no estén expuestos a los contaminantes mencionados^(34,76,77).

En cuanto a la actividad de GPx en tejido de la branquia, en la época de verano, no mostró diferencia significativa estadísticamente entre los dos cultivos a pesar de que la actividad de esta enzima fue mayor en las ostras de La Marina en comparación

con las de Isla Gaviota. En contraste en la época de invierno la actividad de GPx fue más alta en las ostras de Isla Gaviota mostrando diferencia estadísticamente significativa. Los resultados que se obtuvieron en la actividad de GPx en las muestras obtenidas en La Marina en la época de verano podrían estar relacionados con la presencia de diferentes xenobióticos (metales e HAPs) en el sitio, ya que se ha reportado en diferentes trabajos que la presencia de estos contaminantes en los ambientes acuáticos y su interacción con bivalvos causan estrés oxidante a estos organismos, activando así, mecanismos de defensa antioxidante como la actividad de GPx^(48,80-83).

Por otra parte el incremento en la actividad de GPx que se registró en las ostras de Isla Gaviota en época de invierno podría estar relacionada con el aumento de temperatura en las aguas de este sitio (2 a 3 °C mayor que la habitual en época de invierno) debido al Fenómeno meteorológico de El Niño.

Varios investigadores han reportado que el aumento en la actividad de GPx en la branquia de bivalvos no expuestos a contaminantes, está correlacionada positivamente con la temperatura elevada del agua, en comparación con los bivalvos expuestos a temperaturas normales e incluso menores (esto dependiendo de la especie). Siendo una evidencia de la influencia de éste parámetro ambiental sobre la respuesta antioxidante. Debido a que la diferencia en la temperatura del agua puede estimular un aumento en la respiración, en la tasa metabólica y en el consumo de oxígeno aumentando la generación de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante^(79,80). También, es importante tomar en cuenta que la relación detectada entre la temperatura del agua y la respuesta antioxidante en las branquias

probablemente esté relacionada con el hecho de que este tejido está en contacto directo con el agua, siendo más sensible a fluctuaciones en parámetros ambientales y más propenso a estrés oxidativo que otros tejidos⁽⁸⁵⁾.

La actividad de SOD en el tejido de branquias de las ostras de La Marina en verano no mostró una diferencia significativa estadísticamente respecto a la actividad de SOD en las ostras de Isla Gaviota. Sin embargo, sí se observó que la actividad de SOD en *P. sterna* del cultivo de La Marina en invierno fue mayor en relación con la actividad de la enzima en el cultivo control de Isla Gaviota teniendo una diferencia significativa.

SOD es una enzima antioxidante clave que se encarga de catalizar la dismutación del radical superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno O_2 y se ha observado un aumento en su actividad en los bivalvos que han sido expuestos a diferentes contaminantes, incluidos metales, como es el caso de los cultivos de *P. sterna* en La Marina en las dos épocas de muestreo (verano e invierno)⁽⁴⁶⁾.

El aumento en la actividad CAT en el tejido de la branquia de los organismos experimentales en la época de verano en comparación con los organismos control de Isla Gaviota probablemente se deba a su función como enzima antioxidante contra los radicales libres generados por los metales presentes en el sitio experimental. Debido a que la CAT se encarga de la transformación del H_2O_2 en H_2O y O_2 (compuestos no tóxicos). De esta manera el aumento en la actividad de CAT en los organismos expuestos a contaminantes es un indicio de daño oxidante por metales, así como se ha reportado con anterioridad⁽⁴⁷⁾.

Funcionalmente, SOD y CAT están relacionadas con el estrés oxidante, funcionando como enzimas antioxidantes, las cuales acoplan su función dando como resultado la dismutación o transformación del radical O_2^- hasta H_2O y O_2 neutralizando así los daños causados por los radicales libres. Sin embargo, en varios casos, el acoplamiento de estas dos enzimas no se expresa de manera equilibrada, sino pueden realizar su actividad de forma independiente⁽⁴⁸⁾. Lo anterior podría explicar el comportamiento de la actividad de SOD en el tejido de la branquia de los organismos experimentales del sitio La Marina.

El daño genético evaluado como la frecuencia de micronúcleos en época de verano en las células de branquia, fue significativamente mayor en las ostras de La Marina (1.114 ± 0.399 %) en comparación con el daño detectado en los organismos de Isla Gaviota (0.166 ± 0.123 %) en verano. La mayor frecuencia de MN en los organismos de La Marina probablemente podría relacionarse con la presencia de xenobióticos con efecto genotóxico presentes en el sitio. Se han realizado distintos trabajos de toxicidad en bivalvos expuestos a contaminantes en bioensayos y resiembras de organismos en sitios con diferente grado de contaminación acuática dando como resultado una mayor frecuencia de MN en los organismos expuestos a los contaminantes que en los no expuestos^(65-69,75).

El cobre y el cadmio son agentes que causan daño genotóxico en las células de branquia a diferentes concentraciones, induciendo la formación de MN, siendo mayor la frecuencia de MN en los organismos expuestos que en los organismos controles^(64,66,69). En la zona de La Marina se han reportado concentraciones de Cu y

Cd consideradas que causan daño en los organismos⁽³⁵⁾, esto podría relacionarse de acuerdo con la literatura con la presencia de MN en el cultivo de *P. sterna* en La Marina.

Por otro lado, los datos que se registraron de lipoperoxidación, GPx, CAT y frecuencia de MN en el cultivo control de Isla Gaviota en la época de invierno fueron distintos a los resultados de la época de verano obteniendo mayor grado de lipoperoxidación, mayor actividad de GPx y CAT, y mayor frecuencia de MN en los cultivos control en comparación con los cultivos experimentales de La Marina. A pesar de que los organismos control permanecieron en un ambiente con baja o escasa influencia de contaminantes ambientales. Lo anterior podría relacionarse con un aumento en la temperatura del agua del sitio de referencia (Isla Gaviota) en la época de invierno, la cual fue de 23 °C, dos a tres grados más que la temperatura habitual para esta época del año. Distintos trabajos en donde se han realizado cultivos de bivalvos en sitios naturales de referencia con cambios en la temperatura del agua han reportado presencia de estrés oxidante en los organismos, dando como resultado un aumento en el grado de lipoperoxidación, aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y presencia de daño genético^(39,10,61,63). Así el incremento en la temperatura del agua ha demostrado tener efecto directo en el daño del ADN y por consiguiente en la formación de MN^(69-74,79).

Se ha observado que la actividad CAT varía de acuerdo a la época de muestreo y especie de bivalvo estudiado. Por lo que esta enzima ha sido considerada como un biomarcador muy variable mostrando una reducción en el nivel de la actividad de CAT en bivalvos expuestos a altas concentraciones de contaminantes en el medio

acuático (como metales y pesticidas) en comparación con los organismos control, indicando así una saturación de las defensas enzimáticas y de estrés oxidativo. Finalmente, se ha encontrado que la actividad de CAT en bivalvos expuestos a contaminantes puede no presentar ningún cambio respecto a los que no han sido expuestos^(39,62,80).

De acuerdo con los datos que se obtuvieron de los biomarcadores bioquímicos y las características que poseen los metales presentes en el sitio La Marina se podría relacionar el estrés oxidante causado por metales (Cd, Co y Cu) con el menor crecimiento (índice de condición) y rendimiento que presentaron los organismos de *P. sterna* de La Marina en contraste con los organismos de Isla Gaviota en la época de verano e invierno. En otros estudios se ha reportado que el estrés oxidante que causa el Cd en distintos bivalvos incluso a concentraciones bajas, tiene un fuerte efecto inhibitor sobre funciones bioenergéticas en la mitocondria por su bioacumulación, originando alteraciones en el metabolismo energético dando lugar al deterioro en el crecimiento del organismo, reproducción y baja supervivencia de los bivalvos⁽⁴⁹⁻⁵²⁾. El Cd también provoca necrosis en el epitelio branquial alterando la permeabilidad en sus membranas disminuyendo así la filtración del alimento causando una disminución en la disponibilidad de energía para su metabolismo⁽⁵⁴⁾. Asimismo, el Cd al no ser un metal esencial y que no está involucrado en la mayoría de los procesos enzimáticos u otras actividades biológicas puede ejercer diversos efectos tóxicos en casi todos los procesos fisiológicos de los bivalvos⁽⁵⁵⁾.

En el caso del Cu, es un micronutriente esencial para el crecimiento de los organismos, pero es requerido sólo en cantidades traza, debido a que en altas

concentraciones resulta tóxico para las células, al inducir una alteración en las funciones de las proteínas y consecuentemente la actividad enzimática, y si se encuentra como ión libre, puede generar estrés oxidante y daños en macromoléculas⁽⁵³⁾ alterando al igual que el Cd las funciones fisiológicas.

De manera general se ha observado que los metales provocan un deterioro en el tejido de las branquias dando como resultado una disminución en la filtración y por lo tanto, una menor obtención de oxígeno y alimento, disminución en la tasa de respiración, aumento en la tasa de excreción y disminución en el ritmo cardiaco. Lo anterior, da como resultado una alteración y disminución en el crecimiento de los bivalvos y deterioro en la salud de los organismos^(49, 54).

Respecto a lo descrito previamente, el patrón de crecimiento en el período verano-invierno de *P. sterna* fue mayor en los organismos cultivados en el sitio con baja influencia antrópica Isla Gaviota y menor en el ambiente con alta influencia antrópica La Marina (Figura 6).

Lo anterior, se relacionaría con el daño en distintas biomoléculas y ADN en *P. sterna*, relacionado muy probablemente con la exposición a distintos xenobióticos, debido a que la zona de La Marina donde se realizó el cultivo considerado como expuesto, recibe los aportes de distintos xenobióticos procedentes de asentamientos humanos e industria de la Ciudad de La Paz, B.C.S.⁽²²⁾.

Los resultados del patrón de crecimiento, índices biométricos, biomarcadores bioquímicos y genéticos han demostrado que la contaminación afecta la producción de *P. sterna* en cultivo.

9. CONCLUSIÓN

- 1) Los datos obtenidos en la evaluación de los índices biométricos, biomarcadores bioquímicos y determinación de daño genético indican claramente que las ostras expuestas a niveles más altos de contaminantes como los reportados en La Marina de La Paz provocan un efecto deletéreo en *P. sterna* afectando su estado de salud en la época de verano e invierno.
- 2) El estado de salud de *P. sterna* en época de invierno en el cultivo de Isla Gaviota fue afectado por el incremento en la temperatura del agua del sitio provocado por el fenómeno meteorológico de El Niño.
- 3) Los biomarcadores que aportaron mayor información para establecer el estado de salud de *P. sterna* en cultivo son: actividad de AChE, actividad de GPx, lipoperoxidación y presencia de MN, aunados con los índices biométricos, los cuales aportan información sobre la respuesta de los organismos a diferentes grados de contaminación.
- 4) Con los resultados obtenidos de los distintos biomarcadores evaluados en el tejido de branquia y pie de *P. sterna* se demuestra su utilidad como herramienta para evaluar la calidad ambiental que es determinante para el cultivo exitoso de esta especie.

- 5) Por lo anterior la evaluación de índices biométricos, actividad de AChE, actividad de GPx, lipoperoxidación y presencia de MN se podría establecer como parte de los protocolos de monitoreo y localización de sitios más adecuados para el cultivo óptimo de la ostra perlera *P. sterna*.

10. REFERENCIAS

1. Villanueva-Fragoso, S., Ponce-Vélez, G., Botello, A.V. Sobrino-Figueroa, A.S. y García-Ruelas, C. (2014). *Niveles de contaminación orgánica e inorgánica y toxicidad de sedimentos del sistema lagunar de Tampamachoco, Veracruz (2009-2012)*. En: Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias.(Botello, AV, Rendon JAB, Gold-Bouchot, G, eds. Tercera edición. México. UAC. ICMYL-Cinvestav-Merida. 867-900 p.
2. Arreguín, F., Ramí, M., y Pérez-España, H. (2004). Optimal management scenarios for the artisanal fisheries in the ecosystem of La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico. *Ecological Modelling*, 172(2),373-82.
3. Maeda-Martínez, AN. (2008). *Estado actual del cultivo de bivalvos en México*. En: Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. (Lovatelli A. FAeUI, ed). Taller Técnico Regional de la FAO. 91-100 p.
4. Perez, E.C.J. (2000). Descripción anatómica e histología de la concha nácar *Pteria sterna*, Mollusca: Pteriidae: Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
5. Puig, J.I.C. (2012). Dinámica del reclutamiento de juveniles de concha nácar *Pteria sterna* en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México: Tesis de doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México.

6. Broeg, K., Westernhagen, H.V., Zander, S., Körting, W., y Koehler A. (2005). The "bioeffect assessment index" (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50(5), 495-503.
7. Koeman, J.H. (1991). From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1), 7-10.
8. Bayne, B.L., Clarke, K.R., y Moore, M.N. (1981). Some practical considerations in the measurement of pollution effects on bivalve molluscs, and some possible ecological consequences. *Aquatic toxicology*, 1(3-4), 159-174.
9. Vasseur, P., y Cossu-Leguille, C. (2006). Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*, 62(7), 1033-1042.
10. Tsangaris, C., Papathanasiou, E., y Cotou, E. (2007). Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 66(2), 232-243.
11. Bocchetti, R., Lamberti, C. V., Pisanelli, B., Razzetti, E. M., Maggi, C., Catalano, B., y Regoli, F. (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine environmental research*, 66(1), 24-26.

12. Gravato, C., y Guilhermino, L. (2009). Effects of benzo (a) pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): biomarkers, growth and behavior. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(1), 121-137.
13. Sobrino-Figueroa, A., y Cáceres-Martínez, C. (2009). Alterations of valve closing behavior in juvenile Catarina scallops (*Argopecten ventricosus* Sowerby, 1842) exposed to toxic metals. *Ecotoxicology*, 18(8), 983-987.
14. Castro, B. B., Sobral, O., Guilhermino, L., y Ribeiro, R. (2004). An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology*, 13(7), 667-681.
15. Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr, G. A., y Cairns Jr, J. (Eds.). (2002). *Handbook of ecotoxicology*. CRC Press.
16. Stefano, B., Ilaria, C., y Silvano, F. (2008). Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. *Science of the Total Environment*, 392(1), 99-109.
17. Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., y Dimitriadis, V. K. (2003). Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56(4), 443-470.
18. Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., y Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.

19. Matozzo, V., Formenti, A., Donadello, G., y Marin, M. G. (2012). A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine environmental research*, 74, 40-46.
20. Giarratano, E., Duarte, C. A., y Amin, O. A. (2010). Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 270-279.
21. Scarpato, R., Migliore, L., y Barale, R. (1990). The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutation Research Letters*, 245(4), 231-237.
22. Sobrino-Figueroa, A., y Cáceres-Martínez, C. (2011). Detección de compuestos tóxicos y genotóxicos en sedimentos de la Ensenada de la Paz, B. C. S. México: 44th Annual Meeting of the Western Society of malacologis, La Paz B.C.S.
23. Mendez, L., Palacios, E., Acosta, B., Monsalvo-Spencer, P., y Alvarez-Castañeda, T. (2006). Heavy metals in the clam *Megapitaria squalida* collected from wild and phosphorite mine-impacted sites in Baja California, Mexico. *Biological trace element research*, 110(3), 275-287.
24. Cantú-Medellín, N., Olgúin-Monroy, N. O., Méndez-Rodríguez, L. C., y Zenteno-Savín, T. (2009). Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(1), 60-66.
25. Rank, J., Lehtonen, K. K., Strand, J., y Laursen, M. (2007). DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted

- mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84(1), 50-61.
26. Márquez, C. (2005). Micronúcleos e índice mitótico en branquias de mejillón *Mytilus californianus* (Conrad 1837) expuesto a petróleo. *Revista Internacional de Contaminantes Ambientales*, 21(1):43-48.
27. Izquierdo, J. I., Machado, G., Ayllon, F., d'Amico, V. L., Bala, L. O., Vallarino, E., y Garcia-Vazquez, E. (2003). Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(1), 24-29.
28. Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Metais, I., Mouneyrac, C., y Berthet, B. (2010). Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(7), 1733-1741.
29. Bernal-Hernández, Y. Y., Medina-Díaz, I. M., Robledo-Marengo, M. L., Velázquez-Fernández, J. B., Girón-Pérez, M. I., Ortega-Cervantes, L., y Rojas-García, A. E. (2010). Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology*, 19(4), 819-825.
30. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

31. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
32. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.
33. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., y Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 85(2), 337-341.
34. Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., y Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013.
35. Concentración de metales pesados y HAPs en sedimentos de La Marina e Isla Gaviota, La Paz B.C.S. (2015). Datos obtenidos por el laboratorio de contaminación Marina del ICMYL (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología) UNAM.
36. Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515-540.
37. Beutler, E. (1975). Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune y Stratton.
38. Mendez, L., Palacios, E., Acosta, B., Monsalvo-Spencer, P., y Alvarez-Castañeda, T. (2006). Heavy metals in the clam *Megapitaria squalida* collected

- from wild and phosphorite mine-impacted sites in Baja California, Mexico. *Biological trace element research*, 110(3), 275-287.
39. Cotou, E., Tsangaris, C., y Henry, M. (2013). Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1812-1822..
40. Almeida, E. A., Bairy, A. C. D., de Melo Loureiro, A. P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Onuki, J., y Sigolo, C. A. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 588-600.
41. Jourmi, L., Amine, A., Boutaleb, N., Labbardi, H., Lazar, S., & El Antri, S. (2012). Oxidative stress biomarkers in mussels sampled from four sites along the moroccan atlantic coast (BIG CASABLANCA). *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 13(3), 325..
42. Gaete, H., Hidalgo, M. E., Neaman, A., y Ávila, G. (2010). Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova*, 33(3), 566-570.
43. Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., y Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10(5), 360-375.

44. Cotou, E., Tsangaris, C., y Henry, M. (2013). Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1812-1822.
45. Brown, R. J., Galloway, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A., Jones, M. B., y Depledge, M. H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 267-278.
46. Sellami, B., Louati, H., Dellali, M., Aissa, P., Mahmoudi, E., Coelho, A. V., y Sheehan, D. (2014). Effects of permethrin exposure on antioxidant enzymes and protein status in Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4461-4472.
47. Carreira, S., Costa, P. M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M. H., y Caeiro, S. (2013). Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment-contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64(1), 97-109.
48. Soldatov, A. A., Gostyukhina, O. L., y Golovina, I. V. (2014). Functional states of antioxidant enzymatic complex of tissues of *Mytillus galloprovincialis* Lam. under conditions of oxidative stress. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 50(3), 206-214.
49. Zhao, L., Zhang, Y., Liang, J., Xu, X., Wang, H., Yang, F., y Yan, X. (2014). Environmental cadmium exposure impacts physiological responses in *Manila clams*. *Biological trace element research*, 159(1-3), 241-253.

50. Taylor, A. M., y Maher, W. A. (2012). Exposure–dose–response of *Anadara trapezia* to metal contaminated estuarine sediments. 1. Cadmium spiked sediments. *Aquatic toxicology*, 109, 234-242.
51. Sokolova, I. M., Ringwood, A. H., y Johnson, C. (2005). Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, 74(3), 218-228.
52. Ivanina, A. V., Kurochkin, I. O., Leamy, L., y Sokolova, I. M. (2012). Effects of temperature and cadmium exposure on the mitochondria of oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to hypoxia and subsequent reoxygenation. *Journal of Experimental Biology*, 215(18), 3142-3154.
53. Noll, M. R. (2003). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. *Journal of Environmental Quality*, 32(1), 374.
54. Sobrino Figueroa, A. S. (2001). Efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas en la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1842),(Bivalvia, Pectinidae). Tesis de Doctorado, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México.
55. Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guignonis, J. M., Samson, M., Roméo, M., y Bebianno, M. J. (2009). Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology*, 94(4), 300-308.
56. Márquez, B. C. (1993). Método para obtener metafases en preparaciones de branquias del mejillón *Mytilus californianus* (conrad, 1837). *Revista de investigación científica*, 4(1), 75-80.

57. Wrisberg, M. N., Bilbo, C. M., y Spliid, H. (1992). Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 23(2), 191-205.
58. Cabrera Peña, J. H., Protti Quesada, M., Urriola Hernández, M., y Sáenz Vargas, O. (2001). Crecimiento y madurez sexual de una población de *Saccostrea palmula* (Mollusca: Bivalvia), Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 49(3-4), 877-882.
59. Venier, P., Maron, S., y Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1), 33-44.
60. Sotil, G., Alvis, R., Francia, J. C., y Shiga, B. (2007). Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 249-254.
61. Bocchetti, R., Lamberti, C. V., Pisanelli, B., Razzetti, E. M., Maggi, C., Catalano, B., y Regoli, F. (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine environmental research*, 66(1), 24-26.
62. Sellami, B., Louati, H., Dellali, M., Aissa, P., Mahmoudi, E., Coelho, A. V., y Sheehan, D. (2014). Effects of permethrin exposure on antioxidant enzymes and protein status in Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(6), 4461-4472.

63. Venier, P., Maron, S., y Canova, S. (1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo [a] pyrene. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1), 33-44.
64. Burgeot, T., His, E., y Galgani, F. (1995). The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 342(3), 125-140.
65. Villela, I. V., de Oliveira, I. M., Silveira, J. C., Dias, J. F., Henriques, J. A. P., y da Silva, J. (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaiba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(2), 76-86.
66. Vargas, V. M. F., Migliavacca, S. B., de Melo, A. C., Horn, R. C., Guidobono, R. R., de Sá Ferreira, I. C. F., & Pestana, M. H. D. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2), 141-158.
67. Kandroo, M., Tripathi, N. K., y Sharma, I. (2015). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of fresh water snails exposed to mercuric chloride. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(8):5725-5730.
68. Bolognesi, C., y Cirillo, S. (2014). Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology*, 60(2), 273-284.
69. Dallas, L. J., Cheung, V. V., Fisher, A. S., y Jha, A. N. (2013). Relative sensitivity of two marine bivalves for detection of genotoxic and cytotoxic effects: a field

- assessment in the Tamar Estuary, South West England. *Environmental monitoring and assessment*, 185(4), 3397-3412.
70. Baršienė, J., Rybakovas, A., Garnaga, G., & Andreikėnaitė, L. (2012). Environmental genotoxicity and cytotoxicity studies in mussels before and after an oil spill at the marine oil terminal in the Baltic Sea. *Environmental monitoring and assessment*, 184(4), 2067-2078.
71. Baršienė, J., Lazutka, J., Šyvokienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Bagdonas, E., y Andersen, O. K. (2004). Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. *Environmental Toxicology*, 19(4), 365-371.
72. Baršienė, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Šyvokienė, J., Kopecka, J., & Förlin, L. (2006). Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus spp.* from different zones of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53(8), 469-478.
73. Schiedek, D., Broeg, K., Baršienė, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., y Balk, L. (2006). Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53(8), 387-405.
74. Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
75. Sacchi, A., Mouneyrac, C., Bolognesi, C., Sciutto, A., Roggieri, P., Fusi, M., y Capri, E. (2013). Biomonitoring study of an estuarine coastal ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental pollution*, 177, 82-89.

76. Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., y Fait, A. (2000) "Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction". *Toxicology*, 143(1):5–118.
77. Knudsen, L. E., y Hansen, Å. M. (2007). Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(3), 461-470.
78. Lawrence, R. A., y Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958.
79. Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., y Benedicto, J. (2011). Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in mediterranean waters. *Environmental and molecular mutagenesis*, 52(6), 479-491.
80. Fernández, B., Campillo, J. A., Martínez-Gómez, C., y Benedicto, J. (2010). Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. *Aquatic Toxicology*, 99(2), 186-197.
81. Nahrgang, J., Brooks, S. J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T. J., y Renaud, P. E. (2013). Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic toxicology*, 127, 21-35.

82. Sellami, B., Khazri, A., Louati, H., Dellali, M., Driss, M. R., Aïssa, P., y Sheehan, D. (2015). Effects of anthracene on filtration rates, antioxidant defense system, and redox proteomics in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10956-10968.
83. Taylor, A. M., y Maher, W. A. (2012). Exposure–dose–response of *Anadara trapezia* to metal contaminated estuarine sediments. 1. Cadmium spiked sediments. *Aquatic toxicology*, 109, 234-242.
84. Serrano-García, L., y Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and molecular mutagenesis*, 38(1), 38-45.
85. Fernández G. B. (2012) Evaluación de respuestas bioquímicas y anomalías cito-genotóxicas en mejillón silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) como biomarcador de contaminación ambiental. Tesis de doctorado, Universidad de Murcia, Murcia, España.
86. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
87. Mouriès, L. P., Almeida, M. J., Milet, C., Berland, S., y Lopez, E. (2002). Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 217-229.

88. Brusca, R.C. y Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. 2nd edition. Sinauer Associates. Sunderland.