



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA E HIDROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA

**“Evaluación de la condición fisiológica de la almeja  
*Polymesoda caroliniana* (Bivalva: Corbiculidae)  
expuesta a cadmio”**

---

**T E S I S**  
Que para obtener el grado de  
**MAESTRO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**  
**Biólogo José Ángel Vázquez Castro**

**Comité Tutorial:**

**Directora**  
**Dra. Xochitl Guzmán García**

**Asesoras:**  
**Dra. Guadalupe Barrera Escorcía**  
**Dra. Patricia Ramírez Romero**

Ciudad de México 11 de junio de 2019.

La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo convenio PFP-20-93.

Con el número de beca: 615849.

## COMITÉ TUTORAL

**Dra. Xochitl Guzmán García.** Laboratorio de Ecotoxicología.  
Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la  
Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Directora.

**Dra. Guadalupe Barrera Escorcia.** Laboratorio de Ecotoxicología.  
Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la  
Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Asesora.

**Dra. Patricia Ramírez Romero.** Laboratorio de Ecotoxicología.  
Departamento de Hidrobiología. División de Ciencias Biológicas y de la  
Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Asesora.

El jurado designando por la  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
De la Unidad Iztapalapa, aprobó la tesis que presentó:

**JOSÉ ÁNGEL VÁZQUEZ CASTRO**

**El día 11 de junio del año 2019**

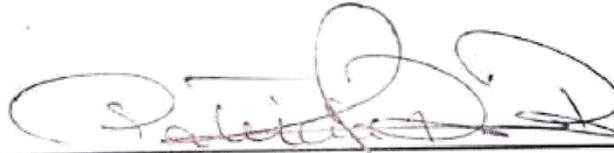
**Miembros del Jurado.**



---

**Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez**

Presidente



---

**Dra. Patricia Ramírez Romero**

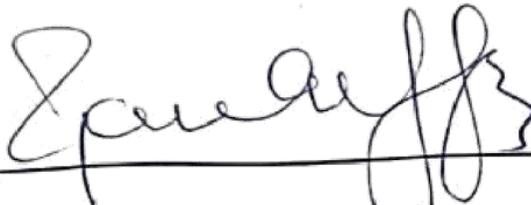
Secretario



---

**Dra. María del Rocío Zarate Hernández**

Sinodal



---

**M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez**

Sinodal

## **Dedicatoria.**

Este trabajo se lo dedico a mi hermosa familia (Papá, Mamá, Hermanos y Mis Adorados Sobrinos), que gracias a ellos y a su apoyo me he podido levantar de las situaciones más adversas y a no dejarme vencer por más oscuro que parezca el camino. Al final siempre habrá una luz con las más grandes y maravillosas sorpresas que la vida nos da.

## **Agradecimientos.**

El camino que he recorrido durante estos dos últimos años se vislumbraba muy lejano y difícil de andar pero la vida me enseñó que no existen imposibles y que con constancia, dedicación y esfuerzo todo se puede lograr.

Quiero agradecer a todos los que estuvieron involucrados en este proyecto, comenzando con mis padres, **Mi mamá**, porque siempre estas impulsándome a ser una mejor persona, alentándome a cumplir mis sueños y no dejar nada pendiente, porque me has enseñado que la vida es muy corta y venimos a ella a disfrutarla. Tú que me diste la vida, desde ese momento te estoy eternamente agradecido. **Mi papá**, gracias por enseñarme que trabajar de sol a sol es la única manera de obtener lo que uno quiere. Tanto a mis hermanos y a mí, nos has guiado con tus sabios consejos y nos han hecho saber que la única herencia que nos van a dejar son los valores y la educación profesional para defendernos en la vida, gracias a ustedes dos, somos lo que somos ahora. **Wicho**, mi hermano mayor, el que siempre está ahí al pie del cañón viendo y velando por todos nosotros, tú ejemplo, dedicación y constancia también es un pilar muy importante en nuestras vidas, tu apoyo también jugó un rol muy importante en este proyecto y juega un papel muy importante en mi vida. **Jana**, mi segunda mamá (mi otra madre tontuela), desde que me quedé a tu cuidado, descuidando tus estudios en aquel tiempo, hiciste de mí un excelente ser humano y que no te quede duda que cada hora, cada minuto y cada segundo que invertiste en mí fue muy bien aprovechado, tan es así que aquí está el resultado de tan gran labor que hiciste conmigo. **Claus**, mi némesis de la infancia (jajajaja) ha como nos peleábamos de niños, tus palabras de apoyo y aliento para continuar con este proyecto sirvieron también para llegar hasta este punto de mi vida. A mis sobrinos, **Diego, Ariel y Dante**, ustedes también son parte importante de este proyecto, ya que sin sus juegos y sonrisas no hubiera podido ver la vida de diferente manera. No existen

palabras para agradecerles a cada uno de ustedes. **LOS AMO CON TODO MI CORAZON.**

A mis mejores amigos de licenciatura y maestría, **Alejandra y Misael**, esta aventura no hubiera sido la misma sin su amistad, compañía, juegos y risas, desde las materias cursadas hasta las largas jornadas de trabajo en el laboratorio, incluso salir hasta a las 10 de la noche. Este y más esfuerzos se ven reflejados al culminar con mucho éxito este posgrado. Los quiero mucho amigos. A mi mejor amigo, al candidato a doctor **Roberto Jerónimo**, nuestra amistad ha trascendido por muchos años, en los cuales, tenemos muchos recuerdos, desde cursar juntos materias de la carrera hasta mi primer viaje al extranjero contigo. Muchas gracias por todo tu apoyo y por haber aceptado ser mi sinodal amigo, te quiero mucho.

A mis mejores amigas, **Pamela, Valeria y Laura**, aunque ya no las veo tan seguido como quisiera, cuando nos vemos pareciera que no ha pasado el tiempo y platicamos con el mismo gusto de siempre. Las quiero mucho amigas.

En el rubro académico, quiero extender un especial agradecimiento a la **Dra. Xochitl Guzmán García**, por ser el faro que me guió en este camino de la investigación, desde mis primeros pasos en el PDI hasta culminar con éxito este posgrado, no tengo palabras para agradecerle el haberme tendido la mano, confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollarme como investigador en su laboratorio.

A la **Dra. Guadalupe Barrera Escorcía** y a la **Dra. Patricia Ramírez Romero**, por fungir y aceptar ser asesoras de este proyecto. Gracias por todos sus consejos y llevar a buen término este trabajo.

A la **Dra. María del Rocío Zarate Hernández**, por aceptar ser parte de mi jurado y ayudarme con la parte estadística de este trabajo. Muchas gracias por su ayuda tan oportuna. Le estaré eternamente agradecido.

A la maestra **Irma Hernández Calderas**, por sembrar en mí la pasión por la histología. Me enseñaste que nunca es tarde para asombrarnos de las cosas más simples que nos rodean. Muchas gracias por tus horas de dedicación en el microscopio.

A la **Dra. Marcela Galar Martínez**, al **Dr. Eloy Gasca Pérez** y a sus alumnos de licenciatura y posgrado por recibirnos y hacernos sentir parte de su laboratorio y además por permitirme aprender nuevas técnicas y ampliar mi visión de la investigación. Siempre se lo agradeceré.

Al **Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez**, por aceptar ser parte de mí jurado y por recibirnos en su laboratorio de bioimagen y enseñarnos la técnica de la estereología, la cual me ahorró mucho tiempo para el análisis de las imágenes. Muchas gracias doctor por su paciencia y grandiosas enseñanzas.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa** por haberme acogido entre sus aulas y obtener de sus excelentes profesores todos su conocimiento convirtiéndome en un profesional.

Al **CONACyT** por darme el apoyo económico necesario para no desertar antes del culmino de este posgrado.

**¡¡¡Muchísimas Gracias!!!**

## Índice

Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tablas .....	x
Índice de Anexos .....	x
Resumen .....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	6
Almeja <i>Polymesoda caroliniana</i> .....	6
Análisis semicuantitativo de respuestas tisulares .....	8
Repositorio de datos ecotoxicológicos .....	9
Justificación .....	12
Área de estudio .....	13
Pregunta de investigación.....	14
Hipótesis .....	14
Objetivo general .....	15
Objetivos particulares.....	15
Materiales y Métodos .....	16
Caracterización y análisis de respuestas tisulares .....	16
Cálculo de índice histopatológico.....	17
Análisis estadístico .....	19
Análisis de la condición fisiológica de los organismos.....	20
Resultados .....	22
Caracterización tisular .....	22
a. Glándula digestiva.....	22
b. Gónada.....	24
c. Órganos adicionales analizados: manto, branquia y pie .....	26
Respuestas tisulares en glándula digestiva y gónada .....	30
a. Glándula digestiva.....	30
b. Gónada.....	32
Asignación de valores de FI e IR .....	33
Índice histopatológico.....	35
a. Glándula digestiva.....	35
b. Gónada.....	37
Discusión .....	42
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	54
Anexos .....	62

## Índice de Figuras

FIGURA 1. ALMEJA <i>POLYMESODA CAROLINIANA</i> , SE DA DETALLE DE LA APARIENCIA EXTERNA, LA CUAL PRESENTA UMBOS EROSIONADOS Y PERIOSTRACO COLOR PARDO O NEGRO. ....	7
FIGURA 2. MAPA DE TECOLUTLA EN RELACIÓN AL ESTADO DE VERACRUZ Y EL GOLFO DE MÉXICO. TOMADO DE JERÓNIMO-JUÁREZ <i>ET AL.</i> , 2018.....	13
FIGURA 3. DIAGRAMA GENERAL PARA EL ANÁLISIS DE ALTERACIONES TISULARES EN ALMEJA <i>P. CAROLINIANA</i> .....	21
FIGURA 4. MICROFOTOGRAFÍA DE GLÁNDULA DIGESTIVA, LA CUAL ESTÁ FORMADA POR MUCHOS TÚBULOS, EL FONDO CIEGO (1), MICROVELLOSIDADES SEÑALADOS CON UNA FLECHA Y UNA MEMBRANA BASAL FINA (2). 10X. 1600 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E.....	24
FIGURA 5. MICROFOTOGRAFÍA DE GÓNADA FEMENINA EN LA CUAL, SE OBSERVAN LOS FOLÍCULOS GERMINALES SEÑALADOS CON CABEZA DE FLECHA, LOS OOGONIOS SEÑALADOS EN UN CÍRCULO AMARILLO, Y LOS OVOCITOS SEÑALADOS CON UNA FLECHA. 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E.....	25
FIGURA 6. MICROFOTOGRAFÍA DE GÓNADA MASCULINA, EN LA CUAL, SE OBSERVAN, LOS FOLÍCULOS GERMINALES, SEÑALADO CON UNA CABEZA DE FLECHA, Y LOS ESPERMATOCITOS SEÑALADOS EN UN CÍRCULO AMARILLO. 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	26
FIGURA 7. MICROFOTOGRAFÍA DE MANTO, EN LA CUAL, SE OBSERVAN TEJIDO EPITELIAL CON CÉLULAS EN FORMA CUBOIDAL, SEÑALADO CON UNA CABEZA DE FLECHA, HEMOCITOS, SEÑALADOS CON UNA FLECHA Y TEJIDO CONECTIVO (TC). 10X. 1600 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	27
FIGURA 8 MICROFOTOGRAFÍA DE BRANQUIA, EN LA CUAL, SE OBSERVA TEJIDO EPITELIAL DE TIPO SIMPLE (TE), TEJIDO CONECTIVO (TC) FORMANDO LA BASE COLUMNAR DE LA LAMELA BRANQUIAL Y LAS MICROVELLOSIDADES SEÑALADAS CON FLECHAS. 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	28
FIGURA 9. MICROFOTOGRAFÍA DE PIE, EN LA CUAL, SE FIBRAS MUSCULARES (FM) LONGITUDINALES Y TRANSVERSALES EN UNA MATRIZ DE TEJIDO CONECTIVO. 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	29
FIGURA 10. MICROFOTOGRAFÍAS DE GLÁNDULA DIGESTIVA. SE OBSERVA INCREMENTO DE TAMAÑO DE CÉLULAS CAFÉ (CC), ATROFIA EN TEJIDO CONECTIVO (ATR) Y SECRECIONES EOSINÓFILAS (SE). 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	31
FIGURA 11. MICROFOTOGRAFÍAS DE GLÁNDULA DIGESTIVA. SE OBSERVA LA PRESENCIA DE GRANULOMA (CABEZA DE FLECHA). 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	32
FIGURA 12. MICROFOTOGRAFÍA DE GÓNADA EN LA CUAL SE PUEDE OBSERVAR EL INCREMENTO DE TAMAÑO DE LAS INCLUSIONES ESFÉRICAS (IE) DENTRO DE LOS FOLÍCULOS GERMINALES. 40X. 400 $\mu\text{m}^2$ (ÁREA DE FOTOGRAFÍA). TINCIÓN H-E. ....	33
FIGURA 13. COMPARACIÓN DE ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS EN GLÁNDULA DIGESTIVA. SE OBSERVA AUMENTO DE DAÑO EN ORGANISMOS EXPERIMENTALES. ....	37
FIGURA 14. COMPARACIÓN DE ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS EN GÓNADA. SE OBSERVA AUMENTO DE DAÑO EN ORGANISMOS EXPERIMENTALES CON SEDIMENTO. ....	39
FIGURA 15. REPRESENTACIÓN DE MONTAJE DE BIOENSAYO DE EXPOSICIÓN A CADMIO CON ALMEJA <i>P. CAROLINIANA</i> . ....	63

## Índice de Tablas

TABLA 1. ESQUEMA PROPUESTO PARA EL CÁLCULO DEL ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO SEGÚN LOS CRITERIOS ESTABLECIDOS POR CUEVAS <i>ET AL.</i> , 2015. ....	18
TABLA 2. LISTADO DE LOS TEJIDOS QUE COMPONEN CADA UNO DE LOS ÓRGANOS OBSERVADOS Y ANALIZADOS.....	30
TABLA 3. LISTADO DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS POR ÓRGANO INDUCIDAS POR EXPOSICIÓN SUBLETAL (300 µg/L) A CADMIO. ....	34
TABLA 4. MATRIZ HISTOPATOLÓGICA DE GLÁNDULA DIGESTIVA DE ORGANISMOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES CON Y SIN SEDIMENTO CON RESPUESTAS BIOLÓGICAS ANALIZADAS E ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO OBTENIDO. ....	36
TABLA 5. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS EN GLÁNDULA DIGESTIVA.....	36
TABLA 6. MATRIZ HISTOPATOLÓGICA DE GÓNADA DE ORGANISMOS CONTROLES Y EXPERIMENTALES CON Y SIN SEDIMENTO CON RESPUESTAS BIOLÓGICAS ANALIZADAS E ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO OBTENIDO. ....	38
TABLA 7. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE ÍNDICES HISTOPATOLÓGICOS EN GÓNADA. ....	38
TABLA 8. PORCENTAJE DE ORGANISMOS EXPUESTOS A CADMIO ASOCIADOS A UN ÍNDICE HISTOPATOLÓGICO.. ....	40
TABLA 9. PROMEDIO DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LOS ORGANISMOS ANALIZADOS. ....	65

## Índice de Anexos

ANEXO 1. ACLIMATACIÓN Y MONTAJE DE BIOENSAYO. ....	62
ANEXO 2. TÉCNICA HISTOLÓGICA ESTANDARIZADA PARA EL PROCESAMIENTO DE TEJIDOS DE LA ALMEJA <i>P. CAROLINIANA</i> . ....	64
ANEXO 3. PROMEDIO DE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS.....	65
ANEXO 4. ESTADÍSTICA APLICADA PARA GLÁNDULA DIGESTIVA ORGANISMOS NO EXPUESTOS A CADMIO.....	66
ANEXO 5. ESTADÍSTICA PARA GLÁNDULA DIGESTIVA DE ORGANISMOS NO EXPUESTOS A CADMIO VS ORGANISMOS EXPUESTOS A CADMIO. ....	67
ANEXO 6. ESTADÍSTICA APLICADA PARA GÓNADA EN ORGANISMOS NO EXPUESTOS A CADMIO. ....	68
ANEXO 7. ESTADÍSTICA PARA GÓNADA DE ORGANISMOS NO EXPUESTOS A CADMIO VS ORGANISMOS EXPUESTOS A CADMIO. ....	69
ANEXO 8. ESTADÍSTICA PARA ÍNDICES OBTENIDOS DE GLÁNDULA DIGESTIVA Y GÓNADA....	70
ANEXO 9. COMPARACIÓN DE ÍNDICES DE ORGANISMOS EXPUESTOS A CADMIO.....	71

## Resumen

En el monitoreo ambiental, se propone la evaluación cualitativa de alteraciones histológicas como biomarcador para evaluar los efectos de la contaminación en organismos acuáticos. Sin embargo, no se consideran herramientas de análisis cuantitativas que permitan determinar la salud de los organismos silvestres o experimentales. El objetivo del trabajo fue calcular el índice histopatológico de salud de almejas *Polymesoda caroliniana* expuestas a 300 µg/L de cadmio (en dispositivos con sedimento y sin sedimento) a través del análisis cuantitativo de alteraciones tisulares. Se analizaron 80 preparaciones de gónada y glándula digestiva teñidas con H-E. Se caracterizaron las alteraciones patológicas y se construyó una matriz de prevalencia. A cada alteración se le asignó un factor de importancia patológica (1 a 3) y un valor ascendente según la diseminación de la alteración. Los datos fueron tratados estadísticamente a través de la prueba de student's T (cuando los datos presentaron normalidad y homocedasticidad) y U-Mann Whitney (cuando los datos no presentaron normalidad u homosedasticidad) para evaluar las diferencias entre los organismos control y experimentales. Las alteraciones observadas en organismos expuestos a cadmio fueron: células cafés, atrofas, secreciones eosinófilas en glándula digestiva; en gónada sólo se observaron inclusiones esféricas. Las alteraciones observadas son de tipo 2 (moderado reversible) y el índice de salud en la gónada fue de 0.6, lo que significa que este órgano tuvo mayor daño con respecto a la glándula digestiva. Se recomienda el uso de categorías de evaluación histopatológica en otros órganos para establecer un índice de salud general en organismos expuestos a cadmio, que permitan inferir los efectos del cadmio en organismos silvestres.

## **Abstract**

In environmental monitoring, the qualitative evaluation of histological alterations has been proposed as a biomarker to evaluate the effects of contamination in aquatic organisms. However, quantitative analysis tools that allow the determination of the health of wild or experimental organisms are not considered. The aim was to calculate the health index of clams *Polymesoda caroliniana* exposed to 300 µg/L of cadmium (in devices with sediment and without sediment) through the quantitative analysis of tissue alterations. 80 preparations of gonad and digestive gland stained with H-E were analyzed. The pathological alterations were characterized and a prevalence matrix was constructed. Each alteration was assigned a pathological importance factor (1 to 3) and an ascending value according to the dissemination of the alteration. Data were statistically analyzed with the Student's T test (when the data presented normality and homoscedasticity) and Mann-Whitney U test (when the data did not present normality or homoscedasticity) to evaluate the differences between the control and experimental organisms. The observed alterations in organisms exposed to cadmium were: brown cells, atrophies, eosinophilic secretions in the digestive gland; only spherical inclusions were observed in the gonad. The alterations observed are type 2 (moderate reversible) and the highest health index was in the gonad of 0.6, which means that it had greater damage with respect to the digestive gland. The use of categories of histopathological evaluation in other organs is recommended to establish a general health index in organisms exposed to cadmium, which will allow inferring the effects of cadmium in wild organisms.

## **Introducción**

Las zonas costeras son regiones de transición entre los componentes marinos y continentales del planeta. Se caracterizan por albergar una amplia diversidad de ambientes y recursos naturales, cualidad que las hace altamente vulnerables a contaminantes (Botello *et al.*, 2010).

Los contaminantes son sustancias que pueden provocar algún daño o desequilibrio (irreversible o no), en un ecosistema, o en un ser vivo, provocando alteraciones negativas del estado natural como consecuencia de la actividad humana (Bermúdez, 2010). Las actividades agrícolas e industriales tienen como efecto la descarga de aguas contaminadas a las zonas costeras a través de la escorrentía modificando las propiedades del agua (Gómez-Mendikute *et al.*, 2009). Existe una gama amplia de contaminantes, entre los cuales se encuentra el cadmio, que puede afectar a los organismos de zonas costeras.

El cadmio (Cd) es uno de los metales potencialmente más tóxicos que se encuentran en la naturaleza (Castillo y Schfer, 2000). En su forma biodisponible puede ser mutagénico o carcinogénico, afectando el crecimiento, la tasa de respiración, la actividad enzimática y la contracción muscular de los organismos (Eisler, 1985).

La mayor parte del cadmio biodisponible en el ambiente proviene de subproductos de la extracción, fundición y refinación de los metales no ferrosos como el zinc, plomo y cobre. En lugar de disponer de él como residuo en el medio ambiente, los ingenieros han sido capaces de utilizar sus propiedades únicas para aplicaciones industriales específicas. El cadmio también se produce a partir del reciclado de las baterías de níquel-cadmio, su uso más grande y como cadmio secundario o reciclado representa en la actualidad alrededor del 23 % de la oferta total de cadmio (ICdA, 2013).

El cadmio es potencialmente teratogénico y se encuentra en diversas lagunas costeras afectando la condición fisiológica de los organismos. Esta, contempla el estado funcional a diferentes niveles de organización, incluyendo sus sistemas, órganos, tejidos, células, así como el fluido extracelular, entre otros.

En estudios ecotoxicológicos existe el término ecofisiología para referirse a “la adaptación de los animales a los cambios ambientales tomando como foco central la relación individuo-ambiente” (Tarifeño, 2004). Esta concepción, permite que la evaluación de los organismos expuestos a contaminantes en las zonas costeras pueda ser realizada mediante el monitoreo biológico y utilizando bioensayos de exposición. El efecto de la exposición y daño resultante de la exposición ante agentes contaminantes puede ser evaluado a través del análisis de respuestas tisulares (histopatología). El análisis tisular ofrece ventajas relevantes en el monitoreo de la contaminación de organismos acuáticos y se ha propuesto el análisis semicuantitativo de las alteraciones patológicas con el fin de evaluar la contaminación acuática mediante coeficientes numéricos (índices histopatológicos) empleando peces (Bernet *et al.*, 1999). Cuevas, *et al.*, (2015) realizó un estudio de evaluación en bivalvos mediante el análisis tisular de varios órganos proponiendo categorías de lesión análogas a las utilizadas por Bernet, *et al.*, (1999) dentro de un protocolo para la evaluación de la contaminación. En estos trabajos, se asignan valores que reflejan la importancia patológica de la lesión (factor de importancia patológica) y la intensidad de reacción. El factor de importancia representa el grado de afectación en la función de un órgano, y la intensidad de reacción indica el grado de diseminación de la lesión que se está analizando.

Sin embargo, en nuestro país no se han establecido protocolos análogos para estimar el impacto de la contaminación sobre los recursos acuáticos, menos aún, factores de importancia asociados las respuestas tisulares, que nos permitan conocer el estado de salud de organismos filtradores, los cuales son ampliamente utilizados en programas del biomonitoreo de la contaminación.

## **Antecedentes**

### **Almeja *Polymesoda caroliniana***

Los moluscos bivalvos, al ser organismos de naturaleza filtradora y sésiles, son excelentes organismos bioindicadores para el monitoreo de la contaminación. Estos animales, además, son reconocidos por su potencial económico, ecológico, alimenticio y biotecnológico. En México, los estudios que emplean moluscos bivalvos para el monitoreo ambiental, consideran la evaluación de respuestas tisulares como una herramienta útil en la toma de decisiones (PRONAME, 2013).

La almeja *P. caroliniana*, es un bivalvo que se caracteriza por presentar una concha no muy larga y ovalada con líneas concéntricas y sin umbo terminal, el color del periostraco es negro-pardo y los umbos tienden a estar erosionados (Figura 1) (Garcia-Cubas & Reguero, 2007; Mille Pagaza *et al.*, 1993).

La distribución de esta almeja se ha reportado desde las costas de Carolina en los Estados Unidos hasta el Golfo de México (Garcia-Cubas y Reguero, 2007). Comercialmente, se trata de la segunda especie más capturada con fines de consumo humano en el Golfo de México (SAGARPA-CONAPESCA, 2013), sin embargo, se encuentra en la categoría de protección especial por la NOM-059 (NOM-059-SEMARNAT, 2010).

Este organismo pasa la mayor parte de su vida inmersa en el sedimento. Los sedimentos asociados a manglares pueden actuar como sumideros y a la vez como una fuente de metales tóxicos (Sundararajan y Natesan, 2010). Por lo que el estudio de los mecanismos de acumulación de los metales en los sedimentos cada día cobra más importancia (Botté *et al.*, 2010).

En el año 2009 se realizó un estudio con esta especie proveniente de Coatzacoalcos, Veracruz, y se evidenció la presencia, en este organismo, de niveles de cadmio más altos ( $1.05 \mu\text{g/g}$ ) en comparación con otra especie (*C. fluminea*) con niveles de cadmio de  $0.45 \mu\text{g/g}$  durante la temporada de secas, por ello, esta almeja es considerada un acumulador neto de Cd, ya que en esta especie se observaron valores más altos comparados con otros organismos (Ruelas-Inzunza *et al.*, 2009). En Tecolutla, Veracruz se realizó un estudio que incluyó la caracterización tisular de tres órganos blanco (branquia, manto y pie) de organismos en estado silvestre en el cual se determinó que existen lesiones de tipo reversible (Jerónimo-Juárez, *et al.*, 2013). Sin embargo, éste y otros trabajos histopatológicos son de tipo descriptivo (Blazer, 2002; Calderón y Valdés, 2012; Cáceres Martínez y Yeomans Vásquez, 2014).



**Figura 1.** Almeja *Polymesoda caroliniana*, se da detalle de la apariencia externa, la cual presenta umbos erosionados y periostraco color pardo o negro.

### **Análisis semicuantitativo de respuestas tisulares**

En el análisis de la contaminación de los sistemas acuáticos se ha propuesto evaluar respuestas tisulares de forma semicuantitativa en peces y moluscos bivalvos (Bernet *et al.*, 1999; Costa, *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2015). Esta evaluación sugiere el cálculo de un índice histopatológico que refleje el grado de daño de un órgano en un organismo. Este tipo de evaluación es un método rápido que puede detectar los efectos crónicos en tejidos y órganos a mediano plazo, es decir, disminuye los tiempos para evaluar los efectos de los contaminantes (Johnson, *et al.*, 1993).

El índice de evaluación histopatológica se calcula a partir de dos valores: factor de importancia patológica (FI) e intensidad de reacción (IR). La evaluación del factor de importancia (FI) en las respuestas tisulares reversibles e irreversibles, asigna valores de 0 para ausencia de lesiones, 1 lesiones reversibles (de mínima importancia patológica), 2 lesiones reversibles (de moderada importancia patológica) y 3 lesiones generalmente irreversibles (de severa importancia patológica). Por otro lado el IR toma valores de 0 a 6 siendo 0 ausencia de lesión 2 = mínima ocurrencia, 4 = moderada ocurrencia y 6 = severa (Bernet *et al.*, 1999).

Según una modificación de la fórmula del índice histopatológico propuesto por Bernet *et al.*, (1999), Cuevas y colaboradores en 2015, indican que los valores del índice oscilan entre 0 y 1. Los valores más cercanos a 0 indican lesiones con menor FI e IR, mientras que los próximos a un índice histopatológico de 1 le corresponden valores mayores de FI e IR, por lo tanto índices calculados cercanos a 1 se entienden como valores que indican un compromiso mayor de la salud que aquellos valores más cercanos a 0.

### **Repositorio de datos ecotoxicológicos**

El uso del análisis de los cambios tisulares dentro de los protocolos para evaluar la contaminación ha sido ampliamente recomendado en programas y proyectos de biomonitoreo, por ejemplo, BIOMAR, *Mussel Watch* y PRONAME, entre otros (Guzmán-García, 2007). Sin embargo, la información generada está desvinculada y no existe una base de datos internacional o nacional que dé cuenta del estado tisular de la información vertida en estas bases que podrían constituir un punto de partida para obtener una evaluación cuantitativa que sirva como base de consulta para generar una visión más amplia de los efectos en los organismos sujetos a diferentes condiciones ambientales y en consecuencia, esta información podría proporcionar elementos que permitan tomar decisiones para el manejo de la contaminación ambiental. En nuestro país no existen protocolos para la evaluación cuantitativa de los efectos de la contaminación a nivel tisular. Existen muchos métodos de monitoreo de parámetros y los estudios suelen ser costosos porque requieren equipo especializado para la determinación de contaminantes; así mismo, permite la evaluación a un nivel de organización intermedio, es decir, a nivel de tejido, indica si el tipo de lesiones pueden ser reversibles o irreversibles, dependiendo del impacto del agente xenobiótico o contaminante (Bernet *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha recomendado la evaluación de los efectos de la contaminación en los organismos, porque son más relevantes que las concentraciones que están en el agua y en el sedimento, ya que los organismos funcionan como integradores del estrés ambiental, y asociados con el biomarcador tisular se pueden generar protocolos que permitan evaluar de manera indirecta la contaminación acuática. Obtener un esquema de valoración permite que personas no expertas en el tema puedan utilizar los

diagnósticos semicuantitativos dentro de los programas de bases de datos de uso y manejo de los ecosistemas acuáticos.

Las bases de datos o repositorios presentan una estructura de programación, que permite la consulta de datos biológicos de manera sistematizada, puede ser de tipo biológico o relacional (CONABIO, 2016; Guzmán-García *et al.*, 2012). Existen datos basificados, como los anuarios de pesca (SIPESCA, 2016), que dan cuenta de los volúmenes de captura, así como el número de especies que se utilizan como recurso económico y ecológico; también existe una base biológica como “Datos Abiertos UNAM” que es un proyecto que reúne información de diferentes colecciones científicas universitarias, en la cual se menciona la distribución y lugar de colecta de muchas especies tanto marinas como terrestres (Datos Abiertos UNAM, 2013); Otra base de datos es *Histology Slides DataBase*, la cual reúne información acerca de observaciones histológicas donde se pueden consultar diferentes esquemas de la estructura tisular (Tauseef, *et al.*, 2012). Existen bases de datos descargables que reúnen imágenes histológicas en el área de salud, cuyo acceso y difusión son libres y gratuitos para cualquier persona interesada en su estudio llamada “Atlas Interactivo de Histología”, proyecto promovido por el Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo (Argüelles *et al.*, 2002).

El laboratorio de Ecotoxicología de la UAM-I (Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa) tiene habilitada una base de datos denominada BD-ETMIRAM (base de datos Ecotoxicológica para el Manejo Integral de los Recursos Acuáticos Mexicanos que contiene datos biológicos los cuales presentan un sistema estructurado que facilita el acceso y el manejo de la información utilizando un modelo de tablas relacionales, esta permite establecer interconexiones (relaciones) entre los

datos (que están guardados en tablas), y a través de dichas conexiones pretende relacionar los datos de ambas tablas, de ahí su nombre: "Modelo Relacional". Una base de datos relacional se compone de varias tablas o relaciones. El sistema interactúa por medio del sitio web: <http://etmira.ecotoxicologia.com/ecotoxicologia.com> y está actualmente restringido a los investigadores del laboratorio. Esta base de datos facilita la consulta de los datos obtenidos en el trabajo de campo y laboratorio. En este sistema la información es agregada a una base de datos relacional realizada con el lenguaje *Structured Query Language* (SQL), cuenta con diversas formas de visualización y descarga de la información. La base de datos contiene y maneja la información obtenida de las salidas de campo, tal como; localización geográfica, parámetros fisicoquímicos y datos de las muestras. También contiene la información obtenida en el laboratorio a través de técnicas diversas como la histopatológica, toma de datos morfométricos, de los organismos, submuestras (órganos o tejidos), laminillas, parámetros biológicos, el diagnóstico de salud y fotografías (Guzmán-García *et al.*, 2012). Las ventajas que ofrecen las bases de datos es que la información almacenada ha sido normalizada y sistematizada previamente, haciendo que la información sea confiable, además ofrece la ventaja para dar continuidad a la información recabada para analizar datos obtenidos y construir nuevos objetivos.

## **Justificación**

En México, la evaluación del daño tisular de manera semicuantitativa en bivalvos, así como las bases de datos generadas con esta información, son pocas o nulas. Este tipo de evaluación semicuantitativa y su diagnóstico obtenido en bases de datos, ofrece ventajas para la toma de decisión en el manejo de los sistemas acuáticos.

El banco de tejidos y la información contenida en bases de datos constituyen oportunidades en la investigación ya que, disminuyen los costos de los muestreos periódicos y permiten que las muestras biológicas e información acumulada en este acervo, puedan ser analizadas de diferente manera. El biomonitoreo utilizando organismos sésiles y de fácil captura, como la almeja, ha sido ampliamente recomendado. Sin embargo, el estatus de las especies silvestres y los efectos de contaminantes no han sido totalmente descritos. Los sistemas acuáticos mexicanos presentan diferentes impactos derivados de los contaminantes críticos, por lo que la evaluación histopatológica puede permitir generar criterios de evaluación tanto de organismos silvestres como de organismos sujetos a pruebas ecotoxicológicas en bioensayos de exposición.

El análisis histológico permite establecer los criterios de evaluación tisular o diagnóstico de salud, de organismos utilizados en estudios de biomonitoreo de la contaminación. Es importante llevar a cabo el análisis semicuantitativo para conocer el estado fisiológico de los órganos blanco. Esta información coadyuvará en estudios posteriores a la evaluación y toma de decisiones relativas al manejo de los recursos acuáticos del país.

## Área de estudio

Tecolutla, es un municipio que se ubica en el estado de Veracruz, colinda al norte con Papantla, al sur con los municipios de Martínez de la Torre y San Rafael, al oeste con Gutiérrez Zamora y al este con el Golfo de México. El área de estudio se ubica entre los paralelos  $96^{\circ} 59' 849''$  W y  $20^{\circ} 27' 628''$  N (Figura 2). Presenta una importante actividad económica en la ganadería, la agricultura y la pesca. Desafortunadamente este municipio y particularmente el Río Tecolutla carece de información sobre su riqueza biológica y los programas de monitoreo ambiental son escasos. A partir del 2010, el proyecto “Indicadores de Integridad Ecológica y salud ambiental (UAM-I) evalúa las condiciones del sistema a través de organismos bioindicadores, uno de ellos es la almeja *Polymesoda caroliniana*.

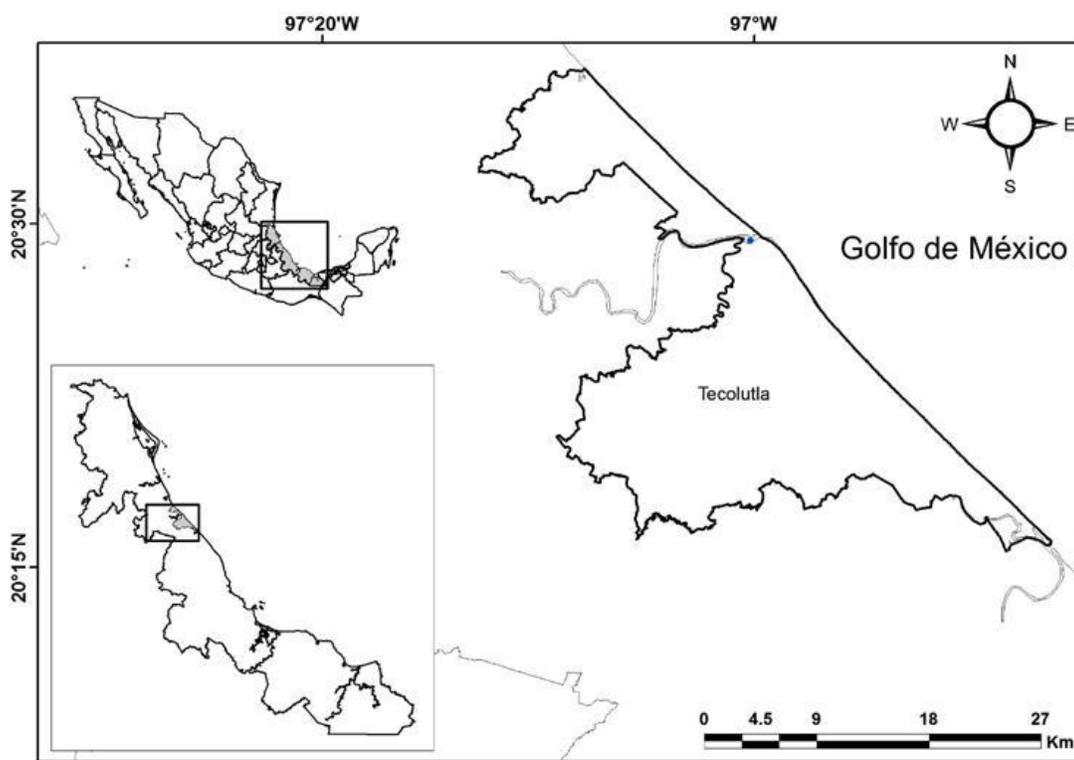


Figura 2. Mapa de Tecolutla en relación al Estado de Veracruz y el Golfo de México. Tomado de Jerónimo-Juárez *et al.*, 2018.

### **Pregunta de investigación**

¿Las respuestas tisulares (reversibles o irreversibles, con mayor o menor prevalencia) en la gónada y glándula digestiva de organismos expuestos a cadmio permitirán calcular el factor de importancia, el índice histopatológico y con ello, evaluar la condición fisiológica de la almeja *P. caroliniana*?

### **Hipótesis**

Si el cadmio genera respuestas tisulares en los órganos de la almeja *P. caroliniana*, entonces las lesiones derivadas de la exposición se podrán categorizar asignándoles un factor de importancia, y con ello se podrá calcular el índice histopatológico para realizar una evaluación semicuantitativa y conocer su condición fisiológica.

### **Objetivo general**

Observar y analizar respuestas tisulares en almejas de la especie *Polymesoda caroliniana* expuesta a cadmio, asignando un factor de importancia para realizar una evaluación semicuantitativa y conocer su condición fisiológica.

### **Objetivos particulares**

- Observar, analizar y evaluar las respuestas tisulares de laminillas provenientes de un bioensayo de exposición subletal a cadmio en almejas de la especie *Polymesoda caroliniana*, cuya información está contenida en la Base de Datos Ecotoxicológica.
- Construir una matriz histopatológica categorizando las respuestas tisulares por su factor de importancia dependiendo del tipo de alteración.
- Calcular el índice histopatológico de dos órganos analizados (glándula digestiva y gónada).
- Determinar y analizar la condición fisiológica mediante el análisis cuantitativo en almejas expuestas a cadmio.
- Ingresar el valor del índice histopatológico de las muestras analizadas en la base de datos BD-ETMIRAM.

## **Materiales y Métodos**

Las muestras analizadas fueron tomadas de un bioensayo de exposición a cadmio a una concentración subletal de 300 µg/L con agua salobre (2 ‰), este bioensayo no fue realizado en este trabajo (los detalles del bioensayo se describen en el Anexo 1).

Los organismos utilizados en el bioensayo fueron medidos mediante un calibrador vernier marca CALIPER® de precisión 0.02 mm, tomando longitud total, ancho y altura de los organismos y pesados con ayuda de una balanza marca OHAUS® modelo CT6000-S. Los tejidos de los organismos expuestos durante el bioensayo se procesaron mediante la técnica histológica (Anexo 2).

En este trabajo se analizaron 80 preparaciones tisulares teñidas con Hematoxilina y Eosina (H-E) provenientes de biopsias de 24 almejas de la especie *Polymesoda caroliniana*, organizadas en: 8 organismos control y 16 organismos expuestos con dos variables experimentales: con sedimento y sin sedimento.

### **Caracterización y análisis de respuestas tisulares**

Se caracterizó tisularmente la unidad funcional de la glándula digestiva (túbulos digestivos) y la gónada (folículos germinales, macho y hembra). Así como, otros órganos como el manto, la branquia y el pie, sin embargo, para el análisis histopatológico sólo se consideraron la glándula digestiva y la gónada. La observación y registro de respuestas tisulares se realizó mediante un microscopio de campo claro marca CARL ZEISS® Primo Star acoplado a una cámara CANON® modelo Power Shot G10. La captura de fotomicrografías y la edición de estas se realizó con el software de digitalización CANON® Utilities Remote Capture DC versión 3.1.0.5. En cada preparación se analizaron 6 campos de 40X aleatorios en

*zig-zag*, abarcando un área de 160000  $\mu\text{m}^2$  por campo (el área total analizada incluidos los 6 campos fue de 960000  $\mu\text{m}^2$ ).

De cada unidad funcional se caracterizó el tipo de tejido que la compone y se analizaron las alteraciones encontradas. De cada alteración se observó el grado de diseminación del daño histopatológico. Los datos obtenidos se ordenaron en una matriz de respuestas tisulares.

#### **Cálculo de índice histopatológico**

Se construyó una matriz con las respuestas tisulares observadas de cada unidad funcional para los dos órganos analizados (glándula digestiva y gónada). Las alteraciones obtenidas, así como el valor de factor de importancia (FI) se asignaron de acuerdo con lo propuesto por Cuevas *et al.*, 2015 (tabla 1).

Además, se propuso la observación de 6 campos por laminilla para estimar la intensidad de reacción de cada alteración observada.

Tabla 1. Esquema propuesto para el cálculo del índice histopatológico según los criterios establecidos por Cuevas *et al.*, 2015.

Órgano	Reacción patrón	Alteración	Factor de Importancia (w)
<b>Glándula digestiva</b>	Alteraciones en túbulos	Atrofia en túbulos digestivos	2
		Necrosis	3
		Células cafés	1
	Alteraciones intertubulares	Infiltración hemocítica	2
		Necrosis	3
		Fibrosis	2
		Granulocitomas	2
		Células cafés	1
	Parasitosis	<i>Nematopsis</i>	3
		<i>Mytilicola intestinalis</i>	2
Otros parásitos		2	
<b>Gónada</b>	Alteraciones interlobulares	Infiltración hemocítica	1
		Fibrosis	2
		Granulocitomas	2
		Células cafés	1
	Alteraciones intralobulares	Necrosis	3
		Infiltración hemocítica	1
		Inclusiones esféricas	2
	Parasitosis	<i>Nematopsis</i>	3

Dónde: w = Peso biológico de la alteración, los autores manejan este término para referirse al factor de importancia patológica (FI), del que hace mención este trabajo.

El cálculo del índice histopatológico de los organismos se realizó empleando la fórmula modificada por Costa *et al.*, 2013 y utilizada por Cuevas *et al.*, 2015. Este índice histopatológico considera, el tipo de lesión, el grado de diseminación de las alteraciones, el órgano estudiado y la integración de la información mediante la relación de los diferentes índices histopatológicos calculados. Para el análisis de la información se utilizó el factor de importancia patológica (FI), con valores de 0 a 3 (donde 0 es ausencia de alteración, 1 es alteración de mínima importancia, 2 es alteración de moderada importancia y 3 es alteración de severa importancia). También se utilizó la intensidad de reacción (IR), utilizando valores de 0 a 6 (donde 0

es sin cambios, 2 es ocurrencia mínima, 4 es ocurrencia moderada y 6 es ocurrencia severa).

Con los valores obtenidos del factor de importancia e intensidad de reacción se aplicó la fórmula descrita en la figura 3 para el cálculo del índice histopatológico ( $I_h$ ). El índice histopatológico se calculó mediante el software "INDEX: Salud y contaminación acuática" (Guzmán-García *et al.*, 2018).

Se calcularon 4 índices histopatológicos para cada órgano analizado (glándula digestiva y gónada), además el promedio del lote experimental por órgano. Cada índice histopatológico se calculó considerando los tratamientos del bioensayo:

1. Control con sedimento (CS)
2. Control sin sedimento (CSS)
3. Experimental con sedimento (ES)
4. Experimental sin sedimento (ESS)

Con el fin de establecer un grado de daño en los lotes experimentales se propusieron rangos de comparación entre los índices histopatológicos considerando un daño bajo de 0 a 0.39, daño moderado de 0.40 a 0.69 y de 0.70 a 1 un daño severo.

#### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos del índice histopatológico fueron tratados estadísticamente previa consideración de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, con ello se aplicaron pruebas student's T y U Mann-Whitney. También se buscó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el promedio general del índice histopatológico de cada órgano. Cada tratamiento se realizó en el programa NCSS-2011 & PASS Trial.

### **Análisis de la condición fisiológica de los organismos**

La integración de todas las alteraciones en un solo valor por órgano facilitó la interpretación de la condición fisiológica de las almejas analizadas, esto se obtuvo calculando el promedio de los índices histopatológicos por órgano de los lotes experimentales y para la comparación de ambos índices histopatológicos se aplicó una prueba estadística U Mann-Whitney por los criterios de normalidad y homocedasticidad.

La información obtenida fue vertida en la base de datos BD-ETMIRAM de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La cual puede ser consultada vía internet a través de la siguiente liga: <http://etmira.ecotoxicologia.com/>.

El diseño general del método se sintetiza en la Figura 3.

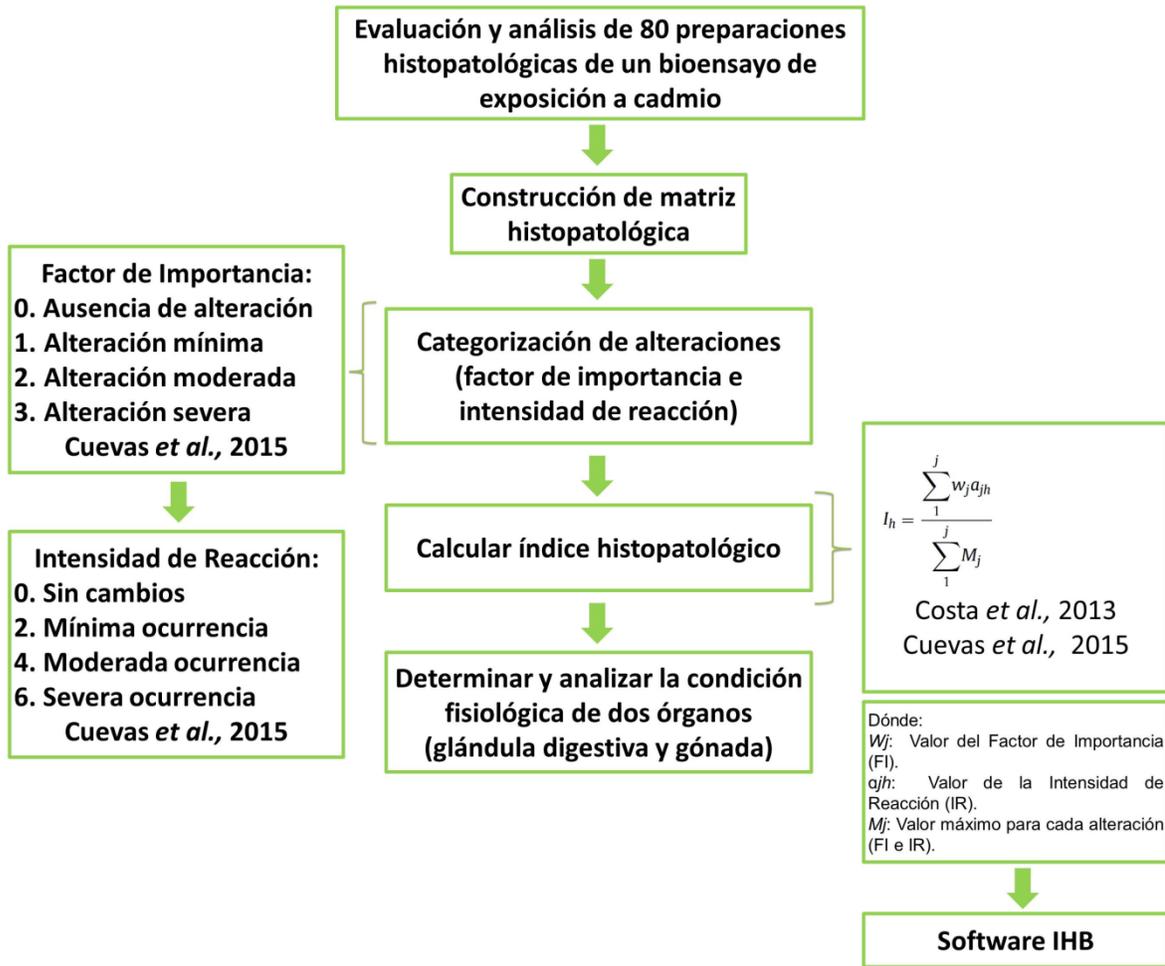


Figura 3. Diagrama general para el análisis de alteraciones tisulares en almeja *P. caroliniana*.

## Resultados

Los parámetros morfométricos de las almejas estudiadas corresponden a organismos adultos (Anexo 3).

### Caracterización tisular

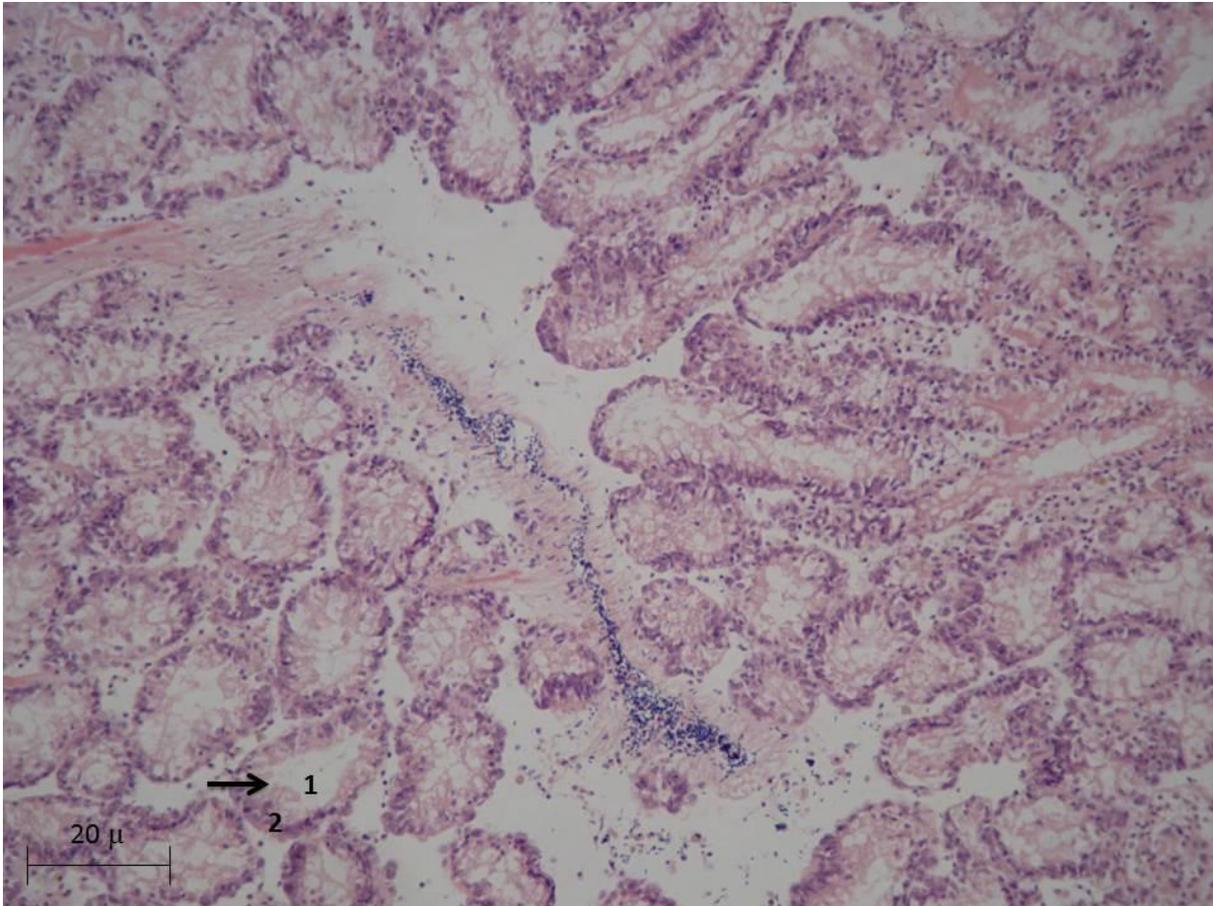
En las 80 preparaciones histológicas se analizó la estructura basal de la glándula digestiva y la gónada.

#### a. Glándula digestiva

En la almeja *P. caroliniana* se observó que la glándula digestiva está estructurada por un tejido epitelial de tipo glandular que reviste al estómago y gran parte del intestino, éste se conforma por numerosos túbulos ramificados de fondo ciego, con ácinos globulares o elongados que se comunican hacia la superficie. Los túbulos digestivos se clasifican de acuerdo con su tamaño en primarios y secundarios; los túbulos primarios son los de menor tamaño y se engrosan hacia la región en donde conectan con el intestino, mientras que los túbulos secundarios son los de mayor tamaño.

La unidad funcional de la glándula digestiva es el tubo digestivo, el cual tiene apariencia circular o elongada. Internamente presentan un lumen de diferente diámetro de acuerdo con el estado de desarrollo digestivo. Estas glándulas están compuestas por un epitelio cilíndrico simple con microvellosidades alternadas con células piramidales. Hacia la superficie apical se pueden observar microvellosidades y hacia la superficie basal una membrana basal fina. Finalmente, los túbulos digestivos se encuentran rodeados por tejido conectivo de tipo laxo (Figura 4). La estructura de la glándula digestiva está asociada directamente con el proceso de

digestión intracelular, la síntesis y secreción de enzimas digestivas, es decir, es el órgano encargado de completar la digestión de las partículas más pequeñas.



**Figura 4. Microfotografía de glándula digestiva, la cual está formada por muchos túbulos, el fondo ciego (1), microvellosidades señalados con una flecha y una membrana basal fina (2). 10x. 1600  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.**

#### **b. Gónada**

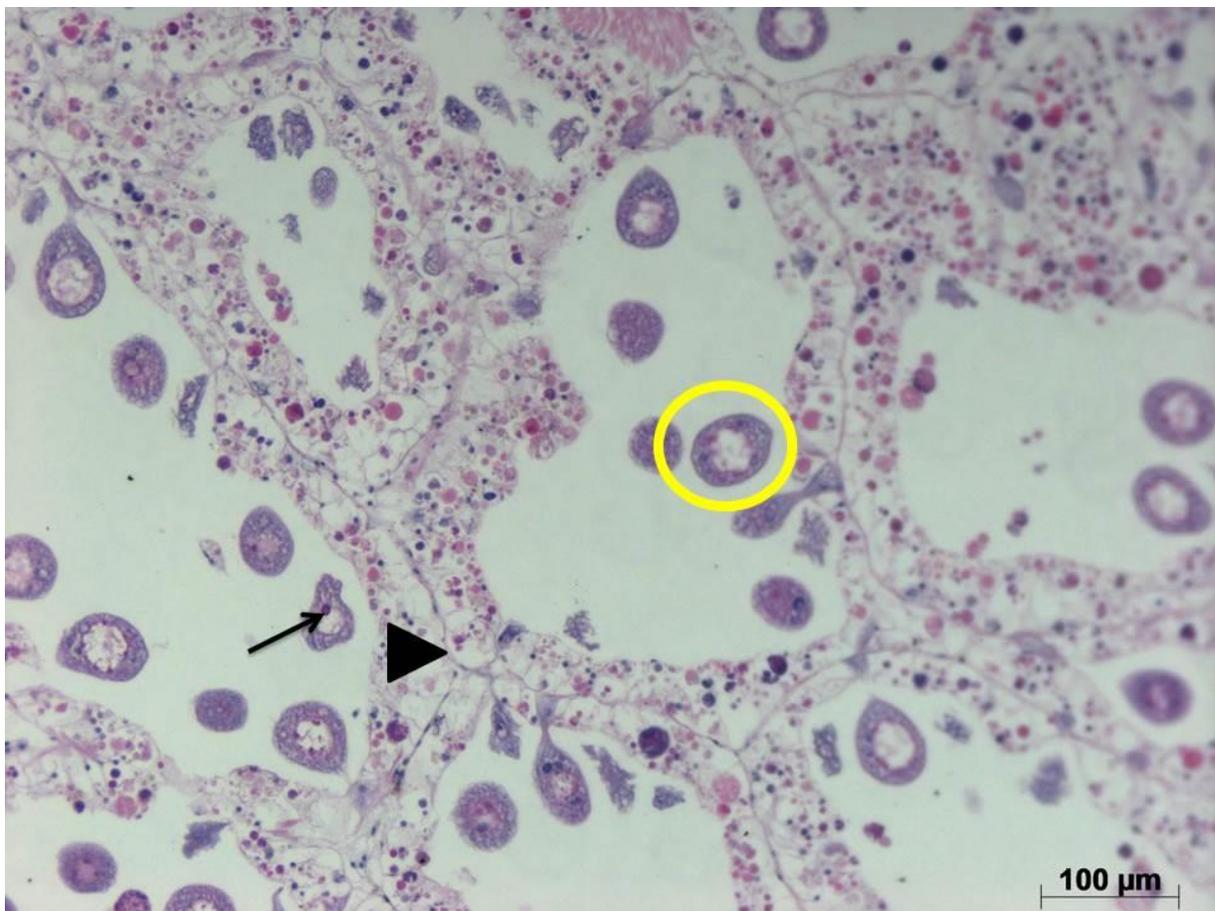
En la almeja *P. caroliniana* se encontró que la gónada se encuentra rodeando directamente al intestino lo que dificulta la disección macroscópica.

Esta especie presenta sexos separados, es decir, son dioicos. Sin embargo, al hacer una revisión macroscópica es imposible saber que sexo presentan, por lo tanto, es necesario realizar observaciones microscópicas para identificar el sexo de cada organismo. El porcentaje de hembras fue del 56 % y el porcentaje de machos fue del 44 %.

La gónada se encontró compuesta por numerosos ácinos o folículos germinales rodeados también por tejido conectivo, el cual hace que cada folículo germinal se encuentre unido.

La unidad funcional de la gónada son los folículos germinales o ácinos en donde se aprecia a las células germinales en diferentes estados de desarrollo.

La gónada femenina se caracteriza por presentar oogonios y ovocitos, los cuales, se encuentran dentro de los folículos germinales (Figura 5).



**Figura 5. Microfotografía de gónada femenina en la cual, se observan los folículos germinales señalados con una cabeza de flecha, los oogonios señalados en un círculo amarillo, y los ovocitos señalados con una flecha. 40x. 400  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.**

La gónada masculina se caracteriza por presentar espermatogonios y espermatocitos, dentro de los folículos germinales, de manera similar a la gónada femenina (Figura 6).

Paralelamente se analizaron otros órganos como el manto, la branquia y el pie.

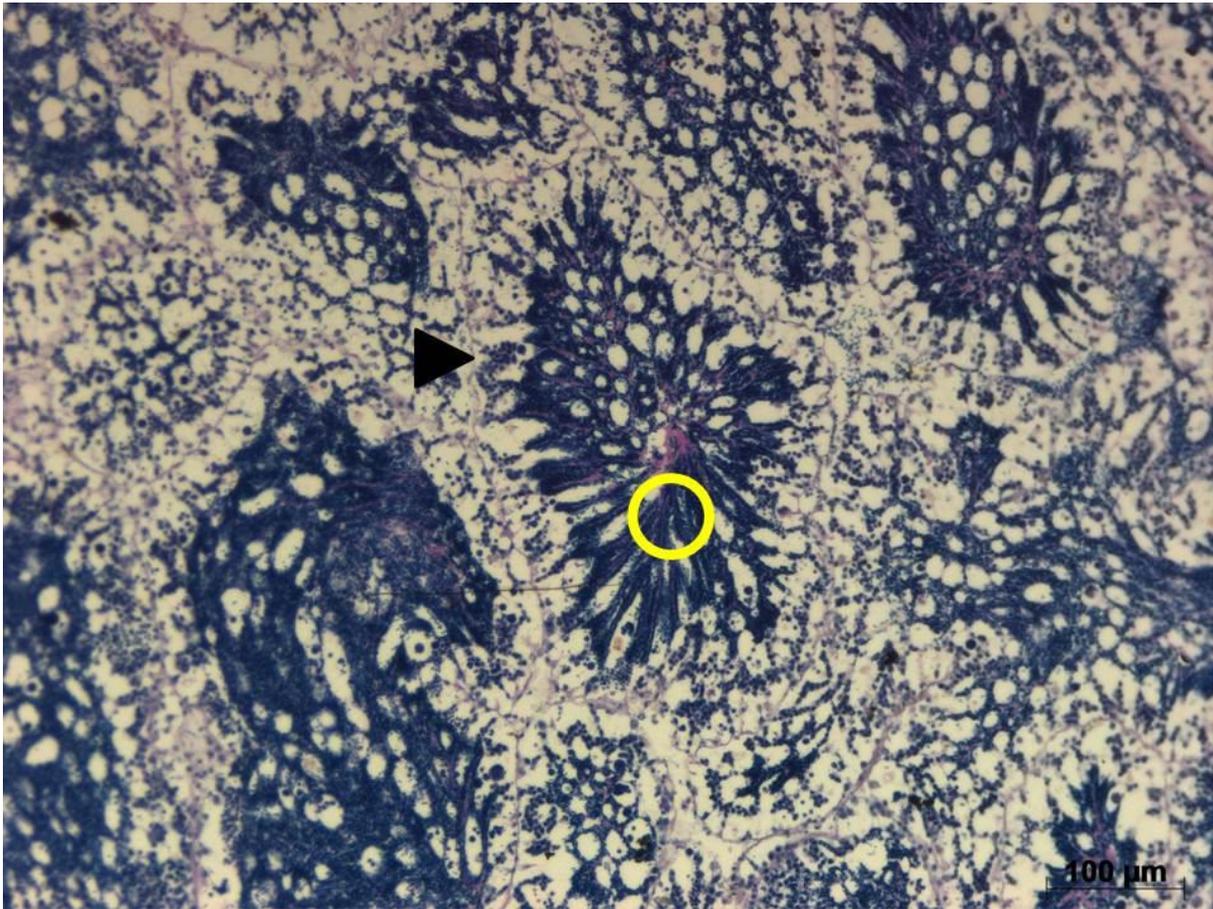
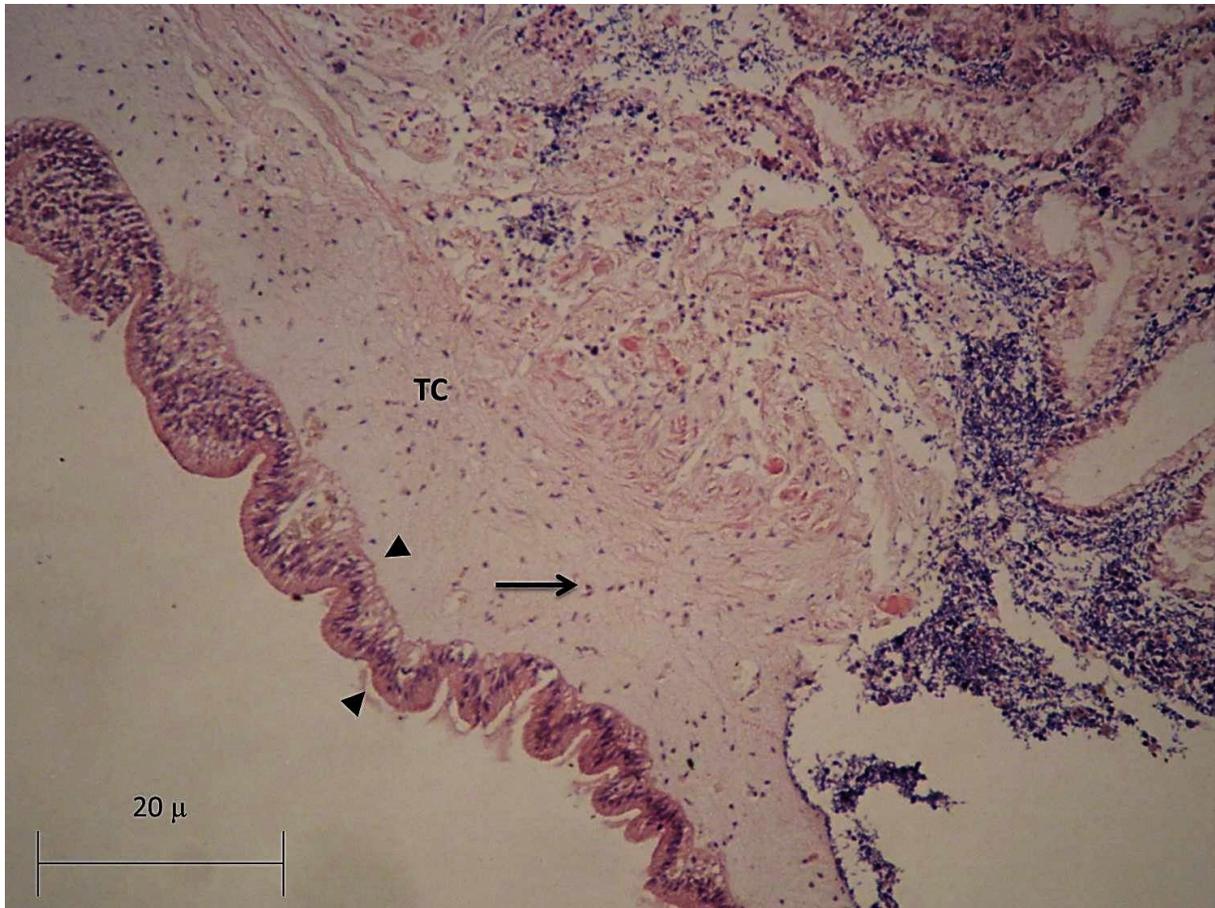


Figura 6. Microfotografía de gónada masculina, en la cual, se observan los folículos germinales señalado con una cabeza de flecha, y los espermatozoides señalados en un círculo amarillo. 40x. 400  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.

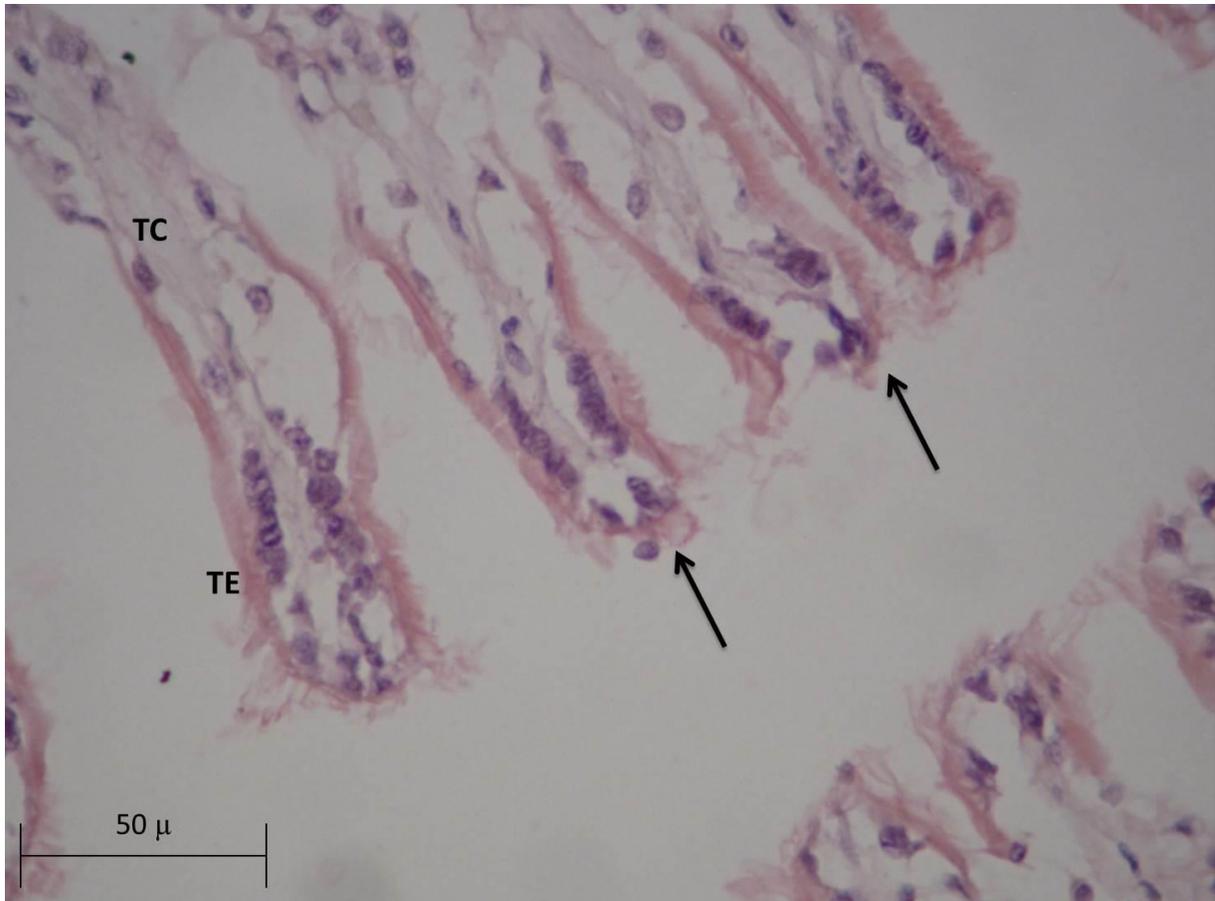
c. Órganos adicionales analizados: manto, branquia y pie

El **manto** es el órgano encargado de la secreción de la concha y del *mucus* (mucosidad). Se encuentra en contacto con el medio y está compuesto principalmente por tejido conectivo con gran cantidad de hemocitos, recubierto por tejido epitelial. Los epitelios de este órgano tienden a ser cuboidales y cilíndricos simples, aunque la forma de las células pueda cambiar de acuerdo con la región del manto que se analice (Figura 7).



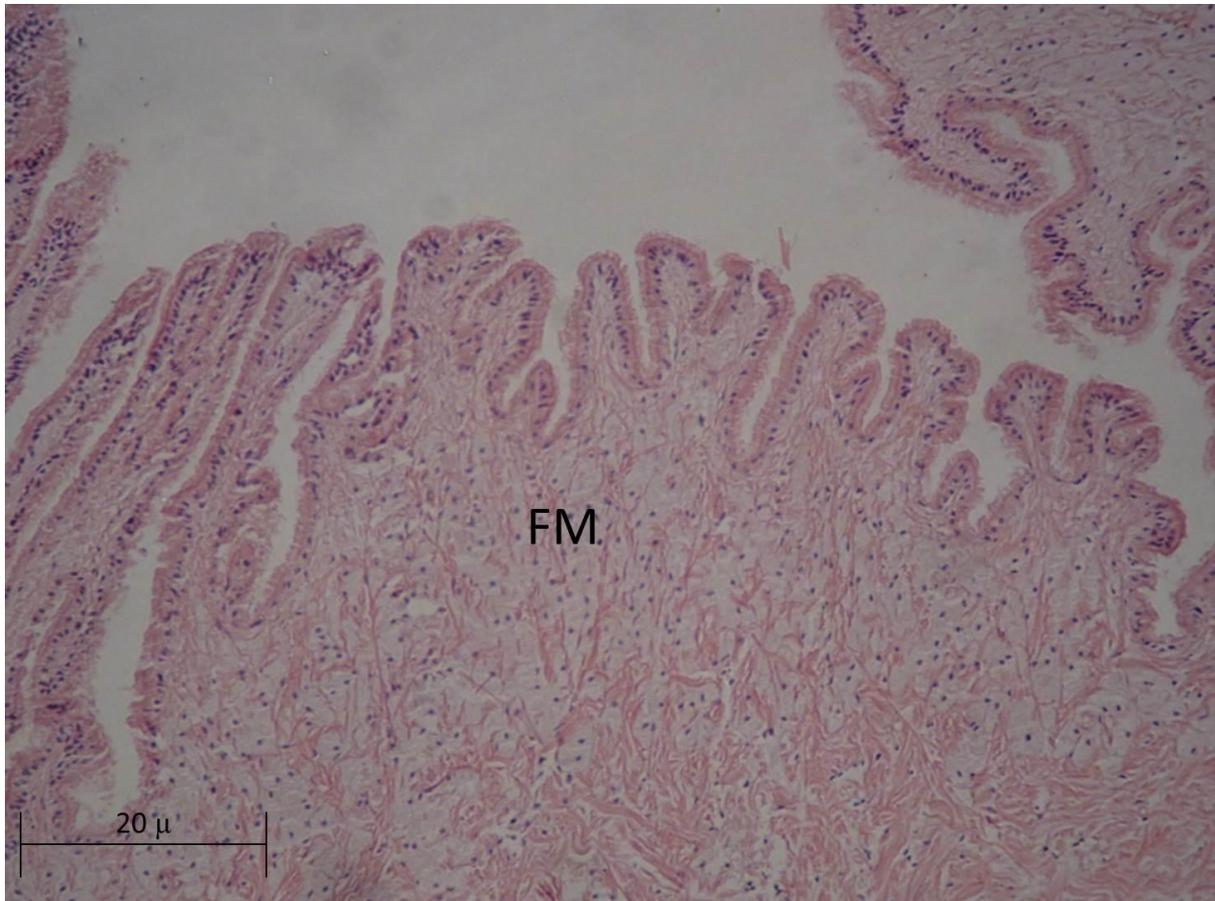
**Figura 7. Microfotografía de manto, en la cual, se observa tejido epitelial con células en forma cuboidal y cilíndrica señalado con una cabeza de flecha, hemocitos señalados con una flecha y tejido conectivo (TC). 10x. 1600  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.**

Las **branquias** son órganos que participan en el intercambio gaseoso y en la selección de partículas alimenticias, se trata de dos pares de laminillas en forma de placas a cada lado del cuerpo conformadas de diversos filamentos que favorecen la conducción del agua. En general los filamentos presentan células mucosas cuboidales simples con microvellosidades que las revisten y favorecen el movimiento del agua para el transporte de oxígeno. El centro de cada filamento y por debajo del epitelio se puede observar tejido conectivo laxo (Figura 8).



**Figura 8** Microfotografía de branquia, en la cual, se observa tejido epitelial de tipo cuboidal simple (TE), tejido conectivo (TC) formando la base columnar de la lamela branquial y las microvellosidades señaladas con flechas. 40x. 400  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.

El **pie** es una estructura que en la mayoría de los bivalvos tienen función locomotora, está formado principalmente por tejido muscular organizado por paquetes de fibras musculares (FM) longitudinales y transversales diseminadas en una abundante matriz de tejido conectivo fibrocolagenoso. Los epitelios de recubrimiento son simples y con posibles presencias glandulares (Figura 9).



**Figura 9. Microfotografía de pie, en la cual, se observan fibras musculares (FM) longitudinales y transversales en una matriz de tejido conectivo. 40x. 400 $\mu$ m<sup>2</sup> (área de fotografía). Tinción H-E.**

A continuación, en la tabla 2 se muestra un resumen de los tejidos observados en cada uno de los órganos analizados de la almeja *Polymesoda caroliniana*, en ella se puede observar que los tejidos en estos órganos están revestidos por epitelios cúbicos y cilíndricos simples, por debajo de los cuales se encuentra una abundante capa de tejido conectivo principalmente laxo, acompañado de tejido muscular con fibras bien definidas para el pie y de tejidos diferenciados en el caso de la gónada.

Tabla 2. Listado de los tejidos que componen cada uno de los órganos observados y analizados.

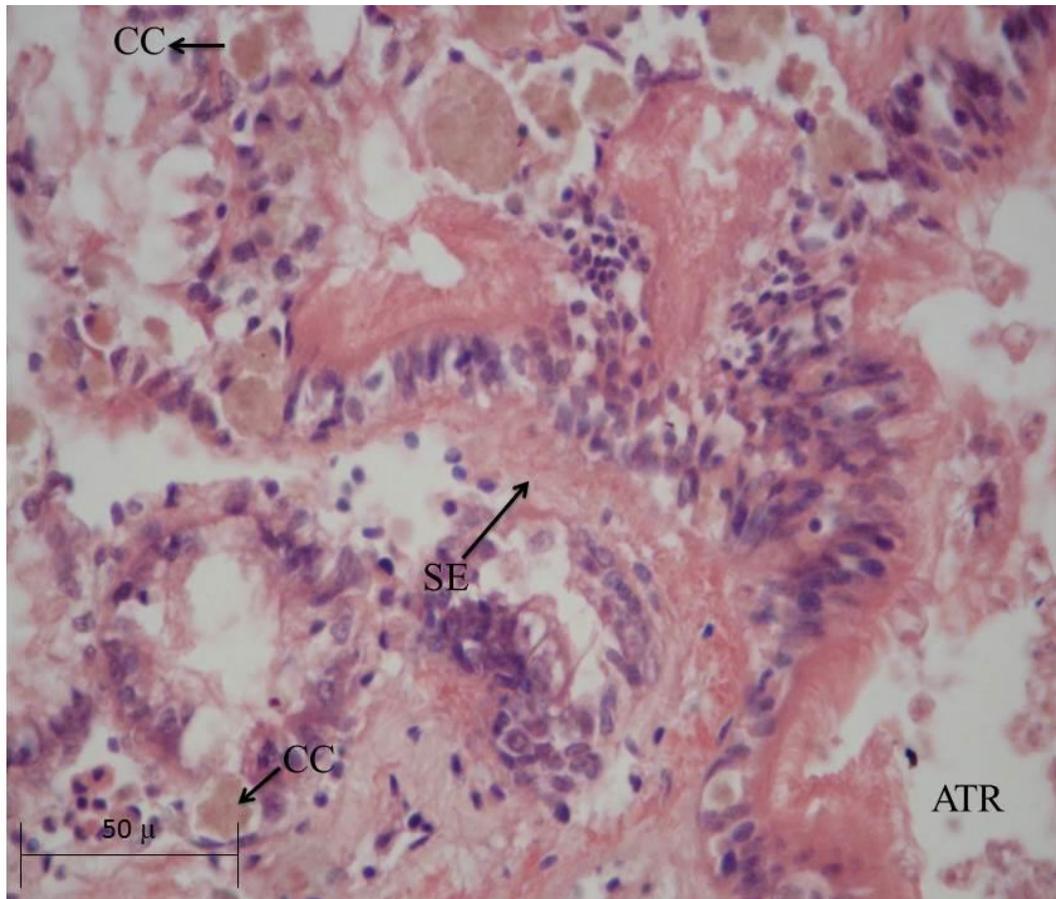
Órgano	Tejidos que lo componen
<b>Glándula digestiva</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Túbulos (globulares o elongados)</li> <li>- Epitelio simple con células en forma columnar y piramidal.</li> <li>- Lumen</li> <li>- Microvellosidades</li> <li>- Membrana basal fina</li> <li>- Tejido conectivo laxo</li> </ul>
<b>Gónada masculina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácinos o folículos germinales</li> <li>- Tejido conectivo</li> <li>- Espermatogonios</li> <li>- Espermatocitos</li> </ul>
<b>Gónada femenina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ácinos o folículos germinales</li> <li>- Tejido conectivo</li> <li>- Oogonios</li> <li>- Ovocitos</li> </ul>
<b>Manto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tejido conectivo con hemocitos</li> <li>- Epitelios simples cuboidales</li> </ul>
<b>Branquia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tejido epitelial</li> <li>- Tejido conectivo</li> <li>- Microvellosidades</li> </ul>
<b>Pie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tejido conectivo</li> <li>- Tejido muscular</li> <li>- Fibras musculares</li> </ul>

#### Respuestas tisulares en glándula digestiva y gónada

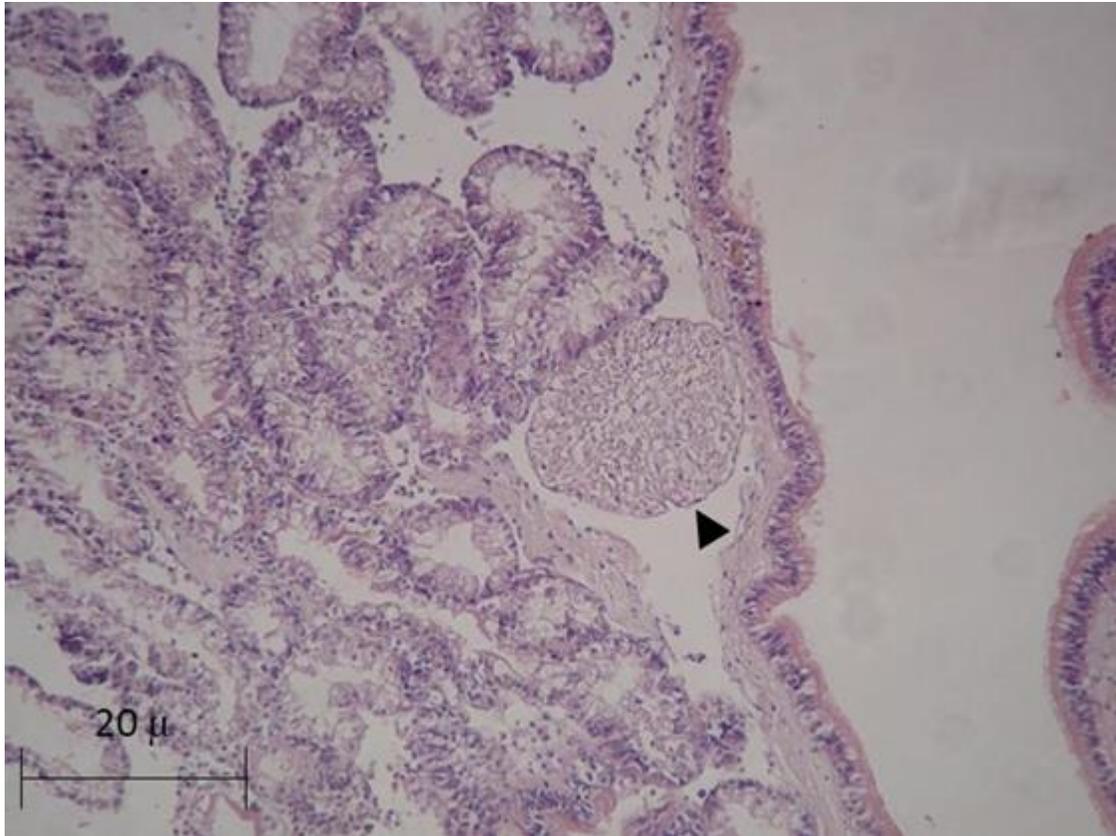
##### a. Glándula digestiva

Se observaron cuatro alteraciones en la glándula digestiva, las cuales fueron: incremento en células cafés, secreciones eosinófilas, atrofias y granulomas. Las células cafés se caracterizan porque en tinciones con H-E, toman una coloración café parda. Además, el tamaño de las células cafés en organismos control fue de 6.92  $\mu\text{m}$  y 13.31  $\mu\text{m}$  en organismos experimentales. Por otro lado, las secreciones eosinófilas se distinguen por presentar una coloración rosada. En el caso de las atrofias, estas se observan por presentar una disminución del número y tamaño de los tejidos que componen un órgano. Finalmente, los granulomas se observaron

cómo capsulas o vacuolas las cuales se caracterizan por presentar infiltración hemocítica (Figura 10 y 11).



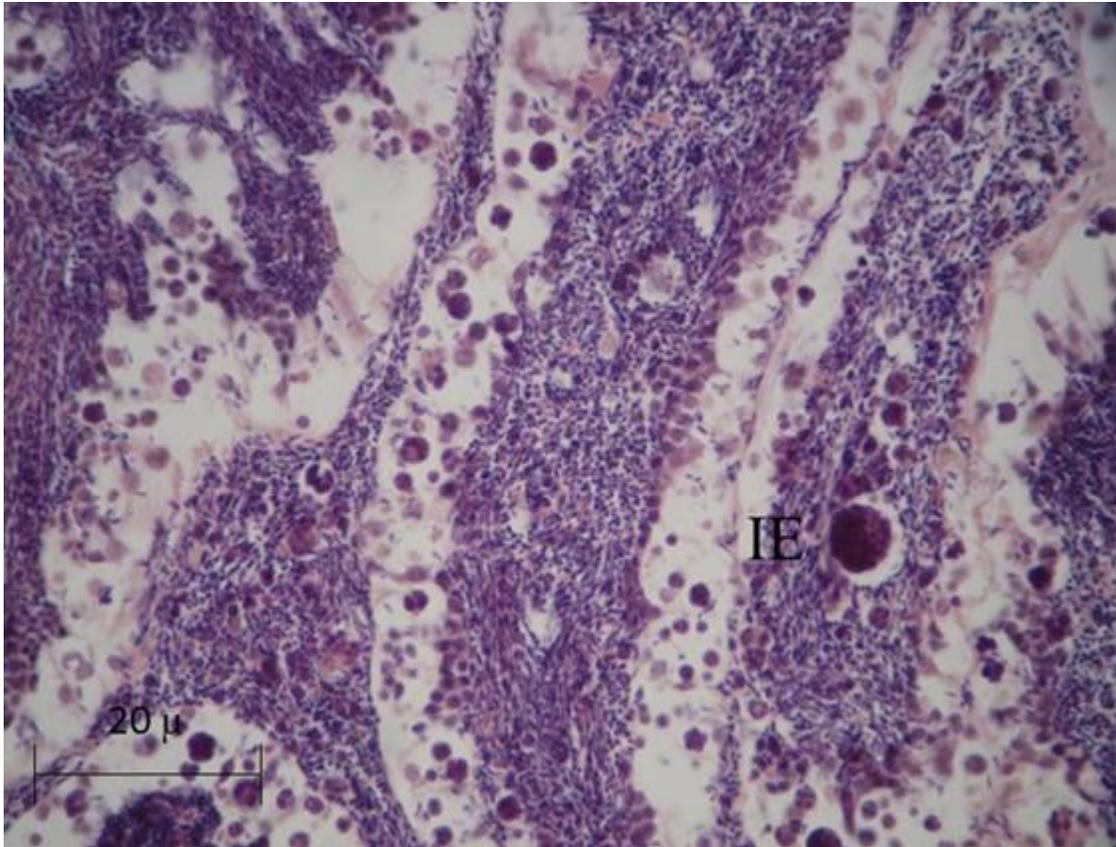
**Figura 10. Microfotografía de glándula digestiva, en la cual, se observa incremento de tamaño de células cafés (CC), atrofia en tejido conectivo (ATR) y secreciones eosinófilas (SE). 40x. 400μm<sup>2</sup> (área de fotografía). Tinción H-E.**



**Figura 11. Microfotografía de glándula digestiva, en la cual, se observa la presencia de un granuloma (cabeza de flecha). 40x.  $400 \mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.**

#### **b. Gónada**

En la gónada se observó una alteración, la cual consistió en incremento del tamaño de las inclusiones esféricas, esto sólo se presentó en gónada masculina. Estas estructuras se caracterizan por presentar en su interior una serie de gránulos proteicos o inclusiones lipídicas, los cuales fueron observados dentro de los folículos germinales o ácinos. Además, el tamaño de las inclusiones esféricas en organismos control fue de  $5.58 \mu\text{m}$  y  $7.76 \mu\text{m}$  en organismos experimentales (Figura 12).



**Figura 12. Microfotografía de gónada en la cual se observa el incremento de tamaño de las inclusiones esféricas (IE) dentro de los folículos germinales. 40x. 400  $\mu\text{m}^2$  (área de fotografía). Tinción H-E.**

#### **Asignación de valores de FI e IR**

Las respuestas tisulares observadas en glándula digestiva y gónada se categorizaron con un factor de importancia (FI) de 2. En la tabla 3 se muestra el listado de las respuestas encontradas en glándula digestiva y de las observadas en gónada.

**Tabla 3. Listado de lesiones histopatológicas por órgano inducidas por exposición subletal (300 µg/L) a cadmio.**

<b>Órgano</b>	<b>Respuesta tisular</b>	<b>Factor de importancia (FI)</b>
<b>Glándula digestiva</b>	Incremento en tamaño y número de células café	2
	Atrofia en tejido conectivo	2
	Secreciones eosinófilas	2
	Granulomas	2
<b>Gónada</b>	Incremento en tamaño de inclusiones esféricas	2

Aunque en todos los casos las respuestas tisulares fueron calificadas con un factor de importancia tipo 2 (moderada importancia), estas respuestas asociadas difirieron en la intensidad de reacción, es decir, en la diseminación de la respuesta. Esta intensidad de reacción generó valores de ocurrencia mínima, moderada y en casos aislados de severa ocurrencia. Cabe aclarar que algunas respuestas tisulares como son las células cafés y las inclusiones esféricas forman parte de las respuestas tisulares del metabolismo o forman parte de la respuesta tisular de las almejas en condiciones naturales de desarrollo por lo que a estas respuestas se les asigno un factor de importancia (FI) de tipo 1 (mínima importancia).

Aunque el factor de importancia (FI) fue asignado a las células cafés en organismos no expuestos a cadmio, la intensidad de reacción (IR) fue diferente en almejas control en dispositivos con y sin sedimento, sugiriendo que el sedimento tiene influencia en la inducción de respuestas tisulares. El factor de importancia (FI) y la intensidad de reacción (IR) en organismos no expuestos a cadmio y en las condiciones con sedimento, resultaron ser de mínima importancia y de moderada ocurrencia respectivamente (FI = 1 e IR = 4), mientras que en los organismos no

expuestos a cadmio y en la condición sin sedimento, dichos parámetros fueron de mínima importancia y de mínima ocurrencia (FI = 1 e IR = 2).

Con respecto a las almejas expuestas a cadmio en las condiciones con y sin sedimento el factor de importancia (FI) fue de tipo 2 moderada (FI = 2). Aunque la intensidad de reacción fue diferente de acuerdo al número de respuestas tisulares observadas, esta tuvo valores de 1 a 6 en almejas expuestas sin sedimento, en tanto que en los dispositivos con sedimento la IR estimada fue de 2 a 6, dato que sugiere la influencia del sedimento para la captación de iones de cadmio en la almeja.

La IR fue diferente en la glándula digestiva y la gónada. Los valores de IR para la glándula digestiva y la gónada fueron de 1 a 6 en dispositivos sin sedimento en tanto que, se obtuvieron valores de IR entre 2 y 6 para la glándula digestiva y entre 5 y 6 para la gónada. Los valores de IR apuntan mayor sensibilidad de la gónada con respecto a la glándula digestiva.

### **Índice histopatológico**

#### **a. Glándula digestiva**

El índice histopatológico (*Ih*) obtenido para la glándula digestiva en organismos no expuestos a cadmio fue de 0.1 no encontrando diferencias significativas entre los lotes con sedimento y sin sedimento ( $P= 0.645014$ ,  $\alpha= 0.05$ ,  $U= 28$ , anexo 4). Al comparar los *Ih* de los lotes control vs lotes experimentales (*Ih*= 0.1 vs 0.4) se observaron diferencias significativas ( $P= 0.0001$ ,  $\alpha=0.05$   $t=-5.2827$ , anexo 5), cabe aclarar que las diferencias significativas del *Ih* sólo se registró en los organismos expuestos a cadmio con sedimento. En la tabla 4 se puede observar las respuestas tisulares analizadas, el factor de importancia y la intensidad de reacción con los

cuales, el índice histopatológico tuvo valores entre 0.1 y 0.4 evidenciando lesiones significativas en relación a los lotes experimentales.

**Tabla 4. Matriz histopatológica de glándula digestiva de organismos controles y experimentales con y sin sedimento con respuestas biológicas analizadas e índice histopatológico obtenido.**

	Preparaciones histológicas analizadas	Respuesta biológica	Factor de Importancia (FI)	Intensidad de Reacción (IR)	Índice ( $I_h$ )
<b>Control con sedimento</b>	8	Células cafés	1	1-4	0.1
<b>Control sin sedimento</b>	8	Células cafés	1	1-2	0.1
<b>Experimental con sedimento</b>	32	Incremento en células cafés	2	2-6	0.4
		Secreciones eosinófilas	2		
		Atrofia en túbulos	2		
<b>Experimental sin sedimento</b>	32	Incremento en células cafés	2	1-6	0.4
		Secreciones eosinófilas	2		
		Atrofia en túbulos	2		
		Granuloma	2		

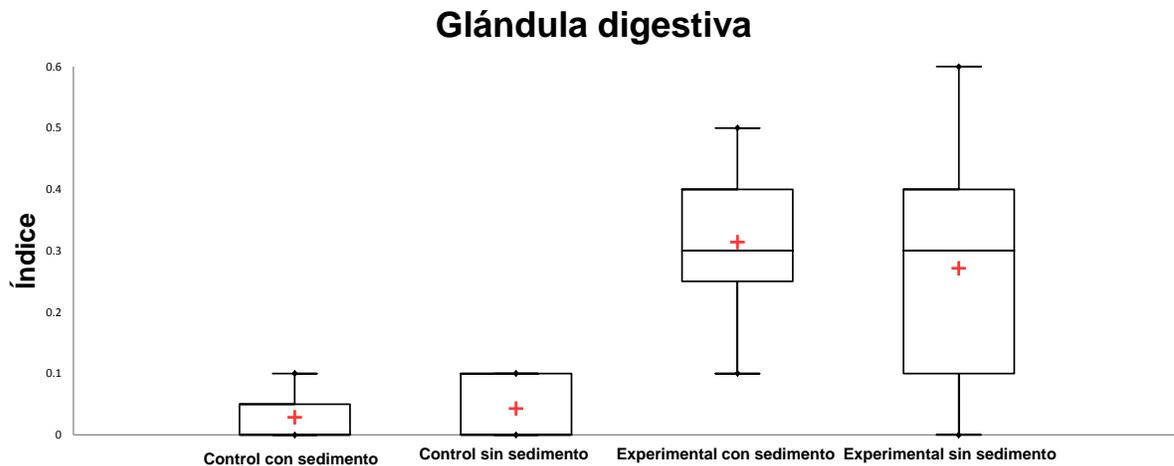
Los datos estadísticos de las diversas comparaciones se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Comparación estadística de índices histopatológicos en glándula digestiva.**

Análisis	Estadístico ( $\alpha=0.05$ )	Diferencia
Control con sedimento vs control sin sedimento	U=28, P= 0.645014	No
Control con sedimento vs experimental con sedimento	t=-5.2827, P=0.0001	Si
Control sin sedimento vs experimental sin sedimento	U= 39, P= 0.061057	No
Experimental con sedimento vs experimental sin sedimento	t= 0.4376, P= 0.669452	No

El índice histopatológico ( $I_h$ ) del análisis para glándula digestiva se muestran en la figura 13, en la cual se observa que el índice histopatológico fue de 0.1 (daño bajo)

para organismos no expuestos a cadmio, y de 0.4 (daño moderado) en organismos expuestos a cadmio.



**Figura 13. Comparación de índices histopatológicos en glándula digestiva. Se observa aumento de daño en organismos experimentales.**

#### b. Gónada

El índice histopatológico (*Ih*) obtenido en organismos no expuestos a cadmio, en la condición con y sin sedimento, fue de 0.2 y de 0.3, respectivamente, valores que no presentan diferencias significativas ( $P= 0.845489$ ,  $\alpha= 0.05$ ,  $t= -0.2000$ , anexo 6). Por otro lado, el valor del índice histopatológico (*Ih*) en organismos expuestos a cadmio en la condición con y sin sedimento, fue de 0.6, y de 0.3, respectivamente, encontrando diferencias significativas ( $P= 0.042413$ ,  $\alpha=0.05$ ,  $t=-2.3250$ , anexo 7). En el caso de la gónada el valor *Ih* fue de 0.3 para el control y el experimental sin sedimento por lo que la diferencia significativa corresponde a la gónada de organismos experimentales expuestos a cadmio con sedimento.

Se puede observar que el valor de índice histopatológico (*Ih*) es mayor en aquellos organismos expuestos a cadmio con sedimento, que en los dispositivos sin sedimento. La información anterior se resume en la tabla 6.

**Tabla 6. Matriz histopatológica de gónada de organismos controles y experimentales con y sin sedimento con respuestas biológicas analizadas e índice histopatológico obtenido.**

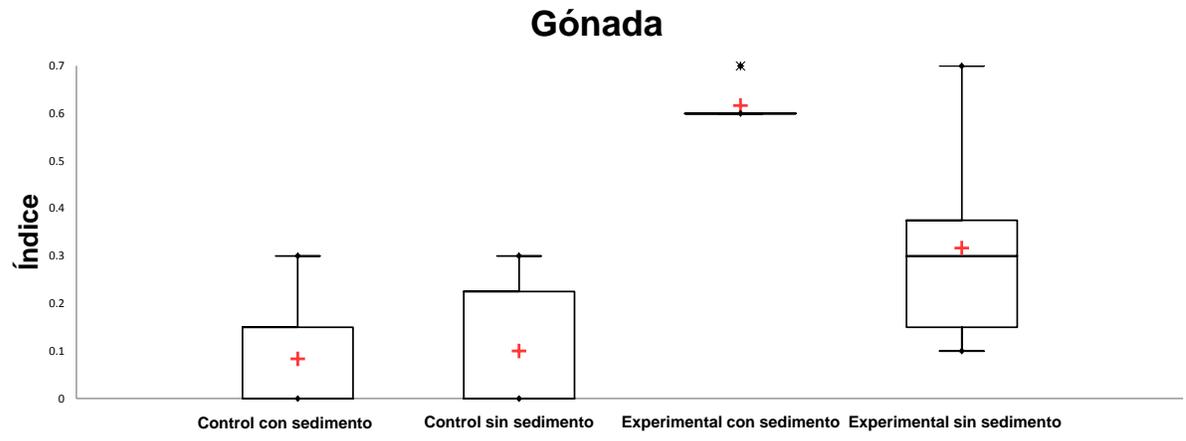
	Preparaciones histológicas analizadas	Respuesta biológica	Factor de Importancia (FI)	Intensidad de Reacción (IR)	Índice ( $I_h$ )
<b>Control con sedimento</b>	8	Inclusiones esféricas	1	4-5	0.2
<b>Control sin sedimento</b>	8	Inclusiones esféricas	1	4-5	0.3
<b>Experimental con sedimento</b>	32	Incremento de inclusiones esféricas	2	5-6	0.6
<b>Experimental sin sedimento</b>	32	Incremento de inclusiones esféricas	2	1-6	0.3

Los datos estadísticos de las diversas comparaciones se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7. Comparación estadística de índices histopatológicos en gónada.**

Análisis	Estadístico ( $\alpha=0.05$ )	Diferencia
Control con sedimento vs control sin sedimento	$t=-0.2000$ , $P= 0.845489$	No
Control con sedimento vs experimental con sedimento	$t=-2.3250$ , $P=0.042413$	Si
Control sin sedimento vs experimental sin sedimento	$t=-1.9554$ , $P= 0.079039$	No
Experimental con sedimento vs experimental sin sedimento	$t= 0.6215$ , $P= 0.548174$	No

El índice histopatológico ( $I_h$ ) del análisis para gónada se muestra en la figura 14, en la cual se observa que el índice histopatológico fue de 0.3 (daño bajo) para organismos no expuestos y expuestos a cadmio (en la condición sin sedimento) y de 0.6 (daño moderado) en organismos expuestos a cadmio.



**Figura 14. Comparación de índices histopatológicos en gónada. Se observa aumento de daño en organismos experimentales con sedimento.**

La comparación entre órganos evidenció que entre el valor obtenido de la glándula digestiva ( $Ih = 0.4$ ) y el de la gónada ( $Ih = 0.45$ ) no hay diferencias significativas ( $P=0.573549$ ,  $\alpha=0.05$ ,  $U= 366$ , anexo 8) por lo tanto, presentaron lesiones con el mismo factor de impacto y con una intensidad de reacción similar.

Los índices histopatológicos ( $Ih$ ) en organismos expuestos a cadmio tuvieron valores entre 0.4 y 0.6, de estos valores el 44 % de los organismos se encontraron en el rango de “daño bajo” y el 56 % se localizaron en “daño medio”, no se presentaron organismos con “daño severo”. Estos datos se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Porcentaje de organismos expuestos a cadmio asociados a un índice histopatológico.**

Rango de índices histopatológicos ( $Ih$ )	No. de organismos	Porcentaje (%)
0 – 0.39	7	44
0.40 – 0.69	9	56
0.70 – 1.0	0	0

Valores de referencia tomados de Cuevas *et al.*, 2015

Al comparar el promedio de los índices histopatológicos ( $Ih$ ) de la glándula digestiva y la gónada (0.4 y 0.45, respectivamente) con el rango propuesto por Cuevas *et al.*, 2015, se pudo observar que ambos índices histopatológicos se encuentran en el rango de daño medio.

Finalmente, al comparar los índices histopatológicos ( $Ih$ ) de los lotes de organismos expuestos a cadmio (en las condiciones con y sin sedimento), no se encontraron diferencias significativas ( $P= 0.669452$ ,  $\alpha= 0.05$ ,  $t= 0.4376$ , anexo 9).

El uso de los diferentes índices en este trabajo permite evidenciar rangos de lesión que pueden indicar un rango de daño o efectos a nivel tisular, y a pesar que en algunos casos como en la gónada se encontraron valores más altos en la intensidad

de reacción la frecuencia y el factor de impacto de las lesiones permiten coincidir con el índice histopatológico y las observaciones realizadas en este trabajo.

## Discusión

Los parámetros morfométricos registrados coincidieron con la morfometría promedio reportada para organismos adultos por García-Cubas & Reguero, (2007) dentro de las claves de determinación taxonómica para la almeja *Polymesoda caroliniana*.

Los bioensayos permiten el control de variables para elucidar el efecto de los contaminantes, se han propuesto las almejas como organismos bioindicadores por sus hábitos alimenticios (Páez-Osuna y Osuna-Martínez, 2011). En este trabajo las concentraciones subletales permitieron evidenciar las respuestas biológicas inducidas por el cadmio y paralelamente el efecto del sedimento en los hábitos alimenticios y posiblemente en la incorporación de tóxicos para la almeja (Cruz *et al.*, 2013).

Los sedimentos ribereños, uno de los principales reservorios de estos elementos, actúan como fuentes secundarias de contaminación de los cuerpos de agua, por lo que resulta importante evaluar la concentración de metales en dichos sedimentos como una herramienta que permite rastrear el origen de los contaminantes en el medio y predecir los impactos que pueden producir en los ecosistemas acuáticos (Herrera *et al.*, 2013). Los sedimentos en el área de influencia de diversas zonas costeras, están siendo afectados por la incorporación de elementos contaminantes, principalmente de origen antropogénico, es decir a causa de grandes depósitos de basura en las zonas costeras y por el aporte de aguas residuales tanto de origen doméstico como de índole industrial, los cuales, al no ser tratados adecuadamente aportan contaminantes los cuales se depositan en los sedimentos de los manglares, los cuales a su vez los vierten por efecto de las mareas al agua, exponiendo a sus efectos a toda la cadena trófica del ecosistema (Cruz *et al.*, 2013). La distribución y

concentración de diversos metales, está influenciada por las actividades antrópicas desarrolladas en las zonas costeras, y particularmente en los sectores en donde se ubican puertos de embarque, revisten un riesgo para las comunidades de organismos bentónicos (Calderón y Valdés, 2012).

El análisis tisular de las secciones analizadas (160) es representativo para estimar el índice histopatológico (*Ih*) (Cuevas *et al.*, 2015). El *Ih* se ha utilizado para establecer nivel de contaminación, por lo que los diferentes factores calculados derivados del análisis tisular, en este trabajo, pueden ser utilizados con otros factores para definir el nivel de impacto de la zona de colecta (Hernández-Díaz, 2018).

La histopatología se ha convertido en una herramienta importante en la toxicología acuática, habiéndose implementado en muchos programas de biomonitorio en todo el mundo, ya que pueden proporcionar información directa sobre el estado de salud de los organismos (Adams & Sonne, 2013; Bignell *et al.*, 2008; Romero-Ramírez *et al.*, 2018). El análisis histopatológico permitió realizar la descripción morfológica, la evaluación de respuestas tisulares y un análisis semicuantitativo de dos órganos (glándula digestiva y la gónada) generando una información importante de la relación que guarda la almeja *P. caroliniana* respecto a su forma de vida (relación con el sedimento) y lesiones o respuestas biológicas que pueden inducirse por la presencia de iones metálicos como el cadmio, por lo que estas evidencias pueden implementarse en los programas de biomonitorio.

La descripción tisular de cada uno de los órganos observados correspondió a los descritos por trabajos anteriores para moluscos bivalvos (Guzmán-García, 2007; Jerónimo-Juárez *et al.*, 2013; Cáceres Martínez y Yeomans Vásquez, 2014). La descripción de los órganos destino (glándula digestiva y gónada) permiten comparar

la estructura previo al impacto de agentes contaminantes como el cadmio. En el caso de la glándula digestiva, la presencia y el incremento de las células cafés así como la atrofia en tejido conectivo fueron respuestas tisulares primarias que facilitaron el cálculo del *Ih*. En el caso de la gónada, el incremento en tamaño de las inclusiones esféricas constituye una respuesta primaria, si bien en ambos órganos posteriormente se evidenciaron lesiones de mayor trascendencia para el bienestar de los organismos.

Algunas de las respuestas tisulares de tipo primario, se asocian con mecanismos de defensa como las células cafés y las inclusiones esféricas (Luna-González, 2003). Las lesiones pueden ser reversibles e irreversibles, las respuestas de tipo irreversibles amenazan la vida de los animales, con lo cual, se ven enfrentados a diversos desafíos en términos de salud (Cifuentes-Lemus *et al.*, 2016). En este trabajo, las respuestas tisulares que se observaron fueron de tipo reversible por lo que, si los factores de estrés ambiental desaparecen, estas lesiones pueden no progresar beneficiando el estado de salud de los organismos.

La glándula digestiva de los bivalvos es el principal órgano de regulación metabólica, mecanismos de defensa inmune y regulación homeostática, junto con procesos de desintoxicación de compuestos xenobióticos (Moore y Allen, 2002), por lo que se considera como principal órgano blanco en estudios toxicológicos (Bignell *et al.*, 2008; Marigómez *et al.*, 2013). La descripción tisular de la glándula digestiva se compone de tejido epitelial y tejido conectivo. El tejido epitelial que se observó en esta almeja presento células de tipo columnar, estas células son importantes ya que, están encargadas de la absorción, además estas células pueden presentar microvellosidades o cilios para generar movimiento (Lowe y Anderson, 2015). En

consecuencia, la pérdida de las microvellosidades afecta el bienestar de los animales. Otro tipo de tejido importante es el conectivo, en la glándula digestiva es de tipo laxo, también denominado tejido conjuntivo areolar, este tejido se ha reportado como un tejido que proporciona protección, suspensión y sostén al tejido (Welsch, 2014).

La glándula digestiva presentó numerosos túbulos digestivos globulares y elongados, cada uno de estos túbulos presentó cilios hacia la luz, estos tienen la función de generar movimiento del alimento hacia la región no ciliada. La membrana basal fina de los túbulos, es importante ya que, actúa como un filtro fisiológico y su pérdida implica irregularidades funcionales (Karp, 2009). Los túbulos de la glándula digestiva forman parte de una de las principales vías de incorporación de tóxicos, por lo que, se considera que la activación de células cafés podría ser un mecanismo primario de defensa en estos órganos (Guzmán-García, 2007). La acción de las células cafés, constituye un importante mecanismo de protección ante la presencia de cadmio. Estas células cafés contienen vesículas cargadas con la enzima glutatión reductasa, lo cual, ha indicado su origen lisosomal y se ha demostrado que, las de menor tamaño son más activas en la acumulación de metales que las de mayor tamaño. Las células pequeñas contienen vesículas con lisosomas llamados jóvenes y las células cafés más grandes presentan vesículas llamadas viejas, menos activas o cuerpos residuales (Saravanan y Durairaj, 2013). El incremento en el número y tamaño de las células cafés fue considerado en este trabajo por su importancia en la fisiología de estos bivalvos.

Otra respuesta observada fue la presencia de secreciones eosinófilas, este tipo de secreción consiste en la segregación de productos químicos que tienen afinidad a la

eosina; estas respuestas se han considerado como medidas de protección ante algún agente estresor (Sanders *et al.*, 1990). La atrofia en la glándula digestiva se ha reportado como la disminución o ausencia de las células que conforman el tejido. La diferencia en el radio de los túbulos de la glándula digestiva y la presencia o ausencia de epitelios de recubrimiento constituye un daño en el órgano. Winstead (1998), reportó atrofia en los túbulos de la glándula digestiva y la pérdida de sus epitelios como indicador de estrés.

La alteración histopatológica de la glándula digestiva inducida con cadmio en el túbulo digestivo se muestra como un paso clave en la necrosis celular inicial (Da Ros *et al.*, 1995). La atrofia, los granulomas y la necrosis celular constituyen alteraciones con mayor impacto para la salud de los organismos. Los granulomas son lesiones nodulares inflamatorias, de pequeño tamaño que aparecen cuando el sistema inmune, aísla elementos nocivos como bacterias, virus, hongos y sustancias tóxicas, formando cápsulas de tejido conectivo con infiltración de hemocitos (Cáceres Martínez y Yeomans Vásquez, 2014). Tisularmente la presencia de los granulomas representa una lesión que causa daño pero que, posiblemente no es determinante en la sobrevivencia de los organismos del presente estudio ya que, fueron daños focales. Diferentes lesiones dependen de la capacidad fisiológica del organismo y del factor de estrés, de esta manera, se puede generar un daño local o sistémico, en cuanto existe este tipo de lesiones a nivel sistémico, la vida del organismo puede verse comprometida (Takashima y Hibiya, 1995).

Algunas respuestas histológicas se han reportado que están inducidas por el estrés ambiental, entre las cuales se encuentran: la abundancia de células café, las secreciones eosinófilas, la atrofia en tejido conectivo y los granulomas. Algunas de

estas lesiones ya fueron reportadas en otros moluscos bivalvos como el ostión *Crassostrea virginica* (Guzmán-García, 2007).

La gónada es un órgano diana que interviene en la producción de hormonas, el desarrollo de gametos y el progreso de las generaciones venideras (Blazer, 2002; Fernández-Reiriz, *et al.*, 2007). Esta especie presenta sexos separados, es decir, son dioicos, sin embargo no hay dimorfismo sexual por lo que la técnica tisular permite determinar sus estructuras básicas con respecto al sexo de los organismos (García-Cubas y Reguero, 2007). La gónada femenina está compuesta por folículos germinales o ácidos que dan lugar a las células germinales (oogonios), estas células son de mayor tamaño con respecto a las células germinales masculinas, sin embargo, los folículos germinales de la gónada femenina generan una menor producción de células. La gónada masculina, de igual manera, presenta folículos germinales o ácidos que dan lugar a los espermatozoides, estas células comparadas con los oogonios, son de menor tamaño pero los ácidos generan una mayor producción de células (Sar *et al.*, 2018).

El análisis del desarrollo de las gónadas también desempeña un papel esencial en la evaluación ambiental y fisiológica de las poblaciones de bivalvos, siendo datos esenciales para diversos programas de evaluación ambiental como *Mussel Watch* (Hillman, 1993). Sin embargo, las alteraciones histopatológicas por exposición a contaminantes deben describirse cuidadosamente, ya que podría tratarse de una etapa de reabsorción natural de este órgano, es decir, los gametos han sido liberados en su totalidad, los folículos germinales se observan casi vacíos y/o en reabsorción con restos de tejido conjuntivo (Brenner, *et al.*, 2014; Carballal *et al.*, 1998; Garmendia *et al.*, 2010; Angel-Pérez *et al.*, 2007).

En la gónada se evidenció la presencia de inclusiones esféricas. Se presume que estas inclusiones esféricas, puedan ser gránulos proteicos o inclusiones lipídicas, que son propias de un bivalvo, las cuales tienen la misma función que las células cafés (Bardales-Azañero, 2011).

El análisis tisular ha utilizado escalas para evidenciar el impacto de las lesiones sobre la salud de los organismos (Bernet *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2015). Las respuestas tisulares observadas en los organismos control, fueron de factor de importancia tipo 1 (mínima importancia) y son reversibles, es decir, en condiciones favorables, los tejidos de los órganos regresan a su estado basal. Las lesiones observadas en ambos órganos analizados de organismos experimentales, fueron de tipo 2. Este tipo de lesión es de importancia patológica moderada, es decir, reversible en la mayoría de los casos, si el factor estresante se neutraliza (Cuevas *et al.*, 2015).

Para establecer el diagnóstico de salud se ha propuesto el cálculo del índice histopatológico considerando el factor de importancia pero también la intensidad de reacción (Costa *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2015). Establecer la intensidad de reacción requiere criterios claros que no siempre son reportados. Este trabajo determino el índice de reacción considerando el área afectada en el análisis tisular considerando que es apropiada y objetiva la unidad de medida misma que, puede ser sustituida mediante equipo especializado y programas apropiados que permitan facilitar esta labor.

Los índices histopatológicos obtenidos de los dos órganos analizados de los organismos experimentales sugieren que las alteraciones observadas fueron inducidas por la exposición a cadmio durante el bioensayo.

Por otro lado, los valores de referencia de los índices histopatológicos ( $I_h$ ) cercanos a cero, indican que los órganos presentan menor daño, y los índices histopatológicos ( $I_h$ ) cercanos o iguales a 1 presentan un daño mayor (Cuevas *et al.*, 2015).

De acuerdo con todos los  $I_h$  calculados, los organismos presentaron un daño medio, esto se debe de atender con base en los niveles de contaminación de las zonas costeras ya que, se consideran uno de los ambientes más vulnerables al efecto de los contaminantes (Botello *et al.*, 2010). Además, los  $I_h$  calculados por organismos a través del bioensayo evidenció lesiones con un nivel de impacto más alto que lesiones observadas en organismos silvestres, lo cual constituye un antecedente que puede servir de referencia para el monitoreo ambiental (Barrera-Escorcía y Ramírez-Romero, 2015).

Al promediar los índices histopatológicos de los órganos analizados se obtuvieron valores los cuales se categorizaron en el rango de daño medio, lo cual sugiere que el tiempo de exposición afecta de manera análoga.

Calcular el índice histopatológico permitió la integración de todas las alteraciones, esto facilita la interpretación de la condición fisiológica de la almeja *P. caroliniana*. El desarrollo de herramientas histopatológicas cuantitativas es potencialmente expedito y altamente informativo para el monitoreo de los efectos biológicos inducidos por el estrés ambiental, ya que al estandarizar las alteraciones se pueden identificar con mayor rapidez las respuestas de los organismos de la o las áreas de muestreo (Cuevas *et al.*, 2015).

Los biomarcadores histopatológicos se consideran muy valiosos, ya que pueden proporcionar información directa sobre el estado de salud de los organismos (Feist *et al.*, 2004; Bignell *et al.*, 2008; Adams y Sonne, 2013). Los avances en los enfoques

semicuantitativos (o incluso totalmente cuantitativos, en algunos casos), han dotado a la histopatología de un poder estadístico importante que es crítico en el biomonitoreo (Marigómez *et al.*, 2013). Los índices histopatológicos que integran diferentes alteraciones histopatológicas de un órgano diana en un único valor ya han sido desarrollados en diferentes especies de peces (Bernet *et al.*, 1999; Van Dyk *et al.*, 2007) y en menor medida, en invertebrados, como las almejas (Costa *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2015). Sin embargo, los estudios histopatológicos pueden verse afectados por varios factores que exigen un conocimiento profundo de las características biológicas específicas de los organismos centinela, como su forma de alimentación, historia de vida, época de reproducción, estructura poblacional, entre otros (Bignell *et al.*, 2008; Páez-Osuna *et al.*, 2011). De hecho, se considera como un inconveniente importante en las evaluaciones histopatológicas de los invertebrados, ya que están muy lejos de beneficiarse del nivel de conocimiento histológico como sus homólogos vertebrados (Au, 2004).

Uno de los principales inconvenientes de los estudios de biomonitoreo de la contaminación ambiental es la presencia de posibles factores de confusión que pueden conducir a una mala interpretación de los hallazgos toxicológicos *in situ* (Garmendia *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013). Sin embargo, al realizar estudios en dispositivos artificiales se tienen más ventajas, por ejemplo, se usan en áreas donde un mismo bioindicador no se distribuye, pueden acumular metales en concentraciones ambientalmente relevantes, la captura y liberación del contaminante parece estar menos afectada por la salinidad y temperatura, las concentraciones no son afectadas por factores propios de los organismos (edad, sexo, entre otros)

(Páez-Osuna *et al.*, 2011), por lo tanto, al analizar organismos provenientes de bioensayos de exposición a contaminantes, nos proporcionan resultados confiables.

## Conclusiones

- Los organismos presentaron parámetros morfométricos homogéneos, que corresponden a organismos en etapa adulta. La composición de la glándula digestiva y la gónada permitió observar series de túbulos revestidos de epitelio así como células especializadas de la gónada masculina y femenina.
- Las respuestas tisulares observadas, con respecto al tiempo de exposición al cadmio incluyeron células cafés, inclusiones esféricas, atrofiadas y granulomas. El factor de impacto para estas respuestas de importancia moderada fue de tipo 2, lo cual indica que pueden ser reversibles.
- Las respuestas biológicas permitieron estimar el índice histopatológico ( $I_h$ ) entre organismos experimentales y testigos. Los órganos de los animales expuestos a cadmio con y sin sedimento, presentaron índices histopatológicos ( $I_h$ ) muy similares, sin embargo hubo diferencias significativas en los organismos con sedimento por lo que, inferimos que el sedimento tiene una influencia para la captación de iones de cadmio en los bivalvos.
- El cálculo del índice histopatológico ( $I_h$ ) permitió la integración de todas las alteraciones con el fin de facilitar la interpretación de la condición fisiológica de la almeja *P. caroliniana* haciendo evidente que la concentración de cadmio a la que los organismos fueron expuestos causa efectos moderados por ser éstos reversibles.
- El análisis semicuantitativo debe aplicarse a organismos en estudios histopatológicos para estandarizar las respuestas tisulares observadas, lo que permitirá evaluar los efectos biológicos inducidos por estrés ambiental.

- Este trabajo permitió evaluar las respuestas celulares y tisulares derivadas de la exposición a concentraciones subletales de cadmio, así como estimar el índice histopatológico en la almeja *P. caroliniana* por lo que constituye el primer reporte de la aplicación de un protocolo para estimar el efecto de la contaminación.

## Bibliografía

- Adams, D. H. y Sonne, C. (2013) "Mercury and histopathology of the vulnerable goliath grouper, *Epinephelus itajara*, in U.S. waters: A multi-tissue approach", *Environmental Research*, 126, pp. 254–263. doi: 10.1016/j.envres.2013.05.010.
- Angel-Pérez, C., Serrano-Guzmán, S. J. y Ahumada-Sempoal, M. A. (2007) "Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea : Pinnidae) en un sistema lagunar costero , al sur del Pacífico tropical mexicano", *Revista de Biología Tropical*, 55(3–4), pp. 839–852.
- Argüelles-Collada, J. M., Del Brío-León, M. Á. y Cernuda-Cernuda, R. (2002) "Atlas Interactivo de Histología". Disponible en: <https://www.unioviado.es/morfologia/Atlas/es/download.htm> (Consultado: el 25 de febrero de 2017).
- Au, D. W. T. (2004) "The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review", *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10), pp. 817–834. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.032.
- Bardales Azañero, J. R. (2011) "Isoformas de la proteína quinasa dependiente de AMPc en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*: purificación, caracterización funcional y distribución tisular". Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/36577> (Consultado: el 3 de diciembre de 2017).
- Barrera-Escorcia, G. y Ramírez-Romero, P. (2015) "Contaminación Acuática". Primera. Ciudad de México. Disponible en: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/conacua.pdf> (Consultado: el 25 de enero de 2019).
- Bermúdez, M. (2010) "Contaminación y turismo sostenible". Disponible en: <http://galeon.com/mauriciobermudez/contaminacion.pdf> (Consultado: el 3 de marzo de 2017).
- Bernet, D., Schmidt, H. y Meier, W. (1999) "Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution", *Journal of Fish Diseases*, 22(1), pp. 25–34. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bignell, J. P., Dodge, M. J. y Feist, S. W. (2008) "Mussel histopathology: effects of season,

- disease and species", *Aquatic Biology*, 2(1), pp. 1–15. doi: 10.3354/ab00031.
- Blazer, V. S. (2002) "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes", *Fish Physiology and Biochemistry*. Kluwer Academic Publishers, 26(1), pp. 85–101. doi: 10.1023/A:1023332216713.
- Botello, A. V., Villanueva Fragoso, S. y Gutiérrez, J. (2010) "Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático" - *SIBE*. Editado por I. de C. del M. y L.: U. A. de C. Villahermosa, Tabasco, México: Gobierno del Estado de Tabasco, Secretaría de Gobierno: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Universidad Nacional Autónoma de México. Villahermosa, Tabasco, México.
- Botté, S. E., Freije, R. H. y Marcovecchio, J. E. (2010) "Distribution of Several Heavy Metals in Tidal Flats Sediments within Bahía Blanca Estuary (Argentina)", *Water, Air, & Soil Pollution*. Springer Netherlands, 210(1–4), pp. 371–388. doi: 10.1007/s11270-009-0260-0.
- Brenner, M., Broeg, K. y Frickenhaus, S. (2014) "Multi-biomarker approach using the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) to assess the quality of marine environments: Season and habitat-related impacts", *Marine Environmental Research*, 95, pp. 13–27. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.12.009.
- Cáceres Martínez, J. y Yeomans Vásquez, R. (2014) "Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo de moluscos bivalvos". OIRSA-OSPESCA.
- Calderón, C. y Valdés, J. (2012) "Contenido de metales en sedimentos y organismos bentónicos de la bahía San Jorge, Antofagasta, Chile", *Biología Marina y Oceanografía*, 47(1), pp. 121–133. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v47n1/art11.pdf> (Consultado: el 24 de junio de 2018).
- Carballal, M. J., Villalba, A. y Lopez, C. (1998) "Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*", *Journal of invertebrate pathology*, 72(3), pp. 304–12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784355> (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).
- Castillo, G. y Schfer, L. (2000) "Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A chilean experience", *Environmental Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., 15(4), pp.

331–337. doi: 10.1002/1522-7278(2000)15:4<331::AID-TOX9>3.0.CO;2-E.

Cifuentes Lemus, J. L., Torres García, M. del P. y Frías Mondragón, M. (2016) "El océano y sus recursos". SEP. Disponible en: [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/24/htm/sec\\_2.html](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/24/htm/sec_2.html) (Consultado: el 24 de enero de 2019).

CONABIO, C. N. para el C. y U. de la B. (2016) "Naturalista: captura, comparte y conoce", *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Disponible en: <https://www.gob.mx/conabio/articulos/naturalista-captura-comparte-y-conoce?idiom=es> (Consultado: el 20 de febrero de 2017).

Costa, P. M., Carreira, S. y Costa, M. H. (2013) "Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality", *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., 126, pp. 442–454. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.08.013.

Cruz L, N., Alderete C, A. y Laffón L, S. (2013) "Accumulation of heavy metals in sediments of mangrove ecosystem in Laguna de Terminos, Campeche, Mexico", *Foresta Veracruzana*, 15(1), pp. 25–30. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/497/49728291003.pdf> (Consultado: el 24 de junio de 2018).

Cuevas, N., Zorita, I. y Costa, P. M. (2015) "Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: Integration with contamination levels and effects of confounding factors", *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., 162, pp. 152–164. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.03.011.

Datos Abiertos UNAM (2013) "Portal de Datos Abiertos UNAM", *Colecciones Universitarias*. Disponible en: <https://datosabiertos.unam.mx/> (Consultado: el 20 de febrero de 2017).

Da Ros, L., Nasci, C. y Campesan, G. (1995) "Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium in the digestive gland of mussel, *Mytilus sp.*", *Marine Environmental Research*. Elsevier, 39(1–4), pp. 321–324. doi: 10.1016/0141-1136(94)00020-P.

Eisler, R. (1985) "Cadmium Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review", *Dep. of the interior, fish and wildlife Service*. Disponible en: <https://pubs.er.usgs.gov/publication/5200065> (Consultado: el 3 de marzo de 2017).

- Feist, S., Lang, T. y Stentiford, G. (2004) "Biological effects of contaminants: Use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring International Council for the Exploration of the Sea Conseil International pour l'Exploration", *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. Disponible en: [www.ices.dk](http://www.ices.dk) (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).
- Fernández-Reiriz, M. J., Pérez-Camacho, A. y Delgado, M. (2007) "Dynamics of biochemical components, lipid classes and energy values on gonadal development of *R. philippinarum* associated with the temperature and ingestion rate", *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(4), pp. 1053–1059. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.03.018.
- García-Cubas, A. y Reguero, M. (2007) "Catálogo ilustrado de moluscos bivalvos del Golfo de México y Mar Caribe". UNAM, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- Garmendia, L. et al. (2010) "Seasonality in cell and tissue-level biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: relevance for long-term pollution monitoring", *Aquatic Biology*. España, 9(1), pp. 203–219. doi: 10.3354/ab00245.
- Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M. y Venier, P. (2009) "Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro", *Cell and Tissue Research*, 321(1), pp. 131–140. doi: 10.1007/s00441-005-1093-9.
- Guzmán-García, X. (2007) "Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- Guzmán-García, X., Matadamas-Guzmán, M. y Muñoz-González, F. (2018) "INDEX: Salud y contaminación acuática". Disponible en: <https://pipemg.shinyapps.io/bernetindextools/> (Consultado: el 7 de febrero de 2019).
- Guzmán-García, X., Muñoz-González, F. y Matadamas-Guzmán, M. (2012) "Relational base of information: indicators of ecological integrity and environmental health, México". Disponible en: <http://etmira.ecotoxicologia.com/> (Consultado: el 25 de junio de 2017).
- Hernández-Díaz, M. (2018) "Análisis de las alteraciones en células sanguíneas del pez bagre (*Ariopsis felis*) de Tecolutla, Veracruz para establecer un diagnóstico de salud". Universidad Autónoma Metropolitana.
- Herrera, J., Rodríguez, J. y Coto, J. (2013) "Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro", *Tecnología en Marcha*, 26(1), pp. 27–36. doi:

10.18845/tm.v26i1.1119.

- Hillman, R. E. (1993) "Gonadal Index and Histopathology for the East and West Coasts used in the National Status and Trends Mussel Watch Project", *National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)*, II(1), pp. 45–54. Disponible en: [ftp://ftp.library.noaa.gov/noaa\\_documents.lib/NOS/ORCA/TM\\_NOS\\_ORCA/nos\\_orca\\_71v2.pdf#page=61](ftp://ftp.library.noaa.gov/noaa_documents.lib/NOS/ORCA/TM_NOS_ORCA/nos_orca_71v2.pdf#page=61) (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).
- ICdA (2013) "The International Cadmium Association". Disponible en: <http://www.cadmium.org/introduction> (Consultado: el 3 de febrero de 2017).
- Jerónimo-Juárez, J. R., Guzmán-García, X. y Guerrero-Legarreta, I. (2013) "Tissue structure and partial characterization of proteolytic enzymes of three organ of the clam *Polymesoda caroliniana*, from Tecolutla, Veracruz, México.", en *Histology and Histopathology Cellular and Molecular Biology*. Logroño, España, p. 163. Disponible en: [http://www.hh.um.es/pdf/Supplements/Suppl\\_1,2013.pdf](http://www.hh.um.es/pdf/Supplements/Suppl_1,2013.pdf) (Consultado: el 25 de junio de 2017).
- Johnson, L., Stehr, M. y Olson, O. (1993) "Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States", *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society, 27(13), pp. 2759–2771. doi: 10.1021/es00049a015.
- Karp, G. (2009) "Biología Celular y Molecular". 5°. México, D.F.: McGraw-Hill. Disponible en: [https://drive.google.com/file/d/0Bxlvh\\_V9tGoLd25GbWpVRmppRGc/view](https://drive.google.com/file/d/0Bxlvh_V9tGoLd25GbWpVRmppRGc/view).
- Lowe, J. S. y Anderson, P. G. (2015) "Stevens y Lowe: Histología humana". Cuarta edi. Elsevier.
- Luna-González, A. (2003) "Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa de moluscos bivalvos". Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Marigómez, I., Garmendia, L. y Soto, M. (2013) "Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill", *Ecotoxicology (London, England)*. Springer, 22(3), pp. 486–505. doi: 10.1007/s10646-013-1042-4.
- Mille Pagaza, S. R., Parra Alcocer, M. de J. y Pérez Chi, A. (1993) "Guía para la indentificación de invertebrados". Trillas.
- Moore, M. N. y Allen, J. I. (2002) "A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic

hydrocarbons.”, *Marine environmental research*, 54(3–5), pp. 579–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408621> (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).

NOM-059-SEMARNAT (2010) “Norma Oficial Mexicana”. Disponible en: [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM\\_059\\_SEMARNAT\\_2010.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf) (Consultado: el 25 de mayo de 2016).

Páez-Osuna, F. y Osuna-Martínez, C. (2011) “Biomonitores de la contaminación costera con referencia a las costas mexicanas: una revisión sobre los organismos utilizados”, *Hidrobiologica*, 21(3), pp. 229–238. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84869158712&partnerID=40&md5=cb82a4ba1db91439efeb121444c61678>.

PRONAME (2013) “Monitoreo de sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables en la Reserva de la Biosfera Mapimí, Durango, México, en el marco del Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental (PRONAME)”. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/191438/2013\\_Monitoreo\\_de\\_sustancias.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/191438/2013_Monitoreo_de_sustancias.pdf) (Consultado: el 4 de agosto de 2017).

Romero-Ramírez, P., Barrera-Escorcia, G. y Gúzman-García, X. (2018) "Ecotoxicología". Primera. Ciudad de México. Disponible en: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/ecotoxicologia.pdf> (Consultado: el 25 de enero de 2019).

Ruelas-Inzunza, J., Spanopoulos-Zarco, P. y Páez-Osuna, F. (2009) “Cd, Cu, Pb and Zn in clams and sediments from an impacted estuary by the oil industry in the southwestern Gulf of Mexico: Concentrations and bioaccumulation factors”, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. Taylor & Francis Group, 44(14), pp. 1503–1511. doi: 10.1080/10934520903263280.

SAGARPA-CONAPESCA (2013) "Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca", *Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca Gobierno*. Disponible en: <http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca> (Consultado: el 3 de noviembre de 2016).

Sanders, J. G., Abbe, G. R. y Riedel, G. F. (1990) “Silver uptake and subsequent effects on growth and species composition in an estuarine community”, *The Science of the total environment*, 97–98, pp. 761–9. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2084845> (Consultado: el 3 de diciembre de 2017).

Sar, A., Martin, J. P. y Fernandez, R. (2018) "Ciclo reproductivo y reclutamiento del mejillón *Mytilus edulis platensis* en Bahía San Julián (Santa Cruz, Argentina)", *Informes Científicos - Técnicos UNPA*, 10(2), p. 33. doi: 10.22305/ict-unpa.v10i2.269.

Saravanan, K. y Durairaj, K. (2013) "Effect of cadmium on the alterations in the histological organization of the gill of edible estuarine clam *Meretrix casta*", *Global Journal of Traditional Medicinal Systems*. Disponible en: <https://scholar.google.co.in/citations?user=G52LZsAAAAJ&hl=en> (Consultado: el 3 de diciembre de 2017).

SIPESCA (2016) "Sistema de Información de Pesca y Acuicultura (SIPESCA)", *Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca*. Disponible en: <http://www.gob.mx/conapesca/acciones-y-programas/sistema-de-informacion-de-pesca-y-acuicultura-sipesca> (Consultado: el 20 de febrero de 2017).

Sundararajan, M. y Natesan, U. (2010) "Environmental geochemistry of core sediments from Serthalaikkadu creek, East coast of India", *Environmental Earth Sciences*. Springer-Verlag, 62(3), pp. 493–506. doi: 10.1007/s12665-010-0542-2.

Takashima, F. y Hibiya, T. (1995) "An Atlas of Fish Histology". *Normal and Pathological Features.*, Kodansha Ltd. Tokyo, Japan: Wiley-Blackwell. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/iroh.19840690307> (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).

Tarifeño, E. (2004) "Adaptaciones fisiológicas de animales marinos". Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/BioMarina/13.pdf> (Consultado: el 3 de abril de 2017).

Tauseef, O. M., Salman, K. y Naeem, M. (2012) "Histology Slides Database: Contributors". Disponible en: <http://histology-slides-database.blogspot.mx/p/contributors.html> (Consultado: el 20 de febrero de 2017).

Van Dyk, J., Pieterse, G. y Van Vuren, J. (2007) "Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), pp. 432–440. doi: 10.1016/j.ecoenv.2005.10.012.

Welsch, U. (2014) "Sobotta. Histología". 3° ed. Panamericana. Disponible en:

<https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4782/Sobotta-Histologia.html>  
(Consultado: el 21 de mayo de 2019).

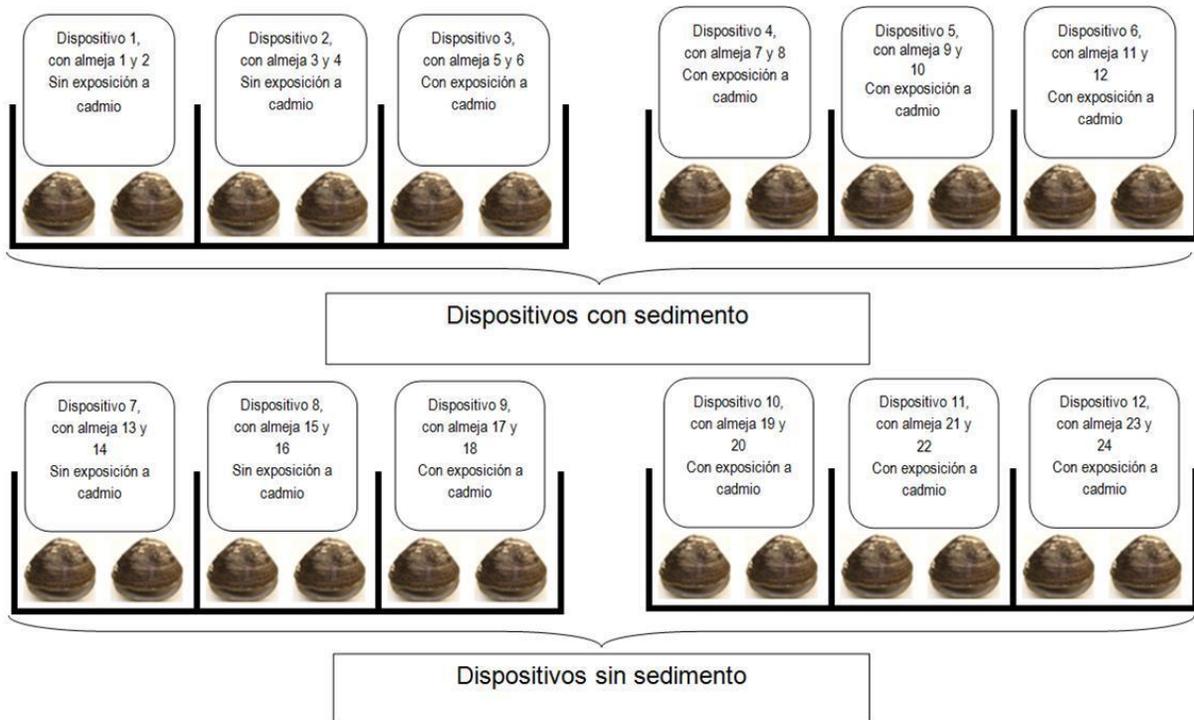
Winstead, J. T. (1998) "A histological study of digestive tubules in intertidal and subtidal oysters, *Crassostrea virginica*, collected at high and low tides", *Journal of Shellfish Research.*, 17(1), p. 275–279. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/287450373\\_A\\_histological\\_study\\_of\\_digestive\\_tubules\\_in\\_intertidal\\_and\\_subtidal\\_oysters\\_Crassostrea\\_virginica\\_collected\\_at\\_high\\_and\\_low\\_tides](https://www.researchgate.net/publication/287450373_A_histological_study_of_digestive_tubules_in_intertidal_and_subtidal_oysters_Crassostrea_virginica_collected_at_high_and_low_tides) (Consultado: el 18 de septiembre de 2018).

## **Anexos**

### **Anexo 1. Aclimatación y montaje de bioensayo.**

Se colectaron de manera manual y aleatoria, 30 almejas *P. caroliniana* en el estero Larios del municipio de Tecolutla, Veracruz. A cada individuo se le tomaron parámetros morfométricos como, longitud, ancho, alto y peso total. Se trasladaron al laboratorio en hieleras de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  de temperatura, para el análisis posterior. Las almejas recolectadas se colocaron en peceras de 40 L con agua salobre (2 ‰), en dos lotes de 15 individuos cada una, procurando que el espacio entre uno y otro fuera el adecuado ( $\approx 5$  cm). Se mantuvieron durante 40 días con aireación y alimento constante (cultivo de microalga *Chlorella sp.* a una concentración de 909,935 cel/mL). Diariamente se registraron parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura tomada con termómetro de vidrio de mercurio de 10-100°C, pH tomado con tiras reactivas marca CIVEQ®, salinidad tomada con refractómetro marca ATAGO® modelo S-28) y la mortalidad de individuos.

Para llevar a cabo el bioensayo, se colocaron 12 dispositivos con una capacidad de 4 L cada uno con 24 almejas (2 almejas por dispositivo), de los cuales, 4 dispositivos (2 con sedimento y 2 sin sedimento) fueron para organismos control, el resto de los dispositivos (4 con sedimento y 4 sin sedimento) fueron para organismos experimentales, exponiéndolos a una concentración nominal de 300  $\mu\text{g/L}$  de cadmio durante 96 horas (4 días) con aireación constante, con una salinidad de 2‰, a una temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$  y un pH de 7 (Figura 15).



N= 24 Almejas

Concentración/contaminante: 300 µg/L de CdCl<sub>2</sub>.

Tiempo de exposición= 96 h.

**Figura 15. Representación de montaje de bioensayo de exposición a cadmio con almeja *P. caroliniana*.**

**Anexo 2. Técnica histológica estandarizada para el procesamiento de tejidos de la almeja *P. caroliniana*** (Jerónimo-Juárez, Guzmán-García y Guerrero-Legarreta, 2013).

En el laboratorio de Ecotoxicología de la UAM-I se cuenta con equipo para el procesamiento de tejidos, este equipo se utiliza para procesamiento de muestras de moluscos de la siguiente manera: los individuos recolectados y sobrevivientes fueron disecados en tres regiones: anterior, media y posterior. Se fijaron con formol amortiguado al 10 % por dos semanas y se procesaron en un Histoquinet (procesador de tejidos) marca Leica® modelo TP1020 por un periodo de 18 h. Se realizaron inclusiones en parafina mediante *cassettes* marca SIMPORT® modelo Histossete I, con parafina PARAPLAST® de Leica Microsystems, con un centro de inclusión marca LEICA® modelo EG1140-H dejando solidificar en una placa enfriadora marca LEICA® modelo EG1140-C.

Se cortaron 18 bloques mediante un micrótopo rotatorio marca MICROM® modelo HM3156. Cada región fue cortada a 5 µm. Los cortes obtenidos se tiñeron mediante la tinción de hematoxilina-eosina con tiempos estandarizados para este organismo. Cada preparación histológica se cubrió utilizando un medio de montaje a base de xilol y resina sintética de montaje marca GOLDEN BELL® al 50 %. Este tejido de almeja *P. caroliniana* se encuentra actualmente embebido en parafina, y se obtuvieron alrededor de 80 laminillas.

### **Anexo 3. Promedio de los parámetros morfométricos.**

Las almejas presentaron en promedio un largo de 53 mm, ancho de 47 mm, altura de 30 mm y un peso completo de 50 gr (tabla 9).

**Tabla 9. Promedio de parámetros morfométricos de los organismos analizados.**

<b>Parámetro</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.E.</b>
Largo (mm)	52.8	4.5
Ancho (mm)	47	3.6
Altura (mm)	30	3.5
Peso (gr)	50	11.7

D.E.=Desviación Estándar

## Anexo 4. Estadística aplicada para glándula digestiva organismos no expuestos a cadmio.

Omnibus Normality of Residuals	7.0476	0.029487	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.2727	0.611013	Accept

### Mann-Whitney U or Wilcoxon Rank-Sum Test for Difference in Medians

Variable	Mann Whitney U	W Sum Ranks	Mean of W	Std Dev of W
trat=1	21	49	52.5	6.511824
trat=2	28	56	52.5	6.511824

Number Sets of Ties = 2, Multiplicity Factor = 840

### Exact Probability Approximation Without Correction Approximation With Correction

Alternative Hypothesis	Prob Level	Reject H0 at .050	Z-Value	Prob Level	Reject H0 at .050	Z-Value	Prob Level	Reject H0 at .050
Diff<>0			-0.5375	0.590933	No	-0.4607	0.645014	No
Diff<0			-0.5375	0.295467	No	-0.4607	0.322507	No
Diff>0			-0.5375	0.704533	No	-0.6143	0.730481	No

**Anexo 5. Estadística para glándula digestiva de organismos no expuestos a cadmio vs organismos expuestos a cadmio.**

Omnibus Normality of Residuals	1.4660	0.480454	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	3.9474	0.070262	Accept

**Equal-Variance T-Test Section**

<b>Alternative Hypothesis</b>	<b>T-Value</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Reject H0 at .050</b>	<b>Power (Alpha=.050)</b>	<b>Power (Alpha=.010)</b>
Difference <> 0	-5.2827	0.000194	Yes	0.997918	0.973559

## Anexo 6. Estadística aplicada para gónada en organismos no expuestos a cadmio.

Omnibus Normality of Residuals	3.8056	0.149153	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.0400	0.845489	Accept

### Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Reject H0 at .050	Power (Alpha=.050)	Power (Alpha=.010)
Difference <> 0	-0.2000	0.845489	No	0.053786	0.011086

## Anexo 7. Estadística para gónada de organismos no expuestos a cadmio vs organismos expuestos a cadmio.

Omnibus Normality of Residuals	3.8056	0.149153	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.0400	0.845489	Accept

### Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Reject H0 at .050	Power (Alpha=.050)	Power (Alpha=.010)
Difference <> 0	-2.3250	0.042413	Yes	0.555500	0.266569

## Anexo 8. Estadística para índices obtenidos de glándula digestiva y gónada.

Omnibus Normality of Residuals	6.0720	0.048026	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	3.1822	0.080512	Accept

### Mann-Whitney U or Wilcoxon Rank-Sum Test for Difference in Medians

Variable	Mann Whitney U	W Sum Ranks	Mean of W	Std Dev of W
org=1	306	712	742	52.41343
org=2	366	666	636	52.41343

Number Sets of Ties = 7, Multiplicity Factor = 10458

Alternative Hypothesis	Exact Probability		Approximation Without Correction			Approximation With Correction		
	Prob Level	Reject H0 at .050	Z-Value	Prob Level	Reject H0 at .050	Z-Value	Prob Level	Reject H0 at .050
Diff<>0			0.5724	0.567070	No	0.5628	0.573549	No

## Anexo 9. Comparación de índices de organismos expuestos a cadmio.

Omnibus Normality of Residuals	0.0704	0.965403	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	1.5957	0.230500	Accept

### Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Reject H0 at .050	Power (Alpha=.050)	Power (Alpha=.010)
Difference <> 0	0.4376	0.669452	No	0.068869	0.015665



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00181

Matrícula: 2163802188

EVALUACIÓN DE LA CONDICIÓN FISIOLÓGICA DE LA ALMEJA *Polymesoda caroliniana* (BIVALVA: CORBICULIDAE) EXPUESTA A CADMIO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 11 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ  
 DRA. MARIA DEL ROCIO ZARATE HERNANDEZ  
 MTRO. JOSE ROBERTO JERONIMO JUAREZ  
 DRA. PATRICIA RAMIREZ ROMERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA

DE: JOSE ANGEL VAZQUEZ CASTRO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

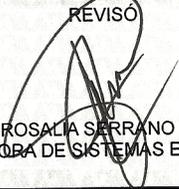
APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



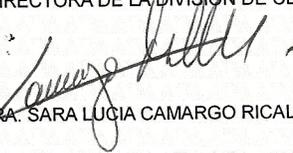

JOSE ANGEL VAZQUEZ CASTRO  
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



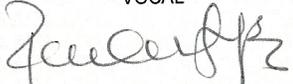
DR. JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMIREZ

VOCAL



DRA. MARIA DEL ROCIO ZARATE HERNANDEZ

VOCAL



MTRO. JOSE ROBERTO JERONIMO JUAREZ

SECRETARIA



DRA. PATRICIA RAMIREZ ROMERO