



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DEL CONOCIMIENTO EN CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA
POSGRADO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

**“ESTUDIO DE TRES BIOMARCADORES PARA DESCRIBIR EL
ESTADO DE SALUD DE LA POBLACIÓN DE *Pteria sterna*
(GOULD, 1851) EN CONDICIONES DE CULTIVO EN LA BAHÍA DE
LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”**

TESIS

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS CON ORIENTACIÓN EN
ACUACULTURA

PRESENTA:
CARLOS ESTEBAN GÓMEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR:
DR. CARLOS JUVENTINO CÁCERES MARTÍNEZ

CODIRECTORA:
DRA. ALMA SOBRINO FIGUEROA

LA PAZ BAJA CALIFORNIA SUR, DICIEMBRE DE 2013



BIOLOGÍA MARINA
CIMACO
Posgrado en Ciencias Marinas y
Costeras
PNP

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

Fecha: 26 de Noviembre de 2013

DR. ENRIQUE ALEJANDRO GÓMEZ GALLARDO UNZUETA
JEFE DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA
PRESENTE.




Los abajo firmantes, Miembros de la Comisión Revisora del trabajo de tesis completamente terminado, titulado:

Estudio de tres biomarcadores para describir el estado de salud de la población de *Pteria sterna* (Gould, 1851) en condiciones de cultivo en la Bahía de La Paz Baja California Sur, México,

que presentó: **Carlos Esteban Gómez Hernández.**

Otorgamos nuestro voto **aprobatorio** y consideramos que dicho Trabajo está listo para su **defensa**, a fin de obtener el **Grado de Maestría** en Ciencias Marinas y Costeras, con Orientación en Acuicultura.

Comisión Revisora:

<u>Dr. Carlos Cáceres Martínez</u> Titular- Director	 FIRMA
<u>Dra. Alma Sobrino Figueroa</u> Titular Director externa	 FIRMA
<u>Dr. Cesar Ruiz Verdugo</u> Titular	 FIRMA

C.c.p. Dr. Jorge Urbán Ramírez, Responsable de CIMACO.
C.c.p. Expediente del alumno (CIMACO)

AGRADECIMIENTOS

Deseo externar mi agradecimiento al Dr. Carlos J. Cáceres Martínez, por brindarme el apoyo, la asesoría, las facilidades, su disponibilidad y la oportunidad para desarrollar este tema de tesis: GRACIAS.

Al Dr. Cesar Ruiz Verdugo por las observaciones hechas en este escrito y las recomendaciones con el análisis de la ANOVA de dos Vías: GRACIAS.

A la Dra. Alma S. Sobrino Figueroa por su apoyo en el procesamiento de las en el laboratorio “Alejandro Villalobos” en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, por la asesoría, el apoyo brindado y por la revisión de este trabajo: GRACIAS.

A Carlos Augusto Aguilar Cruz encargado del laboratorio de histología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, por su apoyo en realizar los primeros ejercicios con la técnica de micronúcleos, por la asesoría en el uso del microscopio y en la toma de las fotografías: GRACIAS.

A CONACyT por haberme proporcionado la beca para realizar este posgrado: GRACIAS.

A Gaby Gutiérrez Morales por el apoyo y el tiempo brindado para aclararme mis dudas técnicas en el análisis de los datos.

A Daniela Pía Barrios Ruiz por su apoyo en la traducción del resumen de este trabajo.

Y finalmente, quiero externar mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera directo o indirectamente han permitido que este trabajo haya llegado a su culminación.

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi familia, por todo el apoyo moral y cariño, por ser una fuente de consuelo, por darme el ánimo y las ganas de seguir adelante, porque siempre han estado ahí para brindarme todo su apoyo y siempre me han dado palabras de aliento y nunca me han dejado caer; a toda mi familia le doy las gracias y los quiero mucho.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- El biomarcador de la Enzima Acetilcolinesterasa (AChE)	3
1.2.- La Lipoperoxidación como Biomarcador.....	3
1.3.-Estimación del daño genético: Micronúcleos (MN)	4
II.- ANTECEDENTES	5
2.1.- Generalidades de la especie.....	5
III.- JUSTIFICACIÓN	9
IV.- HIPÓTESIS	10
V.- OBJETIVOS	11
5.1.- Objetivo General	11
5.2.- Objetivos específicos	11
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS	12
6.1.- Área de estudio	12
6.2.- Trabajo de campo	14
6.3.- Trabajo de laboratorio	16
6.3.1- Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)	16
6.3.2- Lipoperoxidación	17
6.3.3.- Evaluación de micronúcleos (MN) y aberraciones.....	18
6.4.- Análisis estadísticos.....	19

VII.- RESULTADOS	21
7.1.- Crecimiento y mortalidad	21
7.2.- Análisis de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).....	26
7.3.- Análisis del grado de Lipoperoxidación.....	28
7.4.- Análisis de Frecuencia de aparición de MN.....	30
7.5.- Análisis de la Frecuencia de aparición de Aberraciones nucleares.....	31
VIII.- DISCUSIÓN.....	34
IX.- CONCLUSIONES.....	45
X.- RECOMENDACIONES	46
XI.-APÉNDICE	47
11.1.- Apéndice 1.- Función de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) durante la transmisión del impulso nervioso	47
11.3.-Apéndice 2	49
XI.- LIETERATURA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución geográfica de <i>P. sterna</i>	8
Figura 2.- Sitios de monitoreo en la Bahía de La Paz. (A) Pichilingue y (B) Marina La Paz.....	12
Figura 3.- Medidas de la jaula tipo "triangulo" utilizada para el cultivo de <i>P. sterna</i>	14
Figura 4.- Variable de Crecimiento Alto de la Concha (AC).....	15
Figura 5.- Registro de la temperatura promedio semanal (°C) durante el estudio.	22
Figura 6.- Resultado de Mortalidad (%), Crecimiento en alto de la concha (cm) y Ajuste del crecimiento al modelo de Von Bertalanffy en la Marina La Paz y Pichilingue.....	24
Figura 7.- Tipos de células contabilizadas con la técnica de MN: a.- Célula con el núcleo fragmentado, b.- Célula lobulada, c.- Célula arriñonada, d.- Célula con dos micronúcleos, e.- Célula con un micronúcleo y f.- células normales	25
Figura 8.- Interacción de la actividad de la enzima AchE entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporadas de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p<0.05$).	28
Figura 9.- Interacción del grado de la lipoperoxidación entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporada de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p<0.05$).	30
Figura 10.- Tendencia de los datos transformados de la frecuencia de MN por temporada. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p<0.05$).	31
Figura 11.- Interacción de los datos transformados de la frecuencia de	

aberraciones entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporadas de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

..... 33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.- Criterios de selección para el conteo de células y micronúcleos (Venier <i>et. al.</i> , 1997; Zalacain <i>et. al.</i> , 2003 y Sotil <i>et.al.</i> , 2007).	19
Tabla II.- Talla en alto de la concha (AC en cm) de los organismos de Pichilingue y Marina La Paz con su respectiva fecha de muestreo. n es el número de individuos colectados. Los valores de la talla se expresa como media \pm desviación estándar.	21
Tabla III.- Precipitación mensual (mm) de los últimos cinco años, Cd. La Paz, B. C. S. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2012), Dirección Local en Baja California Sur, Observatorio Meteorológico.	22
Tabla IV.- Valores de los biomarcadores obtenidos en localidad de la Marina La Paz y Pichilingue, actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en η M ACTC \cdot mín $^{-1}$ \cdot mg proteína $^{-1}$, lipoperoxidación en η M MDA \cdot g tejido $^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en ‰. n es el número de individuos.	25
Tabla V.- Valores de los biomarcadores obtenidos por fecha de muestreo (Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012), actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en η M ACTC \cdot mín $^{-1}$ \cdot mg proteína $^{-1}$, lipoperoxidación en η M MDA \cdot g tejido $^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en ‰. n es el número de individuos.....	26
Tabla VI.- Valores de los tres biomarcadores obtenidos para cada localidad y fecha de muestreo. La actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en η M ACTC \cdot mín $^{-1}$ \cdot mg proteína $^{-1}$, lipoperoxidación (Lipox) en η M MDA \cdot g tejido $^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en ‰. n es el número de individuos.	26
Tabla VII.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de la actividad de AChE	27
Tabla VIII.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de Lipoperoxidación.....	29
Tabla IX.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de las Frecuencias MN.	30
Tabla X.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de Frecuencias de Aberraciones.	32

Tabla XI.- Concentración de Metales Pesados en sedimento de la localidad de la Marina y Pichilingue. Tomado de Sobrino-Figueroa & Cáceres-Martínez (2011)..... 49

RESUMEN

Estudio de tres biomarcadores para describir el estado de salud de la población de *Pteria sterna* (Gould, 1851) en condiciones de cultivo en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México

En este estudio se realizó una evaluación de tres biomarcadores en los tejidos de *Pteria sterna* cultivada en dos localidades en la Bahía de La Paz, B. C. S. México con el fin de determinar el efecto de xenobióticos provenientes de las actividades de navegación y de escurrimiento de la Ciudad de La Paz, B. C. S. Se determinó la frecuencia de micronúcleos (MN)-aberraciones nucleares y el grado de lipoperoxidación en tejido branquial, la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en tejido del pie de *P. sterna*. Los organismos se mantuvieron en cultivo de Octubre de 2011 a Diciembre de 2012 en una zona de influencia antrópica directa “Marina La Paz” y en la localidad de cultivo comercial localizada en “Pichilingue”. Mensualmente fue registrado el crecimiento y la supervivencia de las ostras. Tres análisis fueron realizados: Diciembre 2011, Julio 2012 y Diciembre 2012 sobre 7-15 individuos para determinar la actividad AChE, el grado de lipoperoxidación y la frecuencia de aparición de MN-aberraciones nucleares. La mayor actividad de AChE se registró en los organismos que se colectaron en Pichilingue en Diciembre de 2012 ($12.41 \pm 2.68 \text{ } \eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) siendo la mayor ($p < 0.05$) al resto de las actividades enzimáticas, las cuales se ubicaron entre 5 a 7 $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$; el grado de lipoperoxidación inicialmente fue mayor ($p < 0.05$) en los organismos de Pichilingue de Diciembre de 2011 ($24.84 \pm 5.84 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) en comparación con los organismos de la Marina La Paz de esa misma fecha ($14.36 \pm 3.61 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$), en Julio de 2012 no se presentaron diferencias y finalmente para Diciembre de 2012 la mayor concentración de MDA ($p < 0.05$) se encontró en los organismos de la Marina ($25.66 \pm 4.61 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) en comparación con los individuos de Pichilingue de esa misma fecha ($16.73 \pm 0.77 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$); el arcoseno de la frecuencia de aberraciones nucleares mostró que en la Marina La Paz la mayor frecuencia ($p < 0.05$) ocurrió en Diciembre de 2011 (0.11 ± 0.023), el resto de las frecuencias se encontraron entre 0.070 a 0.086. Los tres biomarcadores fueron una herramienta útil para detectar la influencia de xenobióticos en los juveniles cultivados la Marina La Paz y Pichilingue, el grado de lipoperoxidación fue sensible a una “situación de estrés” que se presentó en la Marina La Paz durante los arrastres Pluviales.

Palabras Clave: Biomarcador, *Pteria sterna*, Lipoperoxidación, AChE, Micronúcleos, aberraciones nucleares, Bahía La Paz.

ABSTRACT

Study of Three biomarkers to describe the health status of the population of *Pteria sterna* (Gould, 1851) under culture conditions in La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico

A study of three biomarkers in *Pteria sterna* cultivated at two locations in the La Paz Bay, B. C.S., Mexico in order to determine the influence of xenobiotics resulting of the activities of navigation and of runoff from the city of La Paz, were done. The frequency of micronuclei (MN) and nuclear aberrations in gill tissue, the activity of the enzyme acetylcholinesterase AchE in foot tissue and the lipid peroxidation in gill tissue were determined for *P. sterna* grow from October 2011 to December 2012 in an area of anthropic direct influence "La Marina La Paz" and from commercial culture farm located at "Pichilingue". Monthly growth and survival were recorded, three analyses were performed: December 2011, July 2012 and December 2012 on 7-15 specimens to determine the activity of AchE, the degree of lipid peroxidation and the frequency of MN-nuclear aberrations. The highest activity of AchE was registered in animals from Pichilingue in December 2012 ($12.41 \pm 2.68 \text{ } \eta\text{M ACTC}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$) being different ($p < 0.05$) to the rest of the enzymatic activity obtained measurements, which were between 5 to 7 $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$; lipid peroxidation degree was initially higher ($p < 0.05$) in organisms of Pichilingue December 2011 ($24.84 \pm 5.84 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tissue}^{-1}$) compared with organisms from Marina La Paz of the same date ($14.36 \pm 3.61 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tissue}^{-1}$), in July 2012 there were no differences and finally for December 2012 the largest concentration of MDA ($p < 0.05$) was found in organisms from Marina La Paz ($25.66 \pm 4.61 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tissue}^{-1}$) compared with pearl oysters of the same date from Pichilingue ($16.73 \pm 0.77 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tissue}^{-1}$); the frequency of nuclear aberrations showed in the Marina La Paz the largest values ($p < 0.05$) for December (0.11 ± 0.023), the rest of frequencies values were found between 0.070 to 0.086. The three biomarkers were a useful tool to detect the influence of Xenobiotics in juveniles of *Pteria sterna* cultured in the Marina La Paz and Pichilingue, the degree of lipid peroxidation was sensitive to a "stressful situation" which was presented at the Marina La Paz after the rain runoff.

Keywords: Biomarker, *Pteria sterna*, lipid peroxidation, AchE, micronuclei, nuclear aberrations, La Paz Bay.

I.- INTRODUCCIÓN

La Bahía de La Paz, Baja California Sur es un lugar donde se concentran actividades antrópicas como son; la pesca ribereña con embarcaciones equipadas con motores fuera de borda, las actividades de recreo que incluyen embarcaciones protegidas con pinturas antivegetativas (como veleros, barcos, lanchas y yates) y una ciudad que está en constante crecimiento con la concurrencia de la industria de la construcción, el incremento del parque vehicular y una escasa pero presente actividad agrícola. Todas estas actividades generan residuos que contienen sustancias tóxicas que directamente o a través del sistema básico de drenaje de la ciudad o por el arrastre pluvial llegan a depositarse en la Bahía.

Por lo anterior, la salud de la Bahía se convierte en un punto crítico, ya que la presencia de contaminantes como son los metales pesados, hidrocarburos y pesticidas pueden llegar afectar a la biota, poniendo en riesgo todas las actividades que se realizan en el ambiente marino, como puede ser la pesca y las actividades acuícolas.

Los sedimentos en ambientes marinos acumulan contaminantes tales como metales pesados y sustancias orgánicas. En general, ingresan al sistema como residuos de la actividad industrial, urbana y transporte global. Entre los metales más estudiados por su efecto deletéreo en el medio se encuentran las sales de Cobre (Cu), Cadmio (Ca), Cobalto (Co), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Hierro (Fe) (Ruiz *et al.*, 1991). Estas sustancias, una vez vertidas al ambiente, pueden sufrir procesos como transporte, movilización y transformación de sus formas tanto químicas y/o físicas, las que en consecuencia podrían ser incorporadas a las cadenas tróficas dependiendo de su biodisponibilidad (Allen & Hansen, 1996).

Otra fuente importante de residuos que pueden llegar afectar la vida marina son los plaguicidas, los cuales son usados para el control de malas hierbas y el crecimiento exagerado de algas en estanques; para el control de insectos, mosquitos, larvas de estos, el control de plagas en hogares y animales domésticos

etc. (Ramírez, 2000).

El efecto de los residuos de las actividades productivas sobre el agua, suelo y aire puede ser estimado mediante el uso de biomarcadores y organismos centinelas; para lo cual, podemos definir a los biomarcadores como señales identificables (evaluación de cambios en fluidos corporales, células y tejidos) que proporcionan advertencias tempranas del daño provocado por los contaminantes (Koeman, 1991). El uso de biomarcadores como indicadores se basa en el hecho de que la primera interacción entre un agente xenobiótico y el organismo ocurre a nivel molecular-celular (Bayne, 1981). El estudio de estas interacciones permite establecer la relación causa-efecto determinando los mecanismos de acción de los contaminantes y en muchos casos, predecir con anticipación los daños que pueden ocurrir a otros niveles; es decir, los biomarcadores son sistemas de alarma temprana que indican que el organismo estuvo expuesto algún agente, antes que éste presente alteraciones que lo lleven a la muerte (Koeman, 1991; Vasseur & Cossu, 2006).

Varias técnicas citogenéticas y moleculares han sido utilizadas como biomarcadores para el monitoreo de la contaminación en ambientes acuáticos, así como para la detección de respuestas tempranas al estrés de forma previa a la ocurrencia de cambios en las comunidades. Entre los organismos acuáticos, los moluscos por su capacidad de filtración, hábitos sésiles, y su amplia distribución, son empleados como indicadores por acumular compuestos en sus tejidos, con efectos diversos dependiendo de la capacidad de tolerancia y mecanismos de detoxificación del individuo (Singh & Stephens, 1997).

Actualmente se lleva a cabo un cultivo a nivel comercial de concha nácar (*Pteria sterna*) en la Bahía de La Paz, de tal forma que se dispone de este molusco bivalvo todos los años y de todas las edades; situación que permite su denominación como especie centinela para ser muestreada sistemáticamente junto con sedimentos y agua para medir la presencia de xenobióticos.

Algunos biomarcadores como la actividad de la enzimas acetilcolinesterasa, el grado de lipoperoxidación y el daño genético (Frecuencias micronúcleos-

aberraciones nucleares) se relacionan a parámetros fisiológicos relevantes como cambios en las tasas de respiración, alimentación y excreción además de cambios en conducta, de moluscos y peces, que determinan los efectos subletales de tóxicos (Castro *et al.*, 2004; Novoa *et. al.* 2007; Gravato & Guilhermino, 2009; Sobrino & Cáceres, 2009).

1.1.- El biomarcador de la Enzima Acetilcolinesterasa (AChE)

Casi todos los casos de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas se deben a los insecticidas organofosforados, organoclorados, piretroides y carbámicos, a demás de metales pesados, estos contaminantes provocan la inhibición precoz e intensa de las acetilcolinesterasa. Por ello, el nivel de la actividad enzimática es uno de los mejores indicadores biológicos del efecto de la exposición aguda o crónica a los plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa (Metcalf, 1971; Fukuto, 1990; Henao & Corey, 1991; Dailianis *et. al.* 2003; Stefano *et. al.*, 2008).

Para comprender la importancia de este biomarcador es importante recordar que su concentración está directamente relacionada con la eficiencia de la transmisión del impulso nervioso, su inhibición interfiere o incluso inhibe la recepción de los estímulos nerviosos, poniendo en riesgo la integridad biológica del individuo (Apéndice 1).

1.2.- La Lipoperoxidación como Biomarcador

La lipoperoxidación ha sido sugerida como uno de los mecanismos moleculares involucrados en la toxicidad inducida también por plaguicidas (Khrer, 1993; Yarsan *et al.*,1999), pero también por la presencia de radicales libres generados por metales pesados como: Cobre (Cu), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Fierro (Fe), Cobalto (Co) etc., (Valko *et. al.*, 2005) los cuales producen un proceso degenerativo que actúa sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, y cuya consecuencia más importante es la destrucción paulatina de éstas (Buege & Aust, 1978; Khrer, 1993); dicha ruptura genera una variedad de

compuestos (Alcoholes, Cetonas, Aldehídos y Éteres) entre los que se destaca el malondialdehído (MAD) (Buege & Aust, 1978; Yarsan *et al.*, 1999).

Los iones de metales pesado son capaces de llevar a cabo reacciones Redox en sistemas biológicos. Se ha demostrado que este tipo de reacciones induce la formación de especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno *in vivo* e *in vitro* en células de mamíferos. Con frecuencia se forman radicales hidroxilo, estos radicales son conocidos por causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN (Wells *et. al.*, 2005; Beyersmann & Hartwig, 2008).

1.3.-Estimación del daño genético: Micronúcleos (MN)

Una de las técnicas utilizadas para la evaluación de macrolesiones en el material genético es el Test de Micronúcleos (MN). Inicialmente descrito por Schmid (1975) para células de mamíferos, esta prueba se basa en la identificación de células que contienen masas de cromatina intracitoplasmáticas separadas del núcleo, producidas por la fragmentación del DNA debido a los efectos de compuestos genotóxicos (Scarpato *et al.*, 1990).

Al igual que la lipoperoxidación, el daño genético a sido asociado a la presencia de radicales libres originados por la acción de iones de metales pesados como: Cu, Cd, Cr, Fe, Co entre otros, (Liyan *et.al.*, 2005; Valko *et.al.*, 2005; Wells *et. al.*, 2005; Beyersmann & Hartwig, 2008).

Autores como Venier *et.al.* (1997), Izquierdo *et. al.* (2003), Sotil *et. al.* (2008) han reportado que la formación de anormalidades nucleares como: núcleos lobulados, arriñonados (forma de riñón), muescados o fisurados, son también resultado del efecto de la contaminación por metales pesados en el ambiente.

En este estudio se realizó un análisis de los tres biomarcadores antes citados en tres temporadas y en dos áreas, una con una notable presión antrópica (Marina La Paz) y otra en zona con menor nivel de actividad antropogénica (Pichilingue) en La Bahía de La Paz, con el objeto de describir el estado de salud que mantiene la especie *Pteria sterna*.

II.- ANTECEDENTES

Hasta el momento la información publicada sobre biomarcadores en la especie *P. sterna* es inexistente. Sobrino-Figueroa & Cáceres-Martínez (2011), detectaron la presencia de agentes tóxicos y genotóxicos en la Bahía de La Paz y han señalado cuatro zonas de posible riesgo en donde reportan la presencia de metales pesados como: Cu, Cr, Pb, Manganeso (Mn) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), dentro de las localidades que estos autores estudiaron, la denominada La Marina, por su localización recibe la influencia directa de la Cd. de La Paz y en el estudio se muestra que la presencia de agentes nocivos disminuye conforme uno se aleja de este sitio.

Los antecedentes que existen de estudio de bioacumulación y biomarcadores en moluscos bivalvos en la Bahía de La Paz comprenden; *Megapitaria squalida* (Méndez *et. al.*, 2006; Cantú-Medellin *et. al.*, 2009), *Argopecten ventricosus* (Sobrino-Figueroa & Cáceres-Martínez, 2009), en todos los trabajos se ha demostrado alteraciones en los biomarcadores estudiados como resultado a la exposición a agentes tóxicos como metales pesados, pesticidas etc.

Se han reportado el uso de estos tres biomarcadores en el biomonitoreo de ambientes marinos con especies como: Mejillones (Izquierdo *et. al.*, 2003; Márquez, 2005; Taleb *et. al.*, 2007; Tsangaris *et. al.*, 2007; Rank *et. al.*, 2007; Sotil *et. al.*, 2008; Bocchetti *et. al.*, 2008; Machado-Schiaffino *et. al.*, 2009; Risso-de Faverney *et. al.*, 2010; Giarratano *et. al.*, 2010), almejas (Scarpato *et. al.*, 1990; Gerent *et. al.*, 2003; Boldina-Cosqueric *et. al.*, 2010), Ostiones (Bernal-Hernández *et. al.*, 2010) en todos estos casos el uso de biomarcadores y moluscos bivalvos a sido una herramienta útil para evidenciar la presión antrópica en estos ambientes.

2.1.- Generalidades de la especie

Taxonomía (Keen, 1971).

Phyllum Mollusca

Clase Pelecypoda

Subclase Pteriomorphia

Orden Pterioidea

Superfamilia Pteriacea

Familia Pteriidae

Género *Pteria*

Especie *Pteria sterna* (Gould, 1851)

2.2.- Descripción.

La concha nácar es un molusco pelecípodo (Barnes, 1985) que presenta valvas convexas irregulares relativamente delgadas siendo su superficie externa rugosa; cuando no está desgastada esta cubierta de densas espinas o escamas radiales aplanadas mas largas y fuertemente imbricadas cerca del borde ventral de la concha (Fisher *et al.*, 1995); su concha es ovalada y posee una extensión en forma de ala característica que le da el nombre a la especie. El color de la concha es café oscuro presentando ligeras variaciones, la capa de nácar es de color rosáceo a púrpura (Pérez-Estrada, 2000).

11.2.2.- Reproducción.

En cuanto a su reproducción, García-Domínguez (2002) en la laguna ojo de liebre en el 2001, encontró organismos de *P. sterna* indiferenciados de Febrero a Junio, el mayor porcentaje se registró en Mayo (73.3%); la gametogénesis se encontró de Junio a Septiembre con el porcentaje mas alto en Agosto (89%), la madurez se presentó en Septiembre y Octubre con el porcentaje más alto en Octubre (55%), el desove se ubicó entre Agosto a Abril y de Octubre a Diciembre, con el mayor porcentaje en Noviembre (100%) el post-desove se encontró de Enero a Junio y en Diciembre con el porcentaje más alto en Enero (76.6%).

Monteforte (2005) menciona que el proceso de gametogénesis de esta especie es continuo todo el año, con épocas principales de reproducción en invierno y raros desoves durante los meses cálidos. En el ciclo de reproducción se nota la presencia de actividad en Junio y Julio, pero ésta era inicial, acompañada por un pequeño número de individuos en fase de post-reproducción,

ésta se extendió durante todo el año hasta Noviembre. Por otro lado, la gametogénesis fue también un proceso constante, desde Septiembre hasta Marzo. Algunos individuos en proceso de maduración los observó a partir de Noviembre, alcanzando su frecuencia más alta entre Diciembre y Enero. El desove ocurrió, con precisión, en Febrero; la etapa post-reproducción se desarrolló entre finales de Febrero y Marzo. Se pudo notar además, un ciclo de gametogénesis corto que incluyó la madurez y el desove en Abril y Mayo.

El desarrollo gonádico y reproductivo de los moluscos bivalvos es altamente dependiente de los factores ambientales, entre los cuales destacan la temperatura (22.2 y 23.4 °C, Saucedo y Monteforte, 1997) y disponibilidad de alimento (Sevilla, 1969). *Pteria sterna* es hermafrodita protándrico. En condiciones de laboratorio, una vez que se lleva a cabo la fecundación, a las 24 hrs. se observa la larva trocófora y a las 48 hrs. la larva véliger y la típica larva de forma "D" a las 60 hrs (Serrano y Salinas, 1993). La prodisoconcha I permanece hasta el sexto o séptimo día de cultivo (93-99 µm de Longitud de la concha (La) x 50.0 µm de Alto de la concha (Al), cuando la larva genera los anillos de crecimiento que dan origen a la prodisoconcha II (106-112 µm de La x 94-103 µm de Al), se empieza a desarrollar el umbo a los 8 o 9 días de cultivo. Las larvas ya umbadas con el velum bien desarrollado se observan entre los días 14 y 16 (169- 189 µm de La x 155-173 µm de Al) con su estructura interna característica; que se empieza a modificar a partir de los días 18 y 19, cuando la larva pediveliger (207-214 µm de La x 185- 190 µm de Al) empieza a generar la glándula pedal; la mancha ocular es visible a partir de día 19-20 y la metamorfosis es observada a partir del día 20-23. (Serrano y Salinas, 1993).

11.2.3.- Ecología.

La zonación de esta especie es poco clara debido a su patrón gregario de repartición espacial y a la alta dispersión de los individuos cuando estos ocurren aislados. La mayor densidad de esta especie se observa por bajo 10-30 m de profundidad, en planicies semi-expuestas y generalmente con alta turbidez. En

estos sitios, las poblaciones salvajes se encuentran en forma fuertemente aglomerada y precariamente fijada sobre fragmentos gruesos de origen rocoso, corales Gorgonidae, testas de madreporarios y moluscos, y otros substratos duros dispersos sobre fondos de arena (Fisher *et al.*, 1995; Monteforte, 2005). Su tipo de alimentación, como todos los bivalvos, es por filtración y se alimenta de microorganismos y materia orgánica en suspensión.

11.2.4.- Distribución.

La Concha nácar se distribuye desde la costa de California hacia el sur hasta las costas de Perú, pasando por el golfo de California (Sevilla, 1969; Keen, 1979) (Figura 1). Se localiza en dos zonas específicas fuera del Golfo de California; en Bahía Magdalena como un emplazamiento poblacional aislado geográficamente y en el Golfo de California desde Isla Tiburón y Angel de la Guarda al Norte y al Sur hasta Perú pasando por Cabo San Lucas. En las costas del Golfo de California hay una ocurrencia importante de juveniles, que disminuye drásticamente hacia el sur, a partir del Trópico de Cáncer.



Figura 1.- Distribución geográfica de *P. sterna*.

III.- JUSTIFICACIÓN

Pteria sterna es un organismo que actualmente es cultivada a nivel comercial en la Bahía de La Paz B. C. S. por lo que importante evaluar su estado de salud y el grado de afectación por agentes tóxicos y genotóxicos; y de esta manera establecer las bases para los criterios de salud de este organismo.

IV.- HIPÓTESIS

- La presencia de agentes tóxicos en el sitio denominado Marina La Paz tiene influencia en la disminución de la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa en el tejido del pie de *Pteria sterna*.
- La presencia de agentes tóxicos en la Marina La Paz induce un aumento en la generación de Malondialdehído resultante del estrés oxidativo de las membranas celulares del tejido branquial de *Pteria sterna*.
- La presencia de agentes tóxicos en la Marina La Paz produce alteraciones (sitios de rotura) en el material genético de las células del tejido branquial de *Pteria sterna*.
- La ausencia de agentes tóxicos en el sitio denominado Pichilingue no produce alteraciones en la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa, tampoco evidencias de estrés oxidativo, ni daño genético en los tejidos de *Pteria sterna*.

V.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo General

- Estudiar tres biomarcadores para describir el estado de salud de *Pteridasteria sterna* (Gould, 1851) en condiciones de cultivo en La Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

5.2.- Objetivos específicos

- Evaluar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en organismos expuestos a una zona con una alta presión antrópica (Marina La Paz) y organismos cultivados en una zona de baja actividad antrópica (Pichilingue).
- Evaluar el grado de lipoperoxidación en organismo expuestos a una zona con una alta presión antrópica (Marina La Paz) y organismos cultivados en una zona de baja actividad antrópica (Pichilingue).
- Evaluar el daño genético a través de la frecuencia de micronúcleos y aberraciones nucleares en organismo expuestos a una zona con una alta presión antrópica (Marina La Paz) y organismos cultivados en una zona de baja actividad antrópica (Pichilingue).

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Área de estudio

El estudio se realizó en dos localidades de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México, la Primera (A) frente a La Isla Gaviota ($24^{\circ}17'21.75''$ N y $110^{\circ}20'26.9''$ O) a la altura de la Playa de Pichilingue, lugar donde actualmente se encuentra la línea de cultivo de la empresa “Perlas del Cortes”, la segunda localidad (B) en la Marina de La Paz ($24^{\circ}09'09.77$ N; $110^{\circ} 19'25.75''$ O.) sitio donde se mantuvo un cultivo experimental (Figura 2).

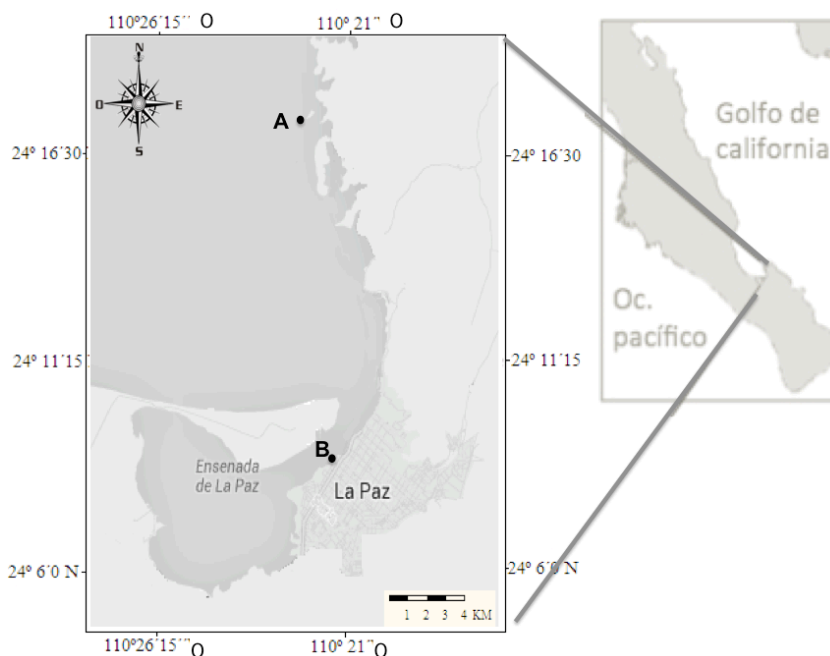


Figura 2.- Sitios de monitoreo en la Bahía de La Paz. (A) Pichilingue y (B) Marina La Paz.

De acuerdo con INEGI (2010) El Municipio de La Paz, Baja California Sur, cuenta con una población total de 251,871 personas.

A los alrededores de la Bahía de La Paz el tipo de Clima de acuerdo con la clasificación climática Koeppen es $BW(h)hw(x')(e)$ que corresponde según las modificaciones de García (1981) a clima muy árido, cálido y régimen de lluvias en verano, así como precipitación pluvial en invierno mayor a 10.2 mm y extremoso.

Los vientos extremos tienen dirección Norte y alcanzan una velocidad de 10 m/s. En el área de estudio no se presentan heladas ni se registra granizo, durante

los meses de Septiembre y Octubre existe una incidencia de ciclones de 0.65 por año.

Las características climáticas de la Bahía de La Paz, no permiten la existencia de ríos, solamente se presentan escurrimientos que generalmente son torrenciales pero efímeros, ya que solamente llevan agua cuando se presenta una precipitación de gran magnitud e inmediatamente después de que concluye ésta.

La zona de la isla “Gaviota” (lugar donde se encuentra la línea de cultivo de las ostras perleras de la empresa “Perlas del Cortes”) es un sitio de manifestación de surgencias en La Bahía de La Paz, por lo que sus aguas presentan una temperatura ligeramente inferior que en el resto de la bahía y la concentración de nutrientes garantiza una actividad orgánica primaria permanente (Murillo, 1987).

En la Zona de cultivo de la empresa “Perlas del Cortes” esta caracterizada por un talud extendido, la línea de cultivo se encuentran a partir de los 12 m hasta los 27 m de profundidad y permite la libre caída de las canastas triangulares de cultivo sin descansar en el fondo evitando el acceso de organismos depredadores.

Las mareas en la zona son de tipo mixto semidiurno y los registros del mareógrafo de La Paz, describen con exactitud lo que ocurre en la localidad de estudio ya que se trata de litoral.

Las corrientes en la zona de estudio son dominadas por la acción de mareas, al entrar y salir de la Bahía de La Paz, pero sufren modificaciones por el efecto de los canales y el plano batimétrico que la componen. Obeso-Nieblas & Jiménez-Illescas (1989) realizaron un trabajo de simulación de la corriente de la bahía a partir del componente M2 de la marea. A la mitad del periodo del componente mencionado (cuando la Bahía se vacía) la velocidad de la corriente es de $7.8 \text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ y corre paralela a la costa en el sentido Sur-Norte, con un transporte de aproximadamente $0.5 \text{ m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$. Cuando la onda de marea es máxima esto es cuando se llena la Bahía, la corriente es de $13.5 \text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ y un transporte superior del orden de $1 \text{ m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$, con una dirección también paralela a la costa pero ahora de Norte-Sur.

En la Isla “Gaviota” no se presentan encañonamientos de agua que

podieran incrementar la velocidad de corriente durante pleamar y bajamar, ya que se encuentra localizado en frente de la Bahía propiamente dicho. De esta forma la Bahía de la Paz presenta sus máximas corrientes (velocidades y transporte superficial) en la Ensenada de La Paz, el Canal de San Lorenzo y la parte norte de la Isla La Partida, localidades que se encuentran alejadas de la zona de estudio.

6.2.- Trabajo de campo

Los animales fueron provistos por la Empresa “Perlas del Cortes”, se hizo uso de sus instalaciones y las rutinas de mantenimiento para el cultivo comercial se realizaron conforme a sus protocolos establecidos, se registro la temperatura del agua con un termógrafo Onset®. En el caso del experimento de la Marina La Paz se colocaron en Octubre de 2011 dos jaulas de cultivo tipo “triangulo” con medidas de 0.3 m de alto, 0.45 m de ancho y un metro de largo con una luz de malla de 16 mm (figura 3), en ellas se ubicaron 146 organismos con una talla inicial de 4.44 ± 0.95 cm.

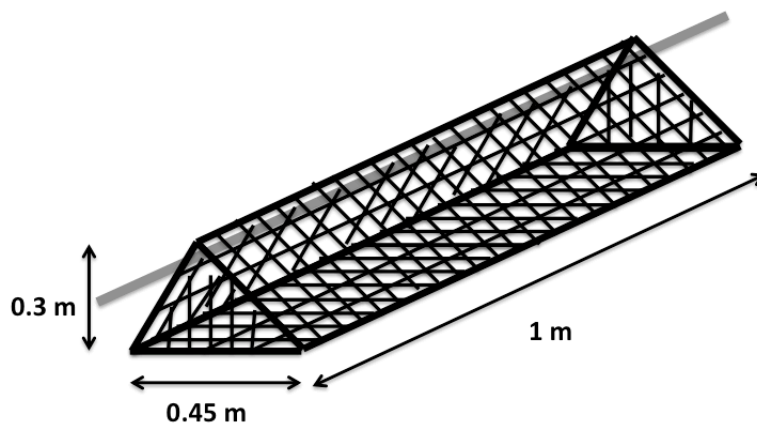


Figura 3.- Medidas de la jaula tipo "triangulo" utilizada para el cultivo de *P. sterna*.

Mensualmente los animales fueron limpiados de fauna epibionte y cambiados de jaula. La variable morfométrica que se usó para estimar su crecimiento fue la alto de la concha (AC) (Fig. 4), que es la dimensión máxima dorso ventral, perpendicular a la charnela; la cual fue medida con un Vernier ± 0.01 cm de precisión.

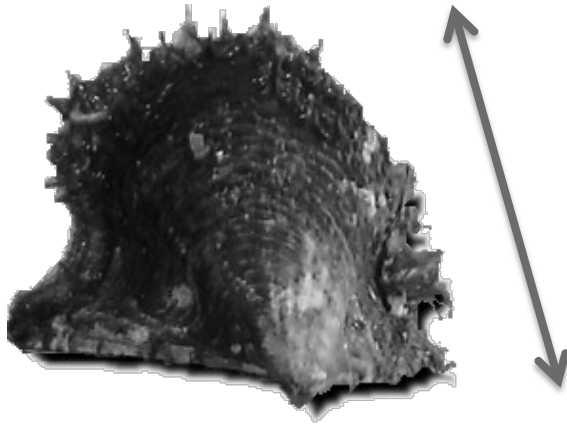


Figura 4.- Variable de Crecimiento Alto de la Concha (AC).

Con los datos de crecimiento de el alto de la concha (AC) se realizó la estimación y el ajuste de los parámetros del modelo de crecimiento de Von Bertalanffy a través del método iterativo de mínimos cuadrados, para lograr este ajuste se utilizó la herramienta de Solver del programa de Excel 2011 versión 14.3.5.

El modelo de Von Bertalanffy (Sparre & Venema, 1997) es:

$$a) AC = L_{\infty} \cdot [1 - e^{-k \cdot (t-t_0)}] \pm \Sigma C_{\text{error}}$$

Donde:

AC = Talla de alto de la concha (AC) esperado para un tiempo (t).

L_{∞} = La Talla media de un organismo muy viejo o longitud asintótica (cm).

k = Parámetro de curvatura con la un organismo alcanza la talla asintótica, la pendiente ($\text{cm} \cdot \text{mes}^{-1}$).

t_0 = “Parámetro de condición inicial”, determina un punto en el tiempo en el que el organismo tiene talla cero; es considerado un parámetro de ajuste ya que no hay una justificación biológica.

ΣC_{error} = Suma cuadrática del error.

6.3.- Trabajo de laboratorio

Para el análisis de las muestras en el laboratorio, los organismos fueron colectados en Diciembre de 2011, Julio de 2012 y Diciembre de 2012, de 7 a 15 organismos fueron tomados de cada localidad, se lavaron y limpiaron de fauna epibionte con un cepillo, se etiquetaron perfectamente y se colocaron en una hielera en frío (con recipientes de gel frío), se cerró perfectamente la hielera y fueron transportados por avión a la Cd. de México y llevados a la instalación del “Laboratorio Alejandro Villalobos”, en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Se procuró que los organismos no estuvieran más de 9 horas durante este trayecto y ese mismo día se procedió a tomar y preparar las muestras para los análisis.

6.3.1- Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

De los animales colectados se procedió a retirar el pie con ayuda de pinzas y tijeras, el tejido muscular de pie se homogenizó en un homogenizador de tejidos con cuchilla de acero inoxidable (Turrox mod. 20a) y con solución buffer de fosfatos de potasio de pH 7.2 (Solución 1: Se disolvió 17.42 gr de K_2HPO_4 en 1000 ml de agua deionizada, Solución 2: Se disolvió 13.61 gr de KH_2PO_4 en 1000 ml de agua deionizada. Para preparar el buffer: En una parrilla de agitación, se colocó el electrodo del potenciómetro en la solución 1, se añadió la solución 2 a la solución 1 en agitación hasta obtener una solución de pH 7.2), posteriormente se tomó una alícuota de 2 ml de cada muestra y se colocó en tubos Eppendorf, estos tubos se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 minutos en una ultracentrifuga Hermle Z233 MK-2. Se recuperó el sobrenadante y el pellet se descartó. Para determinar la concentración de proteína en las muestras de pie se utilizó el método colorimétrico de Bradford.

En un fototubo se colocó 2.6 ml de buffer de fosfatos de pH 7.3 (solución 1: Se disolvió 7.16 gr de Na_2HPO_4 en 200ml de agua desionizada, solución 2: Se disolvió 1.3609 gr de KH_2PO_4 en 100 ml de agua desionizada. En una parrilla de

agitación se colocó la solución 2 y un el electrodo del potenciómetro en la misma, se vertió la solución 1 en la 2 en agitación hasta alcanzar el pH de 7.3) más 100 μ L de DTNB (5,5'-dithio-bis-2-ácido nitrobenzoico) 0.01M; y 400 μ L de muestra. Se dejaron incubar por 5 minutos. Posteriormente se adicionó 20 μ L de Ioduro de acetilcolina (0.075M). Se siguió la reacción durante 8 minutos leyendo cada minuto a 412 η m con un espectrofotómetro (thermo spectronic Genesys 10 uv). Como blanco se usó buffer de fosfatos (pH 7.3).

La actividad de la enzima se expresó como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 η mol de acetilcolina por minuto por mg de proteína (η M \cdot ACTC \cdot min⁻¹ \cdot mg proteína⁻¹), y se calculó usando la ecuación siguiente (Ellman *et al.*, 1961):

$$\text{AchE} = \frac{A_{\Delta 405} \cdot \text{Vol total} \cdot 1000}{1.36 \times 10^4 \cdot \text{long. celda} \cdot \text{Vol}_m \cdot \text{mg proteína}}$$

Donde:

AchE= Actividad de la enzima en η M \cdot ACTC \cdot min⁻¹ \cdot mg proteína⁻¹

$A_{\Delta 405}$ = Cinética, corregida con la hidrólisis espontánea. ΔA_{405}

Vol total = Volumen total del ensayo en ml

1.36×10^4 = Coeficiente de extinción del DTNB ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

long celda= 1 cm

Vol_m = Volumen de muestra (homogenizado) en ml

mg proteína= Concentración de proteína en el homogenizado (mg \cdot ml⁻¹)

6.3.2- Lipoperoxidación

De los organismos colectados de *P. sterna* se procedió a retirar tejido de la branquia y se pesó en una balanza digital (Mettler PB 300 con una precisión de 0.01 gr.) Los pesos de cada porción de branquia oscilaron entre 0.10 a 0.30 gr. Estas muestras de tejido fueron homogenizadas en un homogenizador de tejidos

con cuchilla de acero inoxidable (Turrox mod. 20a) con buffer de fosfatos de pH 7.2.

Posteriormente se tomó un ml del homogenizado de la muestra se colocó en un tubo de ensayo y se le agregaron dos ml de la mezcla de reactivos (Ácido tricloroacético 15% W/V, Ácido Tiobarbitúrico 0.5% W/V y Ácido clorhídrico 0.25 N), las muestras se incubaron a 90 °C en baño maría durante 20 mín. o hasta que presentaban un color rojizo-rosado. Se dejó enfriar los tubo de ensayo y se centrifugaron durante 5 mín. a 2500 rpm (Hermle Z233 MK-2). El sobrenadante se leyó a 535 nm con un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10 uv), usando como blanco la mezcla de reactivos.

Los resultados se expresaron en ηM de MDA (ácido malondealdehído)·g tejido⁻¹ (Buege & Aust, 1978):

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot P}$$

Donde:

C = Concentración de ηM MDA·g tejido⁻¹

A = Absorbancia de la muestra

ε = Coeficiente de extinción 1.56×10^5 M/cm (donde M es molaridad = moles ·litro⁻¹)

P = Grosor de la fotocelda en cm.

6.3.3.- Evaluación de micronúcleos (MN) y aberraciones

Se extrajeron las branquias de los organismos cuidadosamente y manualmente se cortaron, se colocó en un tubo de ensayo y se fijaron con una solución de etanol absoluto-ácido acético, 3:1 durante 15 mín., posteriormente se agitaron vigorosamente para obtener una suspensión de células.

Se tomó una muestra de la suspensión con pipeta Pasteur y se colocaron 3 gotas a un portaobjetos para realizar un frotis, los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente, una vez secos, se introdujeron las preparaciones en buffer

de fosfatos de potasio (pH 7.2) durante 2 minutos y se tiñeron con Giensa al 5% por 15 minutos sin dejar secar el colorante. Las preparaciones se lavaron con agua corriente, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se montaron en resina para su posterior análisis.

La cuantificación de MN y aberraciones se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por Venier *et. al.* (1997), Zalacain *et. al.* (2003) y Sotil *et. al.* (2007) que considera MN de tamaño igual o menor a un tercio del núcleo, los tipos de aberraciones fueron de núcleos con forma de riñón, lobulados y núcleos fisurados o rotos; la frecuencia de MN y aberraciones se estimó observando 1,000 células por muestra y se utilizó un microscopio Nikon optiphot-2 con sistema de captura digital sight ds-5M, los criterios de selección de células para su conteo y evaluación de micronúcleos se muestran en la tabla I.

Tabla I.- Criterios de selección para el conteo de células y micronúcleos (Venier *et. al.*, 1997; Zalacain *et. al.*, 2003 y Sotil *et.al.*, 2007).

Células	Micronúcleos
El citoplasma debe distinguirse claramente	Diámetro no mayor a 1/3 del núcleo
Membrana citoplasmática y nuclear intactas y bien definidas	Intensidad de tinción y forma similar a los núcleos
Núcleos con similar grado de condensación de cromatina	No conectados de ningún modo con el núcleo
Células solas o juntas pero no traslapadas	

6.4.- Análisis estadísticos

Para saber si hubo diferencias significativas en las curvas de crecimiento de cada localidad, se utilizó el método de Ratkowsky (Chen *et. al.* 1992).

Los datos de cada biomarcador fueron analizados usando cajas de bigotes (box wisquer plots) como análisis exploratorio, posteriormente se aplicó una prueba de normalidad (Shapiro wilk) y de homocedasticidad de varianzas (prueba

de Levene), en todos los análisis se cumplió la normalidad y homocedasticidad. Posteriormente se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) para conocer si existían efectos por la sitio de muestreo (Marina La Paz y Pichilingue), efectos por la temporada de muestreo (Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012) y efectos por la interacción de estos. Se aplicó la transformación *arcoseno* para el caso de la frecuencia de MN y aberraciones debido a que fueron datos porcentuales, además de que se encontraron en un rango de 0 a 1 (Zar, 1996).

VII.- RESULTADOS

7.1.- Crecimiento y mortalidad

Los organismos estuvieron expuestos a las condiciones de Marina la Paz y Pichilingue durante 15 meses (Octubre 2011 a Diciembre 2012). Durante este periodo se realizaron tres muestreos (3, 9 y 15 meses de exposición) las muestras consistieron en 7 - 15 organismos para los análisis en laboratorio (Tabla II).

Tabla II.- Talla en alto de la concha (AC en cm) de los organismos de Pichilingue y Marina La Paz con su respectiva fecha de muestreo. n es el número de individuos colectados. Los valores de la talla se expresa como media \pm desviación estándar.

	n	AC	Fecha de muestreo
Pichilingue	11	3.32 \pm 0.58	Diciembre de 2011
Marina La Paz	11	4.67 \pm 0.71	Diciembre de 2011
Pichilingue	7	7.88 \pm 0.65	Julio de 2012
Marina La Paz	7	7.57 \pm 0.79	Julio de 2012
Pichilingue	15	8.49 \pm 0.60	Diciembre de 2012
Marina La Paz	15	8.75 \pm 0.87	Diciembre de 2012

El registro de la temperatura que se llevó acabo en la línea de cultivo de la empresa “Perlas del Cortes” solo se pudo realizar en el periodo de Octubre de 2011 a Abril de 2012, debido a que el termógrafo tuvo problemas y ya no se pudo continuar con el registro, con la finalidad de completar lo que faltó del registro de la temperatura en el estudio (de Mayo a Diciembre de 2012), se tomaron los datos de los últimos cuatro años. La temperatura osciló en los meses cálidos en los 29°C, mientras que en invierno se encontró alrededor de los 21°C (Fig. 5).

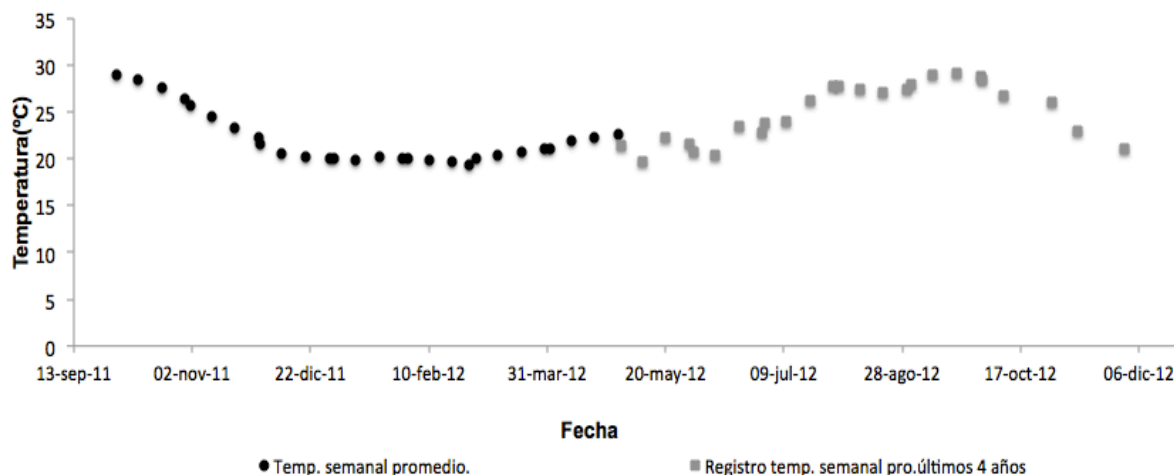


Figura 5.- Registro de la temperatura promedio semanal (°C) durante el estudio.

Los registros de las prestaciones pluviales fueron proporcionados por CONAGUA (2012). En la Tabla III se pueden apreciar los registros de las precipitaciones mensuales (mm) de los últimos cinco años. Durante el periodo en que se llevó a cabo este estudio (Octubre de 2011 a Diciembre de 2013), se puede apreciar que en Noviembre de 2012 se registró la precipitación pluvial más importante de ese año (31.1 mm), de Enero a Junio de 2013 no se registraron precipitaciones importantes y para el periodo de Julio a Octubre de 2013 los registros fueron de 5.1, 110.2, 114.9 y 26.9 mm respectivamente, siendo las precipitaciones pluviales más importantes de los últimos 5 años.

Tabla III.- Precipitación mensual (mm) de los últimos cinco años, Cd. La Paz, B. C. S. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2012), Dirección Local en Baja California Sur, Observatorio Meteorológico.

Año	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
2008	0.0	0.0	Inap	0.0	0.0	Inap	6.7	47.7	46.2	39.0	0.0	0.0
2009	Inap	Inap	Inap	0.0	0.2	Inap	2.1	9.5	73.1	102.3	0.0	3.7
2010	2.4	4.1	0.4	Inap	0.0	0.0	Inap	5.0	15.6	0.0	0.0	0.0
2011	Inap	0.0	0.0	0.0	0.0	Inap	5.1	11.6	0.8	Inap	31.1	0.0
2012	Inap	9.9	0.0	0.0	Inap	0.0	5.1	110.2	114.9	26.9	0.0	19.2

Nota: Inap significa que llovió inapreciable, no lo suficiente para ser medido. Duración del presente estudio fue de Octubre de 2011 a Diciembre de 2012, toma de muestras en Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012 (casillas grises).

Los estimadores de los parámetros del modelo de crecimiento de Von Bertalanffy que mejor ajustaron por el método iterativo de mínimos cuadrados en

Pichilingue ($\Sigma c_{\text{error}} = 0.379$) y Marina La Paz ($\Sigma c_{\text{error}} = 0.695$) a los datos de alto de la concha (AC) observado en los organismos de *P. sterna* fueron para Pichilingue: $L_{\infty} = 14.52$ cm, $k = 0.094$ cm·mes⁻¹, $t_0 = 5.24$, mientras que para la Marina La Paz: $L_{\infty} = 12.15$ cm, $k = 0.069$ cm·mes⁻¹, $t_0 = -5.03$. Las ecuaciones de crecimiento de Von Bertalanffy quedaron descritas de la siguiente manera:

$$AC \text{ Pichilingue} = 14.52 \cdot [1 - e^{-0.094(t-5.24)}] \pm 0.379$$

$$AC \text{ Marina} = 12.15 \cdot [1 - e^{-0.069(t+5.03)}] \pm 0.695$$

El valor de L_{∞} de 14.52 y 12.15 cm es el valor asintótico del modelo de crecimiento, este valor biológicamente es la talla máxima que pudieran alcanzar los individuos de *P. sterna* en el cultivo realizado en cada localidad.

Con respecto a k , este valor nos proporciona una estimación de la tasa de crecimiento (0.094 cm·mes⁻¹) que ocurre hasta alcanzar la talla de 14.52 cm en Pichilingue, mientras que en la Marina La Paz fue de 0.069 cm·mes⁻¹ para conseguir una talla de 12.15 cm.

El valor de t_0 indica la edad teórica en la cual el organismo tiene talla cero (5.24 y -5.03 respectivamente), biológicamente este valor no tiene una explicación y es considerado un parámetro de ajuste para este modelo.

Los datos de crecimiento descritos con la ecuación Von Bertalanffy en las dos localidades fueron comparados encontrando diferencias significativas ($F_{3,9} = 93.17$, $p < 0.05$) siendo la localidad de Pichilingue la que presentó una mayor tasa de crecimiento (k) de 0.094 cm·mes⁻¹ en comparación con la Marina La Paz ($k = 0.069$ cm·mes⁻¹).

En la Figura 6 se muestran los datos de crecimiento (cm) con sus respectivos modelos, además de los datos de mortalidad (%) de la zona de Pichilingue y la Marina La Paz; el registro de datos se realizó mensualmente, con algunos ajustes cuando el clima impidió el muestreo y este fue pospuesto algunos días. Los modelos de crecimiento para ambas localidades se ajustan perfectamente a los datos observados.

En la Marina La Paz se registró un caso de mortalidad masiva en Noviembre y Diciembre (meses 2 y 3) de 2011, debido a que en esas fechas se presentó la precipitación pluvial más importante de todo ese año, después de ocurrido este evento se realizó una inspección de las ostras, se observó que hubo una gran suspensión de sedimento en la columna de agua y los organismos estaban cubiertos de sedimento, lo que probablemente ocasiono que cerca del 70% de las ostras murieran. Después de este evento no se presentaron mortalidades considerables en este sitio. La Mortalidad en la localidad de Pichilingue fue menor (menos del 10% en Septiembre–mes 12).

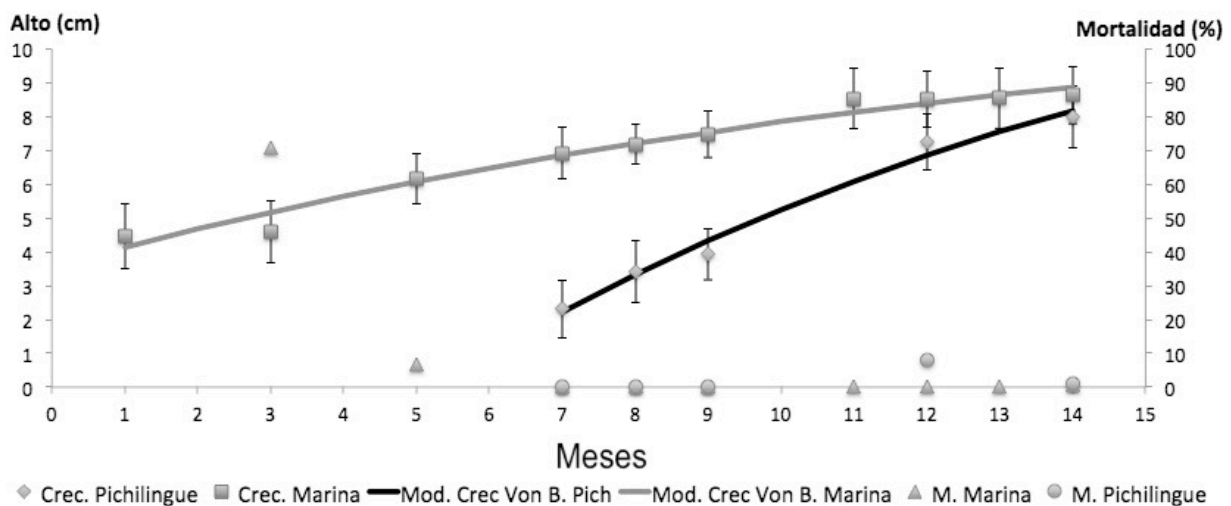


Figura 6.- Resultado de Mortalidad (%), Crecimiento en alto de la concha (cm) y Ajuste del crecimiento al modelo de Von Bertalanffy en la Marina La Paz y Pichilingue.

En la Figura 7 se muestra las células de tejido branquial que fueron contabilizadas en la técnica de MN: células con uno (e) y dos micronúcleos (d), además de aberraciones nucleares como: células con núcleo roto o fragmentado (a), células lobulada (b), y célula en forma arriñonada (c).

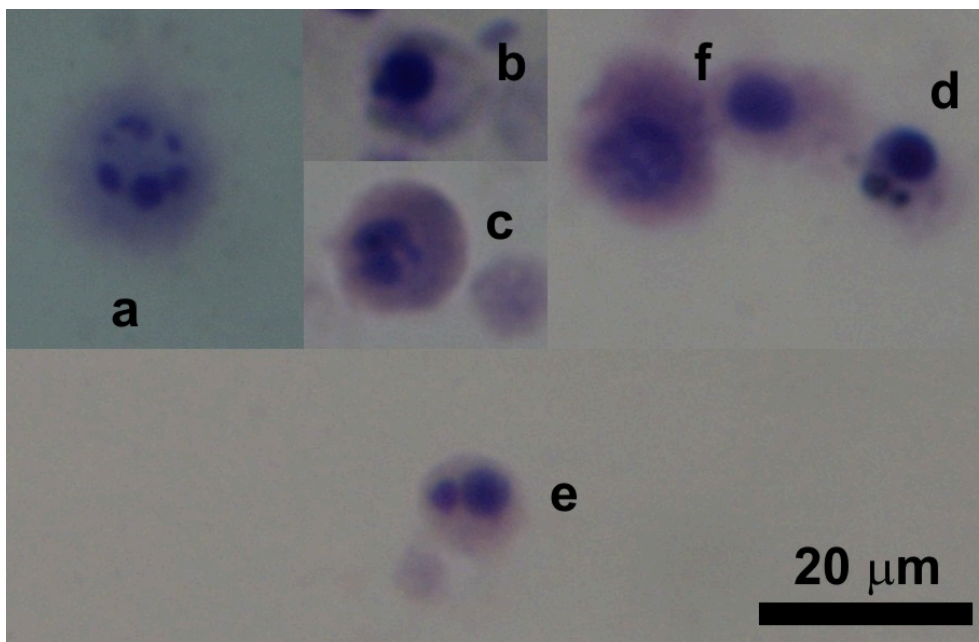


Figura 7.- Tipos de células contabilizadas con la técnica de MN: a.- Célula con el núcleo fragmentado, b.- Célula lobulada, c.- Célula arriñonada, d.- Célula con dos micronúcleos, e.- Célula con un micronúcleo y f.- células normales .

Los valores que se obtuvieron de la actividad de la enzima AchE, el grado de lipoperoxidación y la frecuencia de MN-aberraciones medidos en los tejidos de *P. sterna* (Concha nácar) en las localidades de la Marina La Paz y Pichilingue se pueden apreciar en la tabla IV.

Tabla IV.- Valores de los biomarcadores obtenidos en localidad de la Marina La Paz y Pichilingue, actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AchE) en $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$, lipoperoxidación en $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en $\%$. n es el número de individuos.

	n	Marina La Paz	n	Pichilingue
AchE	28	6.40 ± 2.00	28	8.66 ± 4.22
Lipoperoxidación	32	18.22 ± 8.08	28	17.66 ± 5.40
F. MN	26	0.007 ± 0.005	25	0.006 ± 0.004
F. Aberraciones	25	0.008 ± 0.004	25	0.006 ± 0.002

Nota: Los valores de los biomarcadores se reportan como la media \pm Desviación estándar.

En la tabla V se muestran la respuesta de los biomarcadores medidos en los tejidos de la concha nácar a la temporada de Diciembre de 2011, Julio y

Diciembre de 2012.

Tabla V.- Valores de los biomarcadores obtenidos por fecha de muestreo (Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012), actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$, lipoperoxidación en $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en ‰. n es el número de individuos.

	n	Dic-11	n	Jul-12	n	dic-12
AChE	21	5.36 ± 2.1	7	4.86 ± 0.39	28	9.82 ± 3.20
Lipoperoxidación	17	18.06 ± 6.74	14	11.47 ± 4.32	29	21.04 ± 5.92
F. MN	19	0.011 ± 0.005	6	0.008 ± 0.003	26	0.004 ± 0.002
F. Aberraciones	15	0.009 ± 0.005	6	0.007 ± 0.002	29	0.007 ± 0.002

Nota: Los valores de los biomarcadores se reportan como la media ± Desviación estándar.

La respuesta de los tres biomarcadores medidos en los tejidos de la concha nácar en las dos localidades (Marina La Paz y Pichilingue) y en la temporada (Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012) se encuentran en la tabla VI.

Tabla VI.- Valores de los tres biomarcadores obtenidos para cada localidad y fecha de muestreo. La actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) en $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$, lipoperoxidación (Lipox) en $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$, la frecuencia de MN y Aberraciones nucleares en ‰. n es el número de individuos.

	n	AChE	n	Lipox	n	MN	n	Aberraciones
Pichilingue Dic-11	11	5.62 ± 2.25	6	24.84 ± 5.84	10	0.001 ± 0.003	8	0.005 ± 0.001
Marina La Paz Dic-11	10	5.08 ± 2.00	11	14.36 ± 3.61	9	0.012 ± 0.006	7	0.013 ± 0.005
Pichilingue Jul-12	4	4.81 ± 0.54	7	13.51 ± 2.87	2	0.007 ± 0.005	3	0.007 ± 0.002
Marina La Paz Jul-12	3	4.92 ± 0.10	7	9.42 ± 4.73	4	0.009 ± 0.004	3	0.006 ± 0.003
Pichilingue Dic-12	13	12.41 ± 2.68	15	16.73 ± 3.00	13	0.004 ± 0.002	14	0.007 ± 0.002
Marina La Paz Dic-12	15	7.58 ± 1.40	14	25.66 ± 4.62	13	0.004 ± 0.002	15	0.007 ± 0.002

Nota: Los valores de los biomarcadores se reportan como la media ± Desviación estándar.

7.2.- Análisis de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

El análisis de varianza de 2 vías (ANOVA de dos vías, Localidad (dos) vs Temporada (tres) y sus interacciones) demostró diferencias estadísticamente significativas por localidad ($F_{1,56}=7.50$, $p<0.05$), siendo la localidad de Pichilingue donde se encontró la mayor actividad de la enzima con $8.66 \pm 4.22 \eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}$

$1 \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, mientras que en la Marina La Paz fue de $6.40 \pm 2.00 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$; por temporada se encontraron también diferencias significativas ($F_{2,56}=39.35$, $p<0.05$), la prueba *a posteriori* de Tukey para tamaños de muestra diferente indicó que la actividad de la enzima en Diciembre de 2012 fue estadísticamente mayor ($p<0.05$) ($9.82 \pm 3.2 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) a la actividad presentada en Diciembre de 2011 y Julio de 2012 ($5.36 \pm 2.1 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ y $4.86 \pm 0.39 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ respectivamente); en el caso de la interacción entre el sitio de muestreo y la temporada también se encontraron diferencias ($F_{2,56}=8.61$, $p<0.05$) Tabla VII).

Tabla VII.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de la actividad de AchE

	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	<i>p</i>
Temporada	317.01	2	158.50	39.35	$p<0.05$
Sitio	30.20	1	30.20	7.50	$p<0.05$
Interacción	69.38	2	34.69	8.61	$p<0.05$
Error	201.38	50	4.03		

En la figura 8 se muestran los grupos homogéneos que se formaron de la interacción entre los sitios y la temporada, La prueba *a posteriori* de Tukey para tamaños de muestra diferente, en donde los organismos de Pichilingue de Diciembre de 2012 (literal b) presentaron una actividad de la enzima AchE de $12.41 \pm 2.68 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ siendo estadísticamente la mayor ($p<0.05$) al resto de las actividades enzimáticas (literal a), las cuales se ubicaron entre 5 a 7 $\eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ aproximadamente.

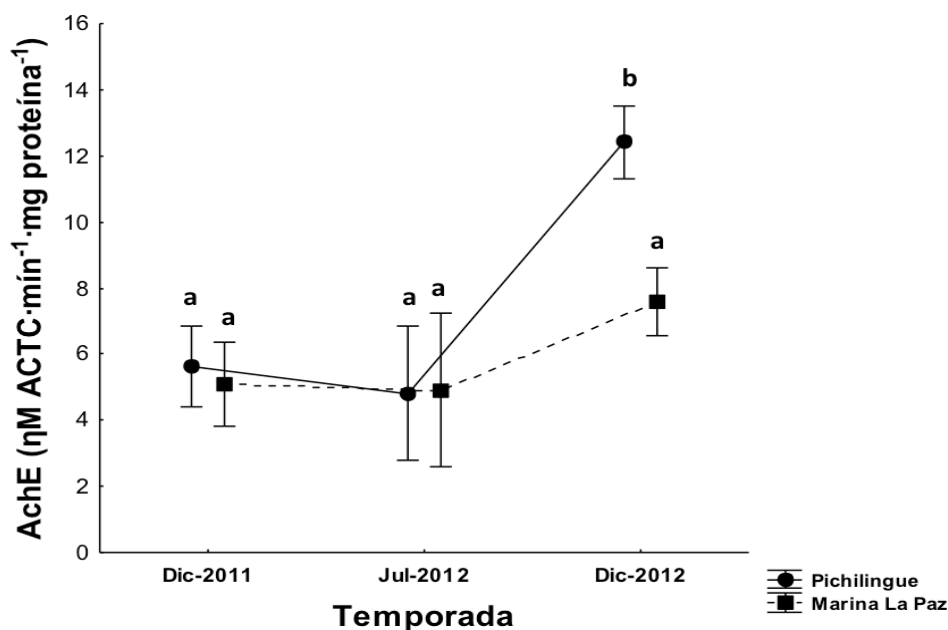


Figura 8.- Interacción de la actividad de la enzima AchE entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporadas de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.3.- Análisis del grado de Lipoperoxidación

Después de la aplicación del ANOVA de dos vías para las dos localidades y tres temporadas, no se encontraron diferencias estadísticas por sitio ($F_{1,60}=2.85$, $p > 0.05$); mientras que por la temporada se encontraron diferencias significativas ($F_{2,60}=28.03$, $p < 0.05$), la prueba *a posteriori* de Tukey para tamaños de muestra diferentes evidenció que en Julio de 2012 la concentración de MDA (11.47 ± 4.32 $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) fue estadísticamente inferior a Diciembre de 2011 (18.06 ± 6.74 $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) y a Diciembre de 2012 (21.04 ± 5.92 $\eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$); para el caso de la interacción el análisis indicó diferencias estadísticamente significativas ($F_{2,60}=32.15$, $p < 0.05$) (tabla VIII).

Tabla VIII.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de Lipoperoxidación.

	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	<i>p</i>
Temporada	921.34	2	460.67	28.03	<i>p</i> <0.05
Sitio	46.81	1	46.81	2.85	<i>p</i> >0.05
Interacción	1056.90	2	528.45	32.15	<i>p</i> <0.05
Error	887.53	54	16.44		

La prueba de Tukey para tamaños de muestras desiguales formó tres grupos homogéneos, el primer grupo (literal a) está formado por: los organismos de la Marina La Paz de Diciembre de 2011 ($14.36 \pm 3.61 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$), Marina de Julio de 2012 ($9.42 \pm 4.73 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) y de Pichilingue de Julio de 2012 ($13.51 \pm 2.87 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$); el segundo grupo (literal b) fue: Los organismos de la Marina de Diciembre de 2011 con los animales de Pichilingue de Julio y Diciembre de 2012 ($16.73 \pm 3.00 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$); el tercer grupo (literal c) fue: Los individuos de la Marina de Diciembre de 2012 ($25.66 \pm 4.62 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) y Pichilingue de Diciembre de 2011 ($24.84 \pm 5.84 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) (figura 9).

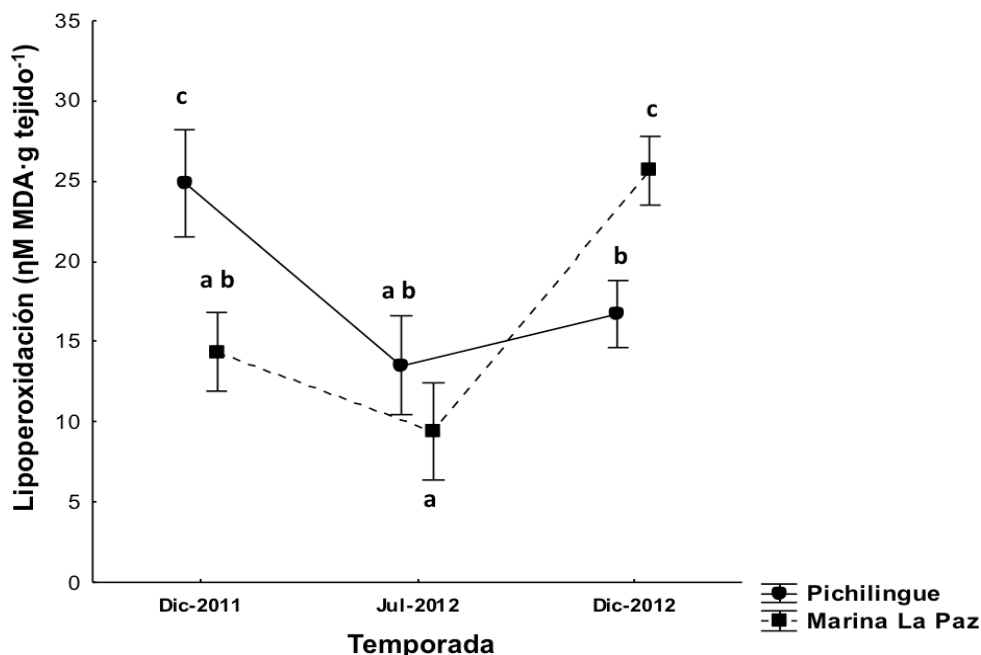


Figura 9.- Interacción del grado de la lipoperoxidación entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporadas de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.4.- Análisis de Frecuencia de aparición de MN

Los resultados de la aplicación del ANOVA de dos vías para los valores transformados (arcoseno) de la frecuencia de MN solo encontró diferencias significativas por la temporada ($F_{2,51}=24.71$, $p < 0.05$), no se encontraron diferencias por el sitio de muestreo ($F_{1,51}=0.45$, $p > 0.05$) ni por la interacción ($F_{2,51}=0.08$, $p > 0.05$) (tabla IX).

Tabla IX.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de las Frecuencias MN.

	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	p
Temporada	0.020	2	0.010	24.71	$p < 0.05$
Sitio	0.0001	1	0.00019	0.45	$p > 0.05$
Interacción	0.00006	2	0.00003	0.08	$p > 0.05$
Error	0.019	45	0.00041		

En la Figura 10 se muestra la prueba *a posteriori* de Tukey para tamaños de muestra diferente, altos valores de la frecuencia de MN se encontraron en Diciembre de 2011 (0.10 ± 0.024) y Julio de 2012 (0.09 ± 0.018) (grupo homogéneo con la literal b) siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Diciembre de 2012 (0.059 ± 0.016) (grupo homogéneo con la literal a).

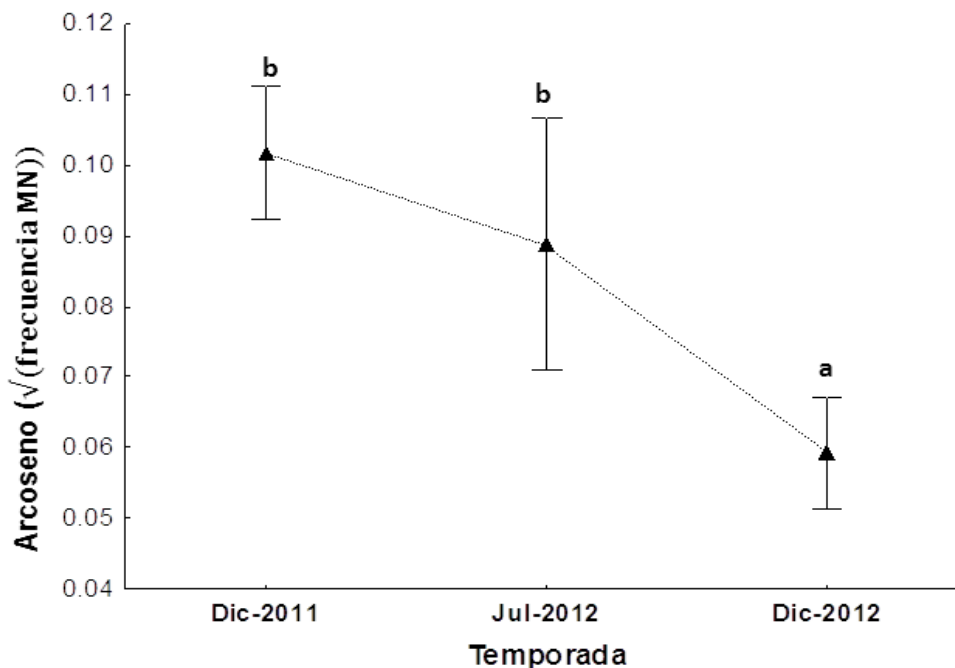


Figura 10.- Tendencia de los datos transformados de la frecuencia de MN por temporada. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.5.- Análisis de la Frecuencia de aparición de Aberraciones nucleares

Después de la aplicación del ANOVA de dos vías (tabla X) para dos localidades y tres temporada a los valores transformados de frecuencia de Aberraciones nucleares, se encontraron diferencias estadísticas por sitio ($F_{1,50}=4.74$, $p < 0.05$) siendo la localidad de la Marina La Paz donde se encontró la mayor frecuencia de aberraciones (0.090 ± 0.023), mientras que en Pichilingue fue de 0.078 ± 0.013 ; por la temporada no se encontraron diferencias significativas

($F_{2,50}=2.38$, $p>0.05$); para el caso de la interacción el análisis indicó diferencias estadísticamente significativas ($F_{2,50}=11.63$, $p<0.05$).

Tabla X.- ANOVA de dos vías para el biomarcador de Frecuencias de Aberraciones.

	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	F	p
Temporada	0.0011	2	0.00057	2.38	$P>0.05$
Sitio	0.0011	1	0.00113	4.74	$P<0.05$
Interacción	0.0056	2	0.00278	11.63	$P<0.05$
Error	0.0105	44	0.00023		

La prueba de Tukey para tamaños de muestras desiguales indicó dos grupos homogéneos, el primer grupo (literal a) está formado por: los organismos de Pichilingue de Diciembre de 2011 (0.07 ± 0.013) y organismos de Julio y Diciembre de 2012 con frecuencias que se encontraron entre 0.075 a 0.087 aproximadamente; el segundo grupo (literal b) se conformó por la frecuencia de los organismos de Pichilingue de Julio de 2012 (0.087 ± 0.011) y Marina La Paz de Diciembre de 2011 (0.11 ± 0.023), la interacción de los datos transformados de la frecuencia de aberraciones se muestra en la figura 11.

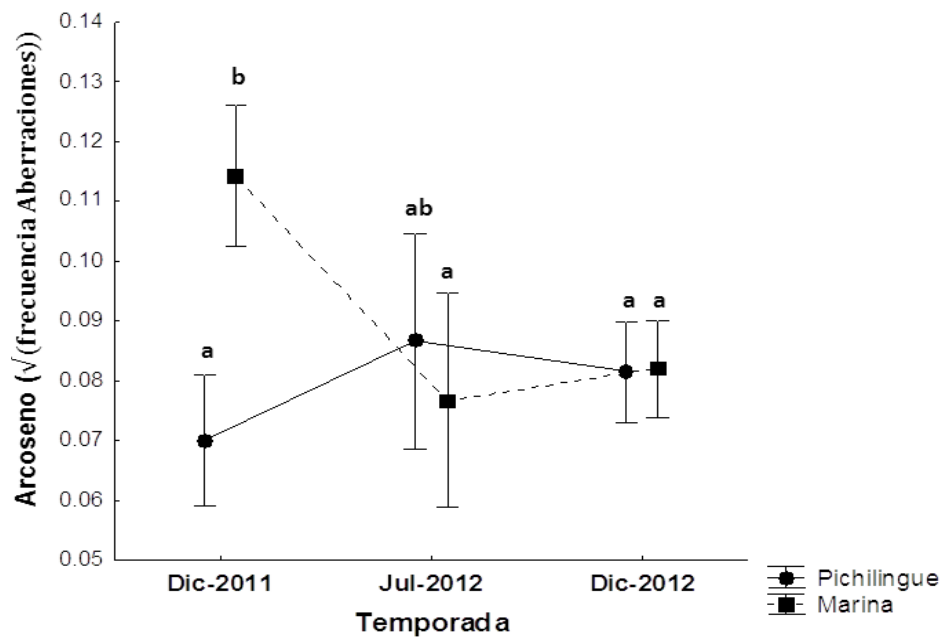


Figura 11.- Interacción de los datos transformados de la frecuencia de aberraciones entre los sitios de Pichilingue y Marina La Paz con las temporadas de Diciembre de 2011, Julio y Diciembre de 2012. Las Barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con el análisis de Tukey ($p < 0.05$).

VIII.- DISCUSIÓN

En lo que respecta al crecimiento, la variable del modelo de Von Bertalanffy que interesó fue k , parámetro de curvatura con la que un individuo alcanza la talla asintótica o tasa de crecimiento a la cual los organismos se desarrollaron en sus respectivas localidades; por lo que las ostras perleras de Pichilingue presentaron un crecimiento superior ($F_{3,9}=93.17$, $p<0.05$) con una $k = 0.094 \text{ cm}\cdot\text{mes}^{-1}$ en comparación con los animales que se sembraron en la Marina La Paz con una $k = 0.069 \text{ cm}\cdot\text{mes}^{-1}$. Estos valores sugieren que el crecimiento durante el estudio no estuvo condicionado por variables ajenas a la exposición de las dos zonas. Monteforte (2005) obtuvo una $k=0.0122 \text{ (cm}\cdot\text{t}^{-1})$, en el crecimiento de la concha nácar en la Bahía de La Paz durante un experimento realizado de Marzo de 1997 a Marzo de 1998, el crecimiento registrado fue inferior al observado durante el presente estudio, debido a factores de denso dependencia que afectaron su trabajo.

Las diferencias de crecimiento observadas entre los sitios de estudio Pichilingue y la Marina, probablemente encuentren explicación en el efecto de la turbidez y disposición de alimento. Estos factores afectan el crecimiento y la supervivencia de las ostras perleras (Abdussamad *et. al.*, 1998; Yukihiro *et. al.*, 1999), la turbidez depende de las partículas inorgánicas y las partículas orgánicas en suspensión. Por las observaciones que se realizaron los días de muestreo, la localidad de la Marina La Paz se presume que presentó mayor turbidez (cabe resaltar que no se midió la turbidez) que en Pichilingue debido a que en esta área el fondo está compuesto principalmente de sedimentos finos, asociados a una alta dinámica de resuspensión por la poca profundidad (las jaulas se ubicaron a 2 m aproximadamente por encima del fondo). Mientras que Pichilingue es una zona de surgencias de acuerdo con Murillo (1987) haciendo que la alta productividad primaria ofrezca alimento y ayude a favorecer un mejor crecimiento, las jaulas de cultivo se ubicaron aproximadamente a 15 m por encima del fondo marino, por lo que presencia de sedimentos a esa profundidad fue inferior, durante las

condiciones de turbidez.

Las mortalidades que se registraron en la Marina La Paz en Noviembre y Diciembre de 2011, probablemente fueron ocasionadas por la precipitación pluvial ya que la más importante de ese año se presentó en esas fechas, después de ese evento en la Marina La Paz al revisar los animales, se observó que hubo una gran suspensión de sedimento en la columna de agua, y los organismos estaban cubiertos del mismo, por lo que se presume que la mortalidad del cerca del 70% de los individuos se produjo por asfixia debido a la acción directa o indirecta de la suspensión del sedimento (Gosling, 2003). Después de este evento las muertes fueron inferiores al 7% en ambas localidades hasta el fin de éste estudio.

En la Cd. de La Paz, se generan agentes xenobióticos que pueden ser arrastrados desde la Ciudad hasta la Bahía, estos agentes, pueden sufrir procesos como transporte, movilización y transformación de sus formas tanto químicas y/o físicas, las que en consecuencia podrían ser incorporadas a las cadenas tróficas dependiendo de su biodisponibilidad (Allen & Hansen, 1996). Se esperaría que los biomarcadores registren en los individuos estudiados una situación de estrés por la acción de agentes xenobióticos cuando se presenta una importante precipitación pluvial y se produce acarreo de dichos agentes.

Con respecto a los análisis por localidad, la actividad de la enzima AchE y de la frecuencia de aberraciones nucleares indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en este factor, este análisis indicó que la localidad de la Marina La Paz presentó una inhibición de la actividad del 26% aproximadamente ($6.40 \pm 2.00 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) en comparación con Pichilingue ($8.66 \pm 4.22 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$), la inhibición de la actividad mostró una afectación en esta localidad, mientras que la frecuencia de aberraciones indicó que la Marina La Paz (0.09 ± 0.023) presentó la mayor concentración de aberraciones nucleares siendo 13.34% mayor que en Pichilingue (0.078 ± 0.013).

Con lo obtenido en estos análisis podemos mencionar que la localidad de la Marina La Paz presentó una “situación adversa” para los individuos cultivados, como lo revelaron los resultados del análisis estadístico.

En el caso del análisis del factor de la temporada tres biomarcadores mostraron diferencias significativas Actividad de AchE, Lipoperoxidación y Frecuencia de MN; la actividad de la enzima AchE, de Diciembre de 2011 a Julio de 2012 indicó una inhibición de aproximadamente el 50% en comparación con el muestreo de Diciembre de 2012 donde se obtuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad. En el caso de la lipoperoxidación, en Julio de 2012 la concentración de MDA ($11.47 \pm 4.32 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) fue estadísticamente inferior ($p < 0.05$) a la medida en Diciembre de 2011 ($18.06 \pm 6.74 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$) y en Diciembre de 2012 ($21.04 \pm 5.92 \text{ } \eta\text{M MDA}\cdot\text{g tejido}^{-1}$). Finalmente la frecuencia de MN presentó altos valores en Diciembre de 2011 (0.10 ± 0.024) y Julio de 2012 (0.09 ± 0.018) siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) a Diciembre de 2012 (0.059 ± 0.016).

Para la actividad de la enzima y los datos transformados de la frecuencia de MN, las afectaciones encontradas se relacionaron con la talla de los organismos, (Fossi-Tankoua *et. al.*, 2011) ya que en Diciembre de 2011 los organismos tuvieron una talla aproximadamente de 4 cm en el alto de la concha (AC) y un tiempo de exposición en el caso de los animales de la Marina de 2 meses y en Pichilingue de 4 meses, además de que en Noviembre se registró una precipitación de 31.1 mm siendo la más importante de ese año (CONAGUA, 2012); en este primer muestreo los biomarcadores ya mostraban afectaciones con una baja actividad de la enzima AchE y altos valores de la frecuencia de MN; para Julio de 2012 los organismos presentaron una talla de 7.5 cm en AC aproximadamente y un tiempo de exposición en la Marina La Paz de 9 meses y en Pichilingue de 11 meses, a pesar de que en esta fecha de muestreo no se presentaron precipitaciones pluviales (CONAGUA, 2012) estos biomarcadores continuaron mostrando afectaciones; en Diciembre de 2012 los organismos ya tenían una talla de entre 8.5 cm en AC aproximadamente y un tiempo de 14 meses en la Marina y 16 meses en Pichilingue, a pesar del tiempo de exposición en las localidades y de la presencia de precipitaciones pluviales (Agosto a Octubre de 2012; 110.2, 114.9 y 26.9 mm respectivamente de acuerdo con CONAGUA,

2012), estos dos biomarcadores mostraron mejoras, por lo que podemos inferir que la actividad de la enzima AchE y los datos transformados de la frecuencia de MN fueron sensibles a la edad de los organismos (talla) (de entre 2 a 7.5 cm en AC); mientras que en el caso del grado de la lipoperoxidación, esta se relacionó con el registro de la precipitación pluvial en la Cd. de La Paz y no con la talla de los animales, ya que los valores que se registraron de lipoperoxidación en la temporada de Diciembre de 2011 y 2012 (temporada de lluvias) fueron de mayor magnitud ($p < 0.05$) que los valores que se obtuvieron en Julio de 2012 (temporada de estiaje), evidenciando alteraciones relacionadas con el acarreo de agentes tóxicos debido los arrastres pluviales que se presentaron durante el estudio.

Para explicar el grado de interacciones entre las dos localidades y las tres temporadas es necesario hacer un recuento de los resultados en donde se encontró que los biomarcadores que indicaron diferencias fueron: la actividad de la enzima AchE, donde la mayor actividad de esta enzima se registró en los organismos que se muestrearon en Pichilingue en Diciembre de 2012 ($12.41 \pm 2.68 \text{ } \eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) siendo estadísticamente la mayor ($p < 0.05$) al resto de las actividades enzimáticas, las cuales se ubicaron entre 5 a 7 $\eta\text{M ACTC} \cdot \text{mín}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ aproximadamente, todos estos muestreos presentaron una inhibición de la enzima AchE de entre el 45 al 60% en comparación con los organismos de Pichilingue de Diciembre de 2012. En el caso de la lipoperoxidación, inicialmente la mayor concentración de MDA se encontró en los organismos de Pichilingue de Diciembre de 2011 ($24.84 \pm 5.84 \text{ } \eta\text{M MDA} \cdot \text{g tejido}^{-1}$) en comparación con los organismos de la Marina La Paz de esa misma fecha ($14.36 \pm 3.61 \text{ } \eta\text{M MDA} \cdot \text{g tejido}^{-1}$), en Julio de 2012 no se presentaron diferencias encontrándose una concentración de MDA entre 9 y 13 $\eta\text{M MDA} \cdot \text{g tejido}^{-1}$ aproximadamente, y finalmente para Diciembre de 2012 la mayor concentración de MDA se encontró en los organismos de la Marina ($25.66 \pm 4.61 \text{ } \eta\text{M MDA} \cdot \text{g tejido}^{-1}$) en comparación de los individuos de Pichilingue de esa misma fecha ($16.73 \pm 0.77 \text{ } \eta\text{M MDA} \cdot \text{g tejido}^{-1}$). El análisis de los datos transformados de la frecuencia de aberraciones nucleares mostró que los organismos de Pichilingue se

encontraron con una frecuencia de entre 0.07 a 0.087 durante todo el estudio, mientras que en la Marina La Paz la mayor frecuencia fue en Diciembre de 2011 (0.11 ± 0.023) siendo la mayor frecuencia de aberraciones registrada durante todo el estudio y de las dos localidades (alrededor de 23% mayor a del resto de los muestreos).

Estos resultados de interacciones entre los sitios de muestreos y las temporadas nos permiten confirmar que la inhibición de la actividad de la enzima AchE y el grado de lipoperoxidación en Pichilingue estuvo asociada a la edad de los organismos (talla); mientras que en la Marina La Paz la inhibición de la actividad enzimática y la frecuencia de aberraciones se pudo deber a la talla y a que en esta localidad se recibe mayor presión antrópica, como lo confirma la tendencia de concentración del MDA registrada en los organismos en este sitio como respuesta ante el acarreo de sustancias toxicas de la Cd. de La Paz que ocurrió cuando se presentó el escurrimiento pluvial, situación que confirma a la localidad de Marina La Paz como una zona no apropiada para el desarrollo de *P. sterna*.

Beyersmann y Hartwig (2008) han mostrado como los Iones de metales como: Cr, Co, Ni, V y otros son capaces de llevar a cabo reacciones Redox en sistemas biológicos, demostrando que inducen la formación de especies reactivas de Oxígeno y Nitrógeno *in vivo* e *in vitro* en células de mamíferos, causando daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN.

En diversos puntos de la Bahía de La Paz incluso en zonas aparentemente prístinas se han encontrado metales pesados (Pb, Cd, Cr, Cu, Zn y Mn) en los tejidos de *Megapitaria squalida* (Méndez *et. al.* 2006). Estudios posteriores en la misma localidad, sobre los efectos ocasionados por estos metales en *M. squalida*; fueron realizados midiendo el grado de lipoperoxidación, la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa. Los tres biomarcadores indicaron afectación en la especie debido a la presencia de los metales pesados Cadmio Plomo y Fierro contenidos en el agua de la Bahía de La Paz (Cantú-Medellin *et. al.* 2009).

Esta situación se presenta en la localidad de Marina de La Paz ya que Sobrino-Figueroa y Cáceres-Martínez (2011) reportan también la presencia de HAP's y metales pesados; Cu, Co, Pb y Mn, en sedimentos de cuatro sitios de la Bahía de La Paz, confirmando que la localidad Marina de La Paz recibe mayor presión antrópica que Pichilingue (Tabla XI apéndice 2), razón que puede explicar los resultados observados en los tres biomarcadores estudiados en este trabajo.

En lo que respecta con la actividad de AchE existen varios trabajos donde evalúan el impacto de la presión antrópica en ambientes marinos y con diferentes organismos, como por ejemplo, Tsangaris *et. al.* (2007), evaluaron el daño neurotóxico midiendo la actividad de la enzima AchE en el musculo aductor de *Mytilus galloprovincialis* en la Bahía de Larymna (zona de alta presión antrópica) y en Agios kosma (zona de buenas condiciones ambientales), en Grecia; en Larymna se colectaron animales nativos y se trasplantaron mejillones a la localidad menos impactada por uno y seis meses; los animales nativos fueron los únicos que presentaron la menor actividad de AchE y fue significativamente diferente ($p < 0.05$) con los animales de Agios Kosma, indicando un efecto crónico de inhibición en los animales nativos de esa localidad, debido a la presión antrópica. Confirmando que la medición de la actividad de AchE es un buen indicador de condiciones de estrés, a pesar de que en experimentos de laboratorio utilizando diferentes concentraciones y mezclas de metales pesados para estudiar su efecto sobre la actividad de AchE, no encontraron efectos significativos de los metales en la expresión enzimática, indicando que existen otros factores como la temperatura, salinidad, alimento, edad, estado de maduración sexual o la interacción con otros compuestos químicos en el ambiente que no están siendo considerados en el laboratorio y que pueden estar potencializado el efecto negativo de los metales mencionados en la actividad de esta enzima en ambientes naturales (Tsangaris *et. al.* 2007; Bocchetti *et. al.* 2008).

Rank *et. al.* (2007) midió la actividad de la enzima anterior en *M. edulis* colocando animales por 29 y 64 días de exposición en una zona con fuerte influencia antrópica, encontró que la actividad de AchE indicó condiciones de

estrés después de 29 días de exposición, mientras que en organismos nativos se presentaron actividades superiores de AchE, indicando diferencias significativas ($p < 0.05$); la disminución de la actividad enzimática en los mejillones que se trasplantaron en comparación con la mostrada por los organismos nativos de los sitios de muestreo se atribuyen al grado de contaminación de las localidades y a las artes de cultivo utilizadas sin influencia de factores ambientales, ni tampoco el grado de maduración o talla de crecimiento de los organismos; estos autores encontraron una clara disminución en la concentración de proteínas en los tejidos de las branquias en los organismos, indicando una situación de estrés, similar a la observada en este estudio en la localidad de Marina La Paz.

Boldina-Cosqueric *et. al.* (2010) realizaron un estudio de la calidad de los sedimentos en tres estuarios de Francia midiendo la actividad de AchE en *Scrobicularia plana*, la actividad de la enzima AchE fue disminuyendo en los organismos de los estuarios más contaminados; la inhibición de esta enzima se relacionó con la presencia de pesticidas organofosforados y carbamatados así como con afectaciones en la conducta de la especie estudiada. La baja actividad de AchE en los organismos de los estuarios estudiados fue atribuible a la alta presión antrópica que se ejerce en ellos, por la presencia de asentamientos humanos y actividad agrícola en las riberas de los estuarios y actividades marítimas.

Las evidencias de estrés por presión antrópica impactando la actividad de la AchE, son múltiples de esta manera, Risso-de Faverney *et. al.* (2010) evaluaron los efectos tóxicos de un arrecife artificial de neumáticos después de haber trasplantado y mantenido durante seis semanas *M. galloprovincialis*, en dichas condiciones; los mejillones trasplantados en el arrecife presentaron las mayores mortalidades, las respuestas en los tejidos de mejillón indicaron que los organismos significativamente más afectados ($p < 0.05$) fueron los que se encontraron el arrecife de neumáticos.

En relación a la disminución de la actividad de AchE por desechos agrícolas Bernal-Hernández *et. al.* (2010) realizaron un estudio con *Crassostrea corteziensis*

en el estuario de la Boca de Camichin, en Nayarit México, donde midieron la actividad de la enzima AchE en tejido branquial y encontraron que en todos los sitios de muestreos la actividad de la enzima fue significativamente disminuida en relación con sus organismos control, la disminución de la actividad enzimática se relacionó con la presencia de una importante actividad agrícola donde hay contenido importante de pesticidas organofosforados principalmente.

La actividad de la enzima AchE en *Pteria sterna*, fue reportada por Sobrino-Figueroa y Cáceres-Martínez (2012), para organismos de 2 cm en el alto de la concha, medida en dos periodos; invierno y verano para los que no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en su expresión (15.28 ± 2.8 y 11.1 ± 3.1 $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$), para organismos provenientes de la localidad de Pichilingue, estos valores son superiores a los medidos en este trabajo indicando que no hubo procesos de inhibición en los organismos colectados en Diciembre de 2011 y Julio de 2012, probablemente por la naturaleza de la localidad, en donde la presión antrópica es reducida.

Como se indica en los resultados la actividad de AchE no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) en los primeros nueve meses del experimento (Diciembre de 2011 a Julio de 2012) sin embargo, en Diciembre de 2012 se encontraron diferencias importantes ($p<0.05$) un incremento de la actividad hasta 12.41 ± 2.68 $\eta\text{M ACTC}\cdot\text{mín}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$, fue registrado. Si analizamos estos resultados considerando la edad de los organismos (talla) podemos proponer que la actividad de enzima AchE fue sensible a la edad de los mismos ya que entre 2 a 7.5 cm AC (tallas de los organismos de Diciembre de 2011 y Julio de 2012) la actividad fue baja (inhibición) en comparación con las tallas de 8.5 cm AC (Diciembre de 2012) cuando la actividad fue superior. Este biomarcador indicó que en la localidad de Marina La Paz se ejerció una mayor presión (disminución de la actividad de AchE) en comparación con el sitio de Pichilingue.

El grado de lipoperoxidación ha sido documentado para moluscos bivalvos, demostrando que valores altos se ligan a la presencia de radicales libres producidos por metales pesados y pesticidas, Gerent *et. al.* (2003). Giarratano *et.*

al. (2010) estudiando *Mytilus edulis chilensis* encontraron un incremento en la lipoperoxidación en tejidos de bránquia, manto y glándula digestiva después de dos semanas por efecto de la presión antrópica (Desechos urbanos e industriales). A pesar de los trabajos anteriores Risso-de Faverney *et. al.* (2010) en un estudio con *M. galloprovincialis* muestran que la lipoperoxidación puede ser un índice ligado a la contaminación pero también a condiciones fisiológicas..

Sobrino-Figueroa y Cáceres-Martínez (2012), evaluaron la lipoperoxidación en *P. sterna* cultivada en Pichilingue en temporada de invierno y verano, no encontraron diferencias significativas ($p>0.05$), la lipoperoxidación fue de 6.6 ± 4.5 y 6.06 ± 3.6 ηM de MDA·mg proteína⁻¹ respectivamente. Estos resultados aparecen como inferiores en comparación con los obtenidos en este estudio, primero por que están reportados en unidades de proteína y en nuestro estudio se reportan en unidades de tejido, sin embargo, una explicación a esta diferencia se puede encontrar en que los organismos colectados en el estudio de estos investigadores presentaban una talla promedio de 2 cm de alto de la concha, es decir, juveniles que tenían una edad no mayor a cuatro meses.

Los valores registrados para la lipoperoxidación en este trabajo están relacionados con el arrastre de desechos producido por la precipitación pluvial en la Cd. de La Paz en los organismos de la Marina La Paz y con la talla de los animales en Pichilingue.

En el caso del daño genético, Scarpato *et. al.* (1990) realizaron ensayos con la especie *Anodonta cygnea* expuesta a concentraciones de mitomicina C (MMC) a 10^{-8} y 10^{-7} M (sustancia genotóxica), obteniendo un incremento inmediato de la frecuencia de MN en las dos primeras semanas de exposición. Izquierdo *et. al.* (2003) llevaron acabo un estudio del efecto de la contaminación costera en España producida por descargas de aguas industriales, urbanas, midiendo la frecuencia de aparición MN en *Mytilus galloprovincialis*, encontrando que a menor distancia del efluente la frecuencia de MN en tejido branquial y de núcleos anormales incrementan su frecuencia. En México, Márquez (2005) llevó acabo un estudio con *Mytilus californianus* reportando frecuencias de MN en tejido branquial

en las costas del Pacífico de Baja California, encontrando un incremento en la aparición de anomalías a zonas de alta presión antrópica por actividades agrícolas y presencia de desechos doméstico e industriales.

A pesar de los resultados reportados por los autores citados Taleb *et. al.* (2007) recomiendan para este biomarcador realizar estudios de expresión de MN en relación al crecimiento, madurez sexual y parámetros ambientales en zonas prístinas ya que de sus resultados comparativos en la costa oeste de Algeria usando a *M. galloprovincialis*, en la Bahía de Oran (zona con alta presión antrópica con descargas de aguas urbanas e industriales, altas concentraciones de Metales pesados y HAP's) y en Maârouf (zona rural). Encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de MN en hemolinfa pero no en tejido branquial. Otros autores han mostrado también que la frecuencia de micronúcleos en tejido branquial de *Mytilus edulis*, y *M. galloprovincialis* aumentan ligados a presencia de desechos urbanos, industriales y agrícolas, indicando que la frecuencia de aparición de estas anomalías nucleares pueden disminuir si los individuos son alejados de los sitios contaminados, o colocados en áreas prístinas (Bocchetti *et. al.* 2008; Machado-Schiaffino *et. al.* 2009).

La frecuencia de MN en este estudio, fue sensible a la temporada del año (talla de los animales) los valores de Micronúcleos presentaron altos valores en Diciembre de 2011 (0.10 ± 0.005) y Julio de 2012 (0.09 ± 0.007) cuando los individuos tuvieron de 2 a 7.5 cm AC estos valores fueron estadísticamente superiores ($p < 0.05$) a aquellos encontrados en Diciembre de 2012 (0.059 ± 0.003) cuando los organismos tuvieron 8.5 cm AC, esta situación puede encontrar una explicación en la sensibilidad de la especie que puede ser más susceptible de daño en tallas menores en comparación con organismos mayores.

La frecuencias de las aberraciones nucleares evidenciaron que en la Marina La Paz los individuos fueron más afectados que en Pichilingue ($p < 0.05$), esto puede observarse con claridad en la mayor frecuencia de aberraciones encontrada en los organismos de la Marina La Paz en Diciembre de 2011, que fue aproximadamente 23% mayor al resto de los muestreos de esa localidad y del sitio

de Pichilingue.

El estudio de los tres biomarcadores permite confirmar que la localidad de Marina de La Paz es una zona de alta presión para la especie *P. sterna*, ya que se produce una inhibición de la enzima AchE, se presenta un grado de lipoperoxidación y se constató daño genético. Esta claro que es necesario realizar otros estudios complementarios para que la interacción de factores bióticos y abióticos sean deslindados de responsabilidad para los resultados de este estudio como lo mencionan OIT (1998) y Peña *et. al.* (2001), ya que es necesario estudiar el proceso de reproducción y evolución de diferentes factores ambientales en las localidades estudiadas. El sitio denominado Pichilingue aparece como adecuado para el cultivo de la especie *P. sterna*, en donde los biomarcadores indican solamente que la lipoperoxidación y la actividad de la encima AchE se manifiesta cuando los organismos en cultivo inician el proceso de crecimiento, posteriormente los valores de este biomarcador no indican ninguna afectación.

El estado de salud de la especie *P. sterna* puede ser monitoreado con seguridad siguiendo la expresión de los tres biomarcadores estudiados. Los mismos han demostrado en este estudio que tienen la sensibilidad suficiente para detectar presiones ambientales que puedan producir un deterioro o una afectación negativa a las actividades del cultivo de esta especie.

Estos resultados permiten asegurar que el uso de los tres biomarcadores en la concha nácar generan una alerta temprana ante perturbaciones antrópicas que no solo tienen consecuencias sobre la supervivencia de la especie sino también sobre la seguridad del ambiente biológico para la población de la Cd. de La Paz. en consecuencia se recomienda ampliamente el uso de esta especie como un organismo centinela, así como la medición sistemática de estos tres biomarcadores para generar información permita medir el grado de deterioro del ambiente por las actividades antrópicas.

IX.- CONCLUSIONES

- Los tres biomarcadores mostraron ser efectivos para el monitoreo del estado de salud de *P. sterna*.
- De los tres biomarcadores, la técnica de MN presenta ventajas como: ser una técnica más económica, es fácil de montar y los resultados se obtienen en poco tiempo, dependiendo del número de muestras y el personal que se tenga disponible.
- Los biomarcadores indicaron que la localidad de la Marina La Paz por su alta presión antrópica ejerce mayor afectación en la respuesta de los tres biomarcadores estudiados en comparación con el sitio Pichilingue en la especie estudiada.
- En Pichilingue el factor que fue sensible a la respuesta de los biomarcadores fue la edad de los organismos (talla); los organismos juveniles fueron más sensibles.
- En la Marina La Paz, el factor que fue sensible a la respuesta de los biomarcadores fue la temporada de lluvia-estiaje (precipitación pluvial) y la edad de los organismos, los organismos juveniles fueron más sensibles.
- Por las características de ser un organismo sésil, filtrador y ubicarse en el fondo marino *P. sterna* puede ser utilizado como organismo centinela. Esto puede traer un beneficio a los acuacultores que se dedican al cultivo de esta especie, ya que si se realizaran programas de monitoreo permanentes ellos pueden obtener alertas tempranas ante sucesos adversos para la supervivencia de la especie.
- Por otro esta especie siempre se encuentran disponible en la Bahía por su cultivo permanente, de tal forma que puede ser esta una fuente de muestras para un programa continuo de monitoreo ambiental.

X.- RECOMENDACIONES

- Dado que la temporada de lluvia aparece como un momento sensible para que el ambiente marino sea impactado antrópicamente, se recomienda realizar el seguimiento de alguno de estos biomarcadores en *P. sterna* para indicar el grado de alteración (contaminación) en localidades de interés.
- Se recomienda en futuros trabajos con esta especie, estudiar la relación de factores abióticos y bióticos con los biomarcadores estudiados.
- Se recomienda la medición de otros biomarcadores en la especie y su comparación con los resultados obtenidos en este trabajo a fin de seleccionar la batería de biomarcadores que puedan indicar tempranamente alteraciones resultantes de la presión antrópica.

XI.-APÉNDICE

11.1.- Apéndice 1.- Función de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) durante la transmisión del impulso nervioso

Durante la transmisión del impulso nervioso, se realiza una reacción colinérgica en el sistema nervioso autónomo. La mayor parte de la acetilcolina (ACH) es sintetizada en el citoplasma a partir de la colina y la acetilcoenzima A (acetilCoA) mediante la acción catalítica de la enzima colina acetiltransferasa. La AcetilCoA es sintetizada en las mitocondrias, las cuales se encuentran en gran número en las terminaciones nerviosas. La Colina es transportada mediante un mecanismo de membrana desde el líquido extracelular hasta la terminal de la neurona.

La liberación del neurotransmisor ocurre cuando un potencial de acción llega a la terminal y desencadena la entrada de suficientes iones Ca^{+2} . Se cree que el aumento en la concentración de Ca^{+2} desestabiliza las vesículas de almacenamiento. Luego ocurre la fusión de las membranas vesiculares con la membrana terminal, dando lugar a la expulsión exocítica de moléculas de ACH y de cotransmisor hacia la hendidura sináptica (Katzung, 1991).

Después de ser liberadas por la terminal presináptica, las moléculas de ACH pueden unirse a un receptor colinérgico (colinoceptor) y ser activado. Generalmente con mucha rapidez, toda la ACH liberada se difunde hasta llegar al alcance de una molécula de acetilcolinesterasa (AChE), la cual degrada de manera eficaz a la ACH produciendo Colina y Acetato, y con ello termina la acción del transmisor (Fukuto, 1990; Katzung, 1991).

La enzima colinesterasa posee en su estructura proteica, una parte responsable de la actividad catalítica, denominada sitio activo que consta de dos subsitios. Cada uno juega un papel importante para explicar la afinidad por sustratos catiónicos y por sus inhibidores, sobre todo para compuestos que poseen un átomo de nitrógeno cargado positivamente unido a grupos metilo y etilo. Se ha postulado la combinación de estos sustratos a la enzima en los dos subsitios distintos en el centro activo. El primero de ellos, el lugar aniónico, es una

región de la superficie de la molécula cargada negativamente, que se combina con la carga positiva del átomo de nitrógeno cuaternario del sustrato mediante una interacción principalmente hidrofóbica. El segundo sitio esteárico parece combinarse con el grupo carboxílico del enlace éster y es el responsable de la afinidad y la hidrólisis del sustrato.

La hidrólisis de la ACH en el centro esteárico se produce por la intervención de dos restos de aminoácidos la Histidina y Serina. En reposo el OH de la Serina establece un enlace con el N imidazólico de la Histidina, con desplazamiento del protón de Ser a His y se postula la participación de un residuo de Aspartato, constituyendo una triada catalítica. Así es posible la formación de un puente de hidrógeno desde el N de la His al O insaturado de la ACH. Lentamente el O alcohólico de la Serina realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace acilo Oxígeno de la ACH, originando la hidrólisis y esterificación de la Serina (acetilación). Posteriormente la hidrólisis del nuevo éster regeneraría la enzima (desacetilación) (Metcalf, 1971. Fukuto, 1990).

De manera similar para la actividad anticolinesterásica, parece que los carbamatos requieren de un grado de semejanza estructural con la ACH, por lo que estos compuestos compiten fuertemente con ella por los sitios reactivos en la AchE (Metcalf, 1971). La estabilidad del complejo enzima-inhibidor, depende de la complementariedad del plaguicida con el sitio blanco. Los carbamatos que tienen menor complementariedad con el sitio activo, pueden removerse más fácilmente, dando lugar a la reactivación de las AchE. Si estos complejos no se disocian desde el sitio activo, un ataque nucleofílico del grupo éster (localizado en el sitio esterático en la enzima) o en el grupo carbonilo de la molécula de carbamato puede ocurrir, obteniéndose una enzima carbamilada estable y un grupo saliente (Kallander *et. al.*, 1997).

11.3.-Apéndice 2

Tabla XI.- Concentración de Metales Pesados en sedimento de la localidad de la Marina y Pichilingue. Tomado de Sobrino-Figueroa & Cáceres-Martínez (2011).

	La Marina	Pichilingue
	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Co	42	29
Cr	85	7
Cu	73*	15
Mn	45	31
Ni	13	9
Pb	19	10
V	31	54
Zn	81	23
HAP's	0.3	0.3

*Efectos biológicos ERL (effects range low) Long *et al.*, 1995. Cr = $52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Cu = $18.7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Pb = $30.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Ni = $15.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, Zn = $124 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, HAP's = $4.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

XI.- LIETERATURA

- Abdussamad, E. M., K. R. Somayajulu & P. Achayya. 1998. Grow and Survival of the indian pearl oyster (*Pinctada fucata*) in Kakinada Bay. Central Marine Fisheries Research Institute Cochin. Pp. 3.
- Allen, H. & D. Hansen. 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research*. 68 (1): 215-231.
- Barnes, R. 1985. Zoología de los invertebrados. Ed. interamericana. México. Pp. 761.
- Bayne, B.L., B. Clarke. & M.N. Moore. 1981. Some practical considerations in the measurement of pollution effects in bivalve molluscs and some possible ecological consequences. *Aquatic Toxicol.* 1:159-174.
- Bernal-Hernández, Y. Y., I. M Medina-Díaz, M. L. Robledo-Marengo, J. B. Velázquez-Fernández, M. I. Girón-Pérez, L. Ortega-Cervantes, W. A. Maldonado-Vázquez, & A. E. Rojas-García. 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecoyotoxicology*. Pp. 7.
- Beyersmann, D., & A. Hartwig. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular & cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 82:493-512.
- Bocchetti, R., C. Lamberti, B. Pisanelli, E. M. Razzetti, C. Maggi, B. Catalano, G. Sesta, G. Martuccio, M. Gabellini, & F. Regoli. 2008. Seasonal Variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research*. 66:24-26.
- Boldina-Cosqueric, I., J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, O. Dedourge-Geffard, I. Métais, C. Mouneyrac, B. Moutel, & B. Berthet. 2010. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73:1733-1741.
- Buege, J. A. & S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.*, 52: 302-310.

- Cantú-Medellín, N., N. O. Olguín-Monroy, L. C. Méndez-Rodríguez & T. Zenteno-Savín. 2009. Antioxidant Enzymes and Heavy Metal Levels in Tissues of the Black Chocolate Clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol.* 56:60–66.
- Castro, B. B., I O. Sobra & L. Guilhermino. 2004. An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology.* 13:667–81.
- CONAGUA. 2012. Dirección Local en La Paz, Baja California Sur, Observatorio Meteorológico.
- Chen, Y., A. Jackson & H. H. Harvey. 1992. A comparison of Von Bertalanffy and Polimomial Functions in Modelling fish Growth Data. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 49:1228-1235.
- Dailianis, S., G. P. Domouhtsidou, E. Raftopoulou, M. Kaloyianni. M. & V. K. Dimitriadis. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test. Acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Reserach.* 56:443-470.
- Ellman G. L., K. D. Courtney, J. V. Andres & R. M Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-90.
- Stefano, B., I. Corsi & S. Focardi. 2008. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. *Science f the total environment.* 392:99-109.
- Fisher, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter & V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies, para los fines de la pesca. Pacífico- Centro Oriental. Plantas e Invertebrados. Roma, FAO. I: I-646 pp.
- Fossi-Tankou, O., B. Pierre-Emmanuel, A. Jean-Claude, C. Amiard-Triquet, C. Mouneyrac & B. Berthet. 2011. Potencial influence of confounding factors

- (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobiculario plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18:1253-1263.
- Fukuto, T. R. 1990. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environmental Health Perspective.* 87:245-254.
- García-Domínguez, F. A. 2002. Estrategias reproductivas de bivalvos marinos en el noroeste mexicano. Tesis de doctorado. Universidad de Colima, Colima, México. 119 pp.
- García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). México, 252 p.
- Geret, F. A. Serafim. & M. Joao-Bebiano. 2003. Antioxidant Enzyme Activities, Metallothioneins and Lipid Peroxidacion as Biomarkers in *Ruditapes decussatus*?. *Ecotoxicology.* 12:417-426.
- Giarratano, E., C. A. Duarte & O. A. Amin. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 73:270-279.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscos Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books. Massachusetts. 455 p.
- Gravato, C. & L. Guilhermino. 2009. Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal.* 15 (1):121-137.
- Henao, S. & G. Corey. 1991. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Metepec, México: Environmental Careers Organization, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Serie Vigilancia No. 11.
- INEGI. 2010. Anuario de estadísticas por entidad federativa. Instituto Nacional y Geografía. México. 600 p.
- Izquierdo, J. I., G. Machado, F. Ayllon, V. L. d'Amico, L. O. Bala, E. Vallarino, R. Elias & E. Garcia-Vazquez. 2003. Assessing Pollution in Coastal

- ecosistemas: a Preliminary Survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55: 24-29.
- Kallander, D. B., S. W. Fisher, & M. J. Lydy. 1997. Recovery following pulsed exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the midge, *Chironomus riparius*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 33:39-33.
- Katzung, B. G. 1991. Fármacos con acción en el sistema nervioso autónomo: Introducción. En farmacología básica y clínica 11a. Edición Mc Graw Hill. México. 77-93 p.
- Keen, M. 1971. Seashells of tropical west America marine mollusk from Baja California to Perú. Stanford Univ. Press. USA. 1064 pp.
- Khrer, J. P. 1993. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21-48.
- Koeman, H. J. 1991. From comparative physiology to toxicological risk assessment. *Comparative Biochemical and Physiology*. 100C: 7-10.
- Liyan, Z., H. Ying & L. Guangxing. 2005. Using DNA damage to monitor water environment. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 23(3):340-348.
- Machado-Schiaffino, G., L., O. Bala & E. Garcia-Vazquez. 2009. Recovery of Normal Cytogenetic Records in Mussels After Cessation of Pollutant Effluents in Puerto Madryn (Patagonia, Argentina). *Estuaries and Coasts*. 32:813-818.
- Márquez, C. 2005. Micronúcleos e índice mitótico en branquias de mejillón *Mytilus californianus* (Conrad 1837) expuestos a petróleo. *Rev. Int. Contaminación ambiental*. 245:231-237.
- Méndez, L., E. Palacios, B. Acosta, P. Montesalvo-Spencer, & T. Alvarez-Castañeda. 2006. Heavy Metals in the Clam *Megapitaria squalida* Collected from Wild and Phosphorite Mine-Impacted Sites in Baja California, Mexico Considerations for Human Health Effects. *Biological Trace Element Research*. 110: 275-287
- Metcalf, R. L. 1971. Structure-Activity Relationships for Insecticidal Carbamates.

Bull. Org. Mond. Santè. 44:43-78.

- Monteforte-Sánchez, M. 2005. Ecología, biología y cultivo extensivo de la Madreperla de Calafia, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), y la Concha Nácar Arcoíris, *Pteria sterna* (Gould, 1852) en Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 132 Pp
- Murillo, J. 1987. Algunas características paleoceanográficas y cuerpos de agua inferidos a partir de registros micropaleontológicos (Radiolaria) en la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 68 p.
- Novoa, V., A. Rudolph, & R. Ahumada-Rudolph. 2007. Utilización de bivalvos marinos como método para determinar contaminaciones marinas. *Ciencia... Ahora.* 20: 35-40.
- Obeso-Nieblas, M. & A. Jiménez-Illescas. 1989. Propagación del constituyente M2 de la marea en La Bahía de La Paz, BCS, México, mediante un modelo bidimensional hidrodinámico numérico. *Inv. Marinas CICIMAR*, 2:241-256.
- Organización Internacional de Trabajo (OIT). 1998. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Versión en español. España. Capítulo 33. Toxicología. Versión en línea:
http://www.ergonomia.cl/eee/Inicio/Entradas/2012/2/28_Enciclopedia_O.I.T._de_Salud_y_Seguridad_en_el_Trabajo.html
- Peña, C. E., D. E. Carter & F. Ayala-Fierro. 2002. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Universidad de Arizona 1996-2001. 204 P. Versión en línea:
<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Pérez-Estrada, C. J. 2000. Descripción anatómica e histológica de la concha nácar *Pteria sterna* Mollusca: Pteriidae. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. B. C. S, México. 88 p.
- Ramírez, M. M. 2000. Relación de la toxicocinética de carbaril y el efecto sobre la actividad de acetilcolinesterasa en el caracol *Pomacea patula*. Tesis de

- Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. 141 p.
- Rank, J., K. K. Lehtonen, J. Strand & M. Laursen. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic toxicology*. 84:50-61.
- Risso-de Faverney, C., M. E. Guibbolini-Sabatier & P. Francour. 2010. An ecotoxicological approach with transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for assessing the impact of tyre reefs immersed along the NW Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*. 70:87-94.
- Ruiz, J., C. Cedeño, A. Espinosa & J. Gómez. 1991. Estudio de la contaminación del río Magdalena por metales traza, su relación con parámetros hidrológicos fisicoquímicos y su incidencia en la salud humana. *Himat-Ingeominas*. 59 p.
- Saucedo P. & M. Monteforte. 1997. Repopulation experiments of pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *AMBIO*. 8: 522-528 pp.
- Scarpato, R. Migliore, L. & Barale, R. 1990. The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutation Research*. 245: 231-237.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*. 31: 9-15.
- Serrano-Guzmán, S. & D. Salinas-Ordaz. 1993. Cultivo de larvas y producción de semilla de *Pteria sterna* (Mollusca:Bivalvia) en un criadero comercial *Rev. de Inv. Cient. U.A.B.C.S.* 4(1): 81-90 p.
- Sevilla, M. L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1845). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 30: 223-262 p.
- Singh, N. P. & R. E. Stephens. 1997. Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutation Research*, 383: 167-175.
- Sobrino-Figueroa, A. S. & C. J. Cáceres-Martínez. 2009. Alterations of valve

- closing behavior in juvenile Catarina scallops (*Argopecten ventricosus* Sowerby, 1842) exposed to toxic metals. *Ecotoxicology*. 18(8):983-987.
- Sobrino-Figueroa, A. S. & C. J. Cáceres-Martínez. 2011. Detección de compuestos tóxicos y genotóxicos en sedimentos de la Ensenada de La Paz, B.C.S., México. 44 th Annual Meeting of the Western Society of Malacologist, La Paz B.C.S, Junio, 2011.
- Sobrino-Figueroa A. S. & C. J. Cáceres-Martínez. 2012. Comunicación personal. Sobrino-Figueroa A. S.: coco@xanum.uam.mx Cáceres-Martínez: ccaceres@uabcs.mx
- Sotil, G., J. Tarazona, R. Alvis, J. C. Francia & B. Shiga. 2008. Comparative evaluation of the DNA damage responses in two Peruvian marine bivalves exposed to changes in temperature. *Helgol Mar Res*. 62(suppl 1): s101-s105.
- Sotil, G., R. Alvis, J. C. Francia & B. Shiga. 2007. Aplicación de los biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. Peru Biol*. 13(3): 249-253.
- Sparre, P. & S. C. Venema. 1997. Introducción a la evaluación de Recursos Pesqueros Tropicales. Parte 1. Manual FAO Documento Técnico de Pesca. No 306.1 Rev.:420 p.
- Taleb, Z. M., S. Benghali, A. Kaddour & Z. Boutiba. 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galoprovincialis*. *Oceanologia*. 49 (4): 543-564.
- Tsangaris, C., E. Papathanasiu & E. Cotou. 2007. Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 66: 232-243.
- Valko, M., H. Morris & M. T. D. Cronin. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12:1191-1208.
- Vasseur, P. & L. C. Cossu. 2006. Linking molecular interactions to consequent effects of persistent organic pollutants (POPs) upon populations. *Chemosphere*. 62:1033-42.

- Venier, P., S. Maron & S. Canova. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[*a*]pyrene. *Mutation Research*. 390:33-44.
- Wells, P. G., Y. Bhuller, C. S. Chen, W. Jeng, S. Kasapinovic, J. C. Kennedy, P. M. Kim, R. R. Laposa, G. P. McCallum, C. J. Nicol, T. Parman, M. J. Wiley & A. W. Wong. 2005. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207: S354-S366.
- Yarsan, E., M. Tanyuksel, A. Celik & A. Aydin. 1999. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63:575-581.
- Yukihira, H., D. W. Klumpp & J. S. Lucas. 1999. Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. *Marine Ecology progress Series*. 182:161-173.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. New Jersey, 662 p.