



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OBTENCION DE UN MODELO ANIMAL PARA LA
INVESTIGACION DE MUTAGENESIS EN EL
AMBIENTE MARINO

T E S I S

Que para Obtener el Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P r e s e n t a

CARLOS MARQUEZ BECERRA

DIRECTOR DE TESIS :
DR. JESUS MANUEL LEON CAZARES

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Biología del género <i>Mytilus</i>	3
Generalidades	4
Ubicación taxonómica	5
Distribución geográfica	10
Distribución local	13
Variaciones geográficas en la reproducción	17
Estructura de la comunidad	20
Genética y evolución	24
Importancia económica de los mejillones	32
La mutación y su relación con el cáncer y las malformaciones congénitas.	34
La mutación	34
La mutación en organismos acuáticos	37
Cáncer	42
Cáncer en organismos acuáticos	45
Malformaciones congénitas	50
Malformaciones congénitas en organismos acuáticos	51
Mutación, cáncer y malformaciones en mejillones del género <i>Mytilus</i>	53
La contaminación en la costa de Baja California	59
¿Porqué se escogió al mejillón <i>Mytilus californianus</i> como sistema experimental en mutagénesis?	64
Objetivos: general y particulares	67
Materiales y Métodos	68
1. Selección de la especie que se empleó como modelo	68
2. Ubicación de las zonas de estudio y tiempo de colecta	68
3. Condiciones de colecta y manejo de organismos	68
4. Técnicas de obtención de células, elaboración de preparaciones y tinciones	69

Análisis citogenético del mejillón <i>Mytilus californianus</i>	72
Procedimientos para obtener los parámetros citogenéticos	73
Pruebas con mitomicina C	75
Evaluación de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en branquias de tres poblaciones	76
Evaluación de daño genético en tubo digestivo	76
Criterios de evaluación de micronúcleos	77
Pruebas estadísticas	77
Cultivo de hemocitos	78
Cultivo de branquias	79
Resultados	
Métodos para el incremento del número de metafases por preparación	81
Citogenética de <i>Mytilus californianus</i>	83
Daño genético en mejillones <i>Mytilus californianus</i>	85
Ensayos <i>in vitro</i> : hemocitos	89
Ensayos <i>in vitro</i> : branquias	91
Discusión y comentarios	92
Literatura citada	120

RESUMEN

En este trabajo se presenta al mejillón *Mytilus californianus* (Conrad, 1837) como sistema experimental en mutagénesis. Se escogió dicha especie porque posee las siguientes características: distribución geográfica amplia, poblaciones grandes, de manejo fácil, 28 cromosomas y no tiene problemas taxonómicos, entre otras.

Los resultados principales son los siguientes:

1. Se desarrollaron dos procedimientos para obtener un número elevado de metafases por preparación de branquias, de tal modo que es posible practicar el análisis de cromosomas con facilidad. Se abordó dicho aspecto porque era uno de los factores que limitaban la evaluación de daño en cromosomas, lo cual se había señalado en los primeros trabajos con mejillones.

2. Se muestra el cariotipo de cromosomas metafásicos, su análisis cuantitativo, un cariotipo de alta resolución con bandas "G" e idiogramas. Esta parte se realizó porque resulta indispensable conocer el tamaño, la forma y el número de los cromosomas de una especie, antes de iniciar cualquier trabajo de evaluación de daño citogenético.

De los cromosomas de *M. californianus* sólo se conocía un reporte del año 1970, en el cual se mostraba un cariotipo realizado con cámara lúcida y no se precisaban detalles. En cuanto a bandas G en bivalvos, se conocían pocos reportes y de cariotipos con profásicos, hasta donde se sabe, no había antecedentes en moluscos.

3. Se realizaron evaluaciones de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos en las branquias de los mejillones de tres poblaciones de Baja California. Así también, se examinaron micronúcleos y núcleos heteropícnóticos en tubo digestivo de cuatro poblaciones, tal órgano no se había empleado anteriormente con este propósito. En las muestras de la Bahía Todos Santos se observó la mayor frecuencia de daño genético.

4. Se estudió el efecto de la mitomicina C en las branquias y se observó una respuesta positiva en la producción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

5. Con el propósito de apreciar las posibilidades de que algunas células de los mejillones pudiera trabajarse *in vitro*, se probaron varios medios de cultivo con hemocitos y branquias.

Se aplicaron cuatro medios a los hemocitos y se obtuvieron evidencias de mitosis en cultivo. De estos aspectos no existían antecedentes. También se probaron tres medio en branquias y se lograron mantener en buenas condiciones hasta 96 horas, no se detectaron evidencias de división celular.

El cultivo de las células abre expectativas para el estudio de la mutagénesis bajo condiciones *in vitro*.

Si se lograra hacer que las células del mejillón californiano se dividieran de acuerdo con un procedimiento rutinario, entonces se podría trabajar el fenómeno de la mutagénesis en tres niveles: *in situ* (en poblaciones silvestres), *in vivo* (organismos bajo condiciones de acuarios) e *in vitro* (células en cultivo). Tal vez ese esquema de trabajo se alcance en un tiempo corto.

INTRODUCCION

La investigación en mutagénesis con organismos marinos principia en la década pasada. Los primeros reportes en los que se presentan a los mejillones del género *Mytilus* como sistema experimental son de 1982. En los trabajos pioneros se mostró a la especie *M. edulis* como modelo promisorio para ese campo del conocimiento. Sin embargo, a mediados de los ochenta hubo controversia acerca de la situación taxonómica de las poblaciones del supuesto *M. edulis* de la costa del Pacífico de América del norte y a la fecha se supone que en realidad dicha especie no existe en esa región del planeta. Posteriormente, otros grupos de investigación reportaron al mejillón *M. galloprovincialis* como organismo experimental, pero éste es abundante en el mar Mediterráneo, mientras que en otras partes del mundo sus poblaciones son escasas y además se han detectado numerosos casos de hibridación. En cuanto a *M. californianus*, se desconocen sus antecedentes en este sentido a pesar de que sus poblaciones son numerosas en el Pacífico de Norteamérica.

BIOLOGIA DE LOS MEJILLONES DEL GENERO *Mytilus*

En este trabajo se presenta a *M. californianus* (Conrad, 1837) como organismo de importancia para el estudio del fenómeno de la mutagénesis. Sobre tal aspecto, existen antecedentes acerca de la utilización de las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en dicho campo, sin embargo, hasta donde se sabe, no hay trabajos que describan y expliquen las características que los hacen de interés para el conocimiento de la mutagénesis. Es por ello que onseguida se hace una descripción breve para aclarar aspectos básicos

tales ¿como y en donde se encuentran distribuidos en el mundo y localmente? ¿cuales son sus características taxonómicas y que problemas tiene su identificación? ¿cuál es su importancia ecológica y económica? ¿con quienes se asocian en las comunidades? ¿cuando se reproducen? Se espera que con esta información sea posible ubicar al organismo, se entienda algo de él y se pueda buscar mayor información en la literatura que se cita. La idea de presentar esta sección surge debido a que los mejillones no son tan conocidos como otros organismos por ejemplo: ratas, ratones o *Drosophila*.

GENERALIDADES

Los mejillones, denominados también choros en Baja California son moluscos que pertenecen a la familia Mytilidae de la clase Bivalvia, Phylum Mollusca. Estos junto con las ostras y las almejas son los bivalvos más conocidos, lo cual se debe a su amplia distribución y a su importancia ecológica, alimentaria y económica. Son organismos comprimidos lateralmente y poseen una concha con dos valvas articuladas dorsalmente por medio de una charnela (Fig. 1). Son casi siempre sésiles, excepto en estado de larvas en que son movidos por las corrientes de agua hasta que ocurre el asentamiento. Después permanecen anclados al sustrato, por medio del biso y así forman colonias. Habitan las zonas litoral y sublitoral, hasta los 46 m de profundidad. El tamaño que alcanzan es variable y llegan a medir hasta 255 mm de longitud. Se alimentan a través de un mecanismo de filtración no selectiva, de partículas en suspensión, de bacterias y de microalgas. El proceso de filtroalimentación se realiza cuando el organismo se encuentra sumergido y abre sus valvas, entonces genera corrientes de agua

A



B

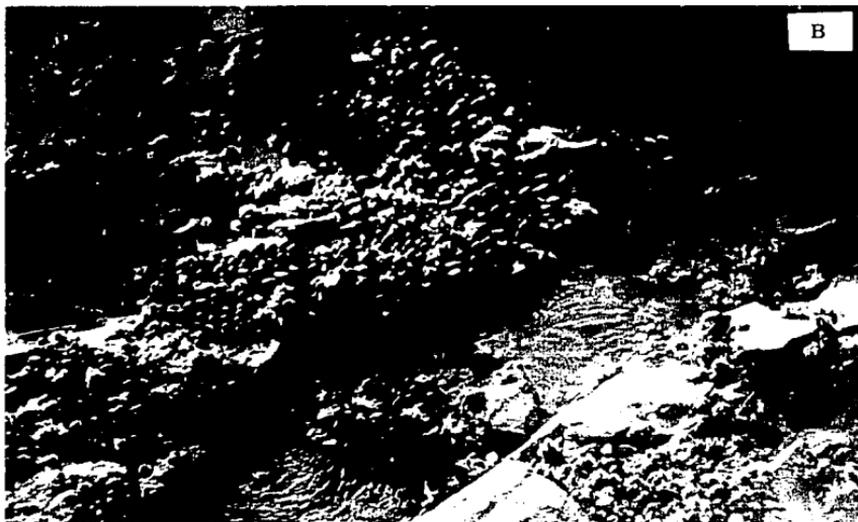


Fig. 1. Mejillones *Mytilus californianus*, de varias tallas (A) y decenas de éstos en el ambiente natural (B).

por medio de los cilios de sus branquias, atrapa los microorganismos y partículas y después los pasa a los palpos labiales, la boca y al aparato digestivo (Shepard-Oldroyd, 1978; Parés, 1987).

UBICACION TAXONOMICA

TABLA I. Clasificación taxonómica de los mytilidos, desde phylum hasta género (De: Keen, 1971).

Phylum Mollusca

Clase Pelecypoda = Bivalvia = Lamellibranchia = Lamellibranchiata

Subclase Pteriomorpha

Orden Mytiloida

Superfamilia Mytilacea

Familia Mytilidae

Subfamilia Mytilinae

Género *Mytilus*

Fue Lineo quién introdujo el nombre *Mytilus* para designar a los bivalvos con concha en forma de pera. En este grupo incluyó a los mejillones y a otros seres de forma parecida, pero que actualmente se les clasifica dentro de géneros distintos a *Mytilus* e incluso hasta en familias diferentes a Mytilidae. En la tabla I se muestra la clasificación taxonómica de los mytilidos, desde phylum hasta género (Keen, 1971; Seod, 1976).

Los mejillones han sido un tema de controversia inacabada desde la época de Lineo. El género *Mytilus* a lo largo de la

historia ha incluido a muchas especies de diversas regiones del mundo y de muy variados ambientes. Con el propósito de ilustrar tal situación cabe comentar que Lamay en 1936 (citado por Seed, 1976) en uno de sus trabajos clásicos citó más de 170 nombres específicos dentro de *Mytilus* y aún en fechas recientes autores como Santos-Galindo (1977) han señalado cerca de 230 nombres de especies.

Algunas de las especies que reconoció Lamay en 1936 son las siguientes: *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, cosmopolita; *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819, del mar Mediterráneo; *M. trossulus* Gould, 1850, de la costa del Pacífico de Norteamérica; *M. chilensis* Hupe, 1854, de Chile; *M. platensis* Orbigny 1846, de Argentina; *M. planulatus* Lamarck, 1819, de Australia (citado por McDonald et al. 1991).

En un trabajo que sigue siendo un punto de referencia, Soot-Ryen (1955), señala que la mayoría de los taxa son quizás solo subespecies de *M. edulis* y reconoce cuatro posibles especies para el género *Mytilus*: (1) *M. edulis* Linnaeus junto con sus subespecies geográficas, (2) *M. californianus* Conrad, (3) *M. crassitesta* Lischke y tal vez (4) *M. giganteus* Nordmann. Cabe destacar que *M. californianus* es considerado siempre como especie indiscutible; así como lo fue *M. edulis* sólo que ésta en años recientes ha sido muy controvertida. Soot-Ryen (1955) cita también a las siguientes subespecies con sus respectivos sinónimos: *M. edulis chilensis* Hupe, *M. edulis platensis* Orbigny (= *M. canaliculus* Dall), *M. desolations* Lamy (= *M. kerguelensis* Fletcher), *M. galloprovincialis* Lamarck; *M. edulis diegensis* Coe y *M. edulis planulatus* Lamarck. Soot-Ryen (1955) también propuso que

todas las subespecies de *Mytilus edulis* podrían ser formas ecológicas o genéticamente bien determinadas y sugirió que las poblaciones separadas geográficamente quizá hubiesen presentado modificaciones mínimas que distinguieran a una de otra.

Recomendó el empleo de nombres específicos para algunas de esas subespecies geográficas, aunque no presentaran caracteres morfológicos que las diferenciaran.

En la actualidad tal recomendación podría discutirse ampliamente ya que corresponde al pasado, cuando el concepto biológico de especie empezaba a consolidarse y a difundirse. Pero el peso de las observaciones y sugerencias de Soot-Ryen (1955) todavía se reflejan en trabajos actuales.

La posición sistemática de *Mytilus galloprovincialis* es un tema de gran controversia ya que algunos autores lo consideran como una subespecie de *M. edulis*, en tanto que otros lo señalan como una especie verdadera. Ambas resultan realmente importantes para el tema de esta tesis porque han sido tomadas por diversos autores para realizar los primeros intentos de estudios sobre mutagénesis en bivalvos. Para aclarar ese problema se han mostrado diversas evidencias que señalan que la existencia de diferencias morfológicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas son tan marcadas que es posible ubicar a dichos mejillones en especies distintas. No obstante otros autores indican que tales variaciones son dependientes de la posición geográfica en donde se desarrollen (Seed, 1976). En la década de los ochenta, en Europa se hacen estudios cromosómicos tanto de *Mytilus galloprovincialis* como de *M. edulis* y se evidencia que tienen igual número de cromosomas ($2n = 28$) aunque se aprecia una pequeña discrepancia en el par 2

(Thiriot-Quievreux, 1984a; Dixon y Flavell, 1986).

En cuanto a las poblaciones denominadas *M. edulis* de América del Norte, también se ha generado una fuerte controversia de carácter taxonómico, por ejemplo los grandes tratados de mejillones y de invertebrados refieren a las poblaciones de California, Estados Unidos y de Baja California, México, como *M. edulis* (Bayne, 1976b; Shepard Oldroyd, 1978; Haderlie y Abbott, 1980). Sin embargo, desde el punto de vista de la Genética Bioquímica, las poblaciones del Sur de California en vez de ser *Mytilus edulis* quizá son *M. galloprovincialis* (Varvio et al., 1988; McDonald y Koehn 1988) y se sospecha que lo mismo puede señalarse para las poblaciones de BC. De hecho algunos investigadores las han referido como *M. edulis* (Flores-Báez y Galindo-Bect, 1989; García-Pámanes, 1990; Galindo-Bect y Flores-Báez, 1991) y otras veces como *M. galloprovincialis* (García-Pámanes y Parés-Sierra, 1990).

Ante tal situación lo que parece recomendable es denominarle *Mytilus* sp ó bien referirlo como *M. galloprovincialis* y señalar la localidad de colecta y aclarar que la identificación es de acuerdo a Varvio et al. (1988), McDonald y Koehn (1988) y McDonald et al. (1991). Otra opción es designarle como el *M. edulis* putativo hasta que se resuelva el problema taxonómico de manera definitiva, quizá a través de una reunión de expertos en la que se llegue a un acuerdo que sea publicado. Esto se sugiere porque los mismos autores que han trabajado con los mejillones *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* desde un enfoque genético-evolutivo, indican que aunque se pueden apreciar líneas evolutivas distintas, no se puede concluir aún su situación taxonómica. Un punto a destacar aquí es

que la especie *Mytilus californianus* no entra en la discusión ya que es fácil de identificar por medio de las características de la concha (McDonald et al., 1991).

Por otro lado, además del género *Mytilus* existen otros cuyas especies han sido designadas en más de una ocasión como si correspondieran a *Mytilus*; tales géneros son: *Aulocomya*, *Perna*, *Crenomytilus*, *Choromytilus*, etc. Algunas especies de *Crenomytilus* son a veces designadas *Mytilus grayanus* Dunker = *M. dunkeri* Reeve; *Choromytilus* tiene especies que son sinónimo de *Mytilus chorus* Molina y *M. meridionalis* Krauss; *Mytilaster* incluye a una especie que ha sido denominada como *Mytilus minimus* Poli, tal nombre se ha utilizado a veces para un grupo de mejillones muy pequeños. Otro género es *Hormomya* que incluye a mejillones que en ocasiones se han nombrado *Mytilus variabilis* Krauss; *Hormomya* también ha sido considerado como un subgénero de *Brachidontes*. Este último, a su vez, también presenta especies que tienen sinónimos de *Mytilus*, por ejemplo *Brachidontes adamstanus* = *Mytilus stearnsi*; *B. semilaevis* = *M. multiformis*, etc. (Keen, 1971).

Tal situación sólo indica un problema enorme dentro del grupo ya que los criterios para identificar a los organismos y asignarles un nombre específico en muchos casos son discutibles y no se logra, por consiguiente, uniformidad. En otros casos los criterios empleados por los distintos investigadores son los mismos, pero estos resultan insuficientes o bien, poseen un valor taxonómico reducido y generan ruido en la información. Otro hecho es que aún existiendo ya herramientas que han demostrado ser de gran utilidad como las técnicas de Citogenética a nivel de bandas, tanto de cromosomas profásicos como metafásicos, las de marcadores

moleculares y las inmunológicas, éstas todavía no se aplican en todos los problemas taxonómicos, quizá por ser recientes. Algo que se puede comentar es que las pruebas comentadas no siempre son definitivas, por lo que es conveniente agregar características morfológicas, fisiológicas, ecológicas y de comportamiento reproductor, para así tener un panorama que rebase el aspecto estrictamente taxonómico y se alcance un nivel de Sistemática, el cual brinda mayor poder de resolución.

A pesar de la existencia del problema de la designación de las especies, lo que ello indica es que muchas, pero no todas, las poblaciones, razas, subespecies y especies que se han agrupado en el género *Mytilus* están emparentadas. Lo cual hace que los mejillones sean considerados como organismos de un alto valor para los trabajos experimental y de campo en Biología, porque los ejemplares colectados en las costas de México, Estados Unidos, Canadá u otros países, tienen muchas posibilidades de responder igual a diversos agentes ambientales y aún a contaminantes.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Existen varios factores que controlan la distribución de los mejillones, tales como la salinidad extrema y la disponibilidad de sustrato; pero el que en principio controla la distribución de todos los organismos marinos, incluso la de los mejillones, es la temperatura. Esta puede afectar la supervivencia de las larvas y los adultos, el comportamiento reproductor normal y los procesos de la metamorfosis. La mayoría de las especies de mejillones viven en un intervalo amplio de temperaturas, pero el en el que pueden reproducirse es estrecho.

Aquellas especies que realizan todas sus funciones de manera normal dentro de un amplio rango de temperatura son cosmopolitas en su distribución, a diferencia de las que tienen un intervalo pequeño que comúnmente están restringidas a ciertas localidades.

El género *Mytilus* es un grupo estupendo para estudiarse geográficamente porque sus organismos son sésiles la mayor parte de su vida, excepto en los primeros estadios del desarrollo y también porque se establecen en la zona intermareal y pueden observarse fácilmente.

La especie *M. edulis* y el complejo de especies o subespecies relacionadas que aún están en discusión, se distribuyen en las aguas boreales y templadas tanto en el hemisferio norte como en el sur. Sin embargo, otros autores que indican que *M. edulis* es una especie verdadera y discriminable de otras, señalan que su distribución está limitada al hemisferio norte. La opinión más generalizada propone que es cosmopolita. Se le puede localizar desde Canadá hasta las costas de Carolina del Norte, en el océano Atlántico. Se suponía que *M. edulis* también existía en el océano Pacífico, desde el Ártico de Canadá hasta Japón y Baja California, México, pero de acuerdo con algunos trabajos de la última década, esas poblaciones corresponden a *M. galloprovincialis* (McDonald y Koehn, 1988; McDonald et al., 1991).

A *M. edulis* también se le puede observar en Groelandia y en el mar Blanco de Rusia, solo que en muchas localidades sus colonias se ubican en el sublitoral. En Europa está distribuido hasta el mar Mediterráneo. En zonas como Siberia no se le ha detectado. Las subespecies *M. edulis chilensis* y *M. edulis platensis* se encuentran en las costas oeste y este de Sudamérica,

respectivamente. *M. edulis planulatus* está presente en Australia y Nueva Zelanda y *M. desolationis* en las Islas Kerguelen (Seed, 1974; 1976). De acuerdo con McDonald et al. (1991) los mejillones de Australia y Nueva Zelanda quizá son *M. galloprovincialis*; así mismo ratifican que los de Sudamérica son *M. edulis*.

Mytilus edulis contrasta su distribución cosmopolita con la de *M. californianus* que está confinada a la costa oeste del Pacífico del Norte, desde las islas Aleutianas, Estados Unidos, hasta el sur de Baja California, México.

Por su parte *Mytilus galloprovincialis* se ubica principalmente en los mares Mediterráneo y Adriático; en regiones como el norte de Francia, el suroeste de Inglaterra, en Italia, España, Portugal, Hong Kong, sureste de África, sur de California (Seed, 1976; Skibinski, 1983; Grant y Cherry, 1985; Pasantes et al, 1990; McDonald, et al, 1991).

Barsotti y Meluzzi (1968) proponen que *M. galloprovincialis* deriva de *M. edulis* y señalan que la diferenciación se favorece con el clima cálido del Mediterráneo, que es la región en donde se encuentran las principales poblaciones de *M. galloprovincialis*. Quizá es la temperatura la que constituye una limitante que reduce el contacto entre las dos especies, ya que *M. edulis* se desarrolla preferencialmente en regiones con clima templado. A pesar de ello existen zonas en donde sus poblaciones comparten espacio y parece ser que intercambian gametos y genes, así forman poblaciones híbridas; tales zonas comprenden parte de la costa del Atlántico y del canal Inglés. Si se produce el flujo de genes entre ambas poblaciones, o supuestas especies entonces no se cumplen los requisitos para que sean denominadas especies en el

sentido del concepto biológico, ya que éstas deberían presentar aislamiento reproductor y por lo tanto no intercambiarían genes. Este puede ser un punto de discusión amplia.

Existen varios mejillones y organismos relacionados de los que se conoce poco, tales como: *Semimytilus*, *Crenomytilus*, *Choromytilus* y *Auloconya*. Todos ellos son del hemisferio sur en donde hasta hace poco no se les explotaba comercialmente. Así mismo están *M. edulis acoteanus* localizada en Nueva Zelanda y *M. smaragdinus* en India y el sureste de Asia (Seed, 1976).

DISTRIBUCION LOCAL

Mytilus se encuentra principalmente en las zonas litoral y sublitoral, aunque ocasionalmente se le ha detectado en aguas profundas. Se le puede localizar tanto en zonas con fuerte oleaje como en lugares protegidos, está adherido a muchos tipos de sustratos entre los que cabe citar: rocas, conchas, maderas y arena compactada. También se pueden adherir con su bisco a barcos, postes de los muelles y muros. Los organismos del género *Mytilus* viven en cualquier sustrato que exista en la costa. No obstante, las comunidades en donde alguna especie de *Mytilus* sea la dominante están generalmente en playas expuestas a las olas o bien en sitios resguardados pero con mucho movimiento de agua, ahí algunas veces hasta llegan a reemplazar a los balanos.

Los patrones de distribución local pueden variar en ambientes que aparentemente son iguales en condiciones físicas, por lo que se supone que tales factores no son los únicos responsables de la distribución, quedan por considerarse a otros tales como: la disponibilidad de alimento, los depredadores, factores genéticos y

la migración, que harían posible el eventual asentamiento de organismos provenientes de colonias vecinas.

En ciertas regiones los *Mytilus edulis* no toleran vivir fuera de las zonas protegidas ni tampoco en las playas abiertas dominadas por los fucoides (planta marina) y solamente reaparecen en forma de colonias en estuarios y lagunas costeras. Es un tanto incierto el papel que desempeñan los fucoides como inhibidores del desarrollo de las larvas y de su asentamiento. Así mismo es desconocido si limitan la supervivencia de los adultos o si inhiben su comportamiento reproductor. Ciertas plantas del género *Ascophyllum* forman un follaje o cubierta y abajo de ella pueden proliferar los mejillones de la especie *M. edulis* en lagunas costeras.

Algunos autores han abordado el problema de la distribución local de *Mytilus*, que es tan errático e impredecible, que han sugerido diversas explicaciones que comprenden a varios de los factores citados anteriormente, hacen énfasis en la acción de los depredadores de la parte baja del sublitoral. En el extremo superior del litoral, los agentes que consideran más limitantes son: la exposición al aire, al calor y a la consecuente desecación, especialmente cuando los mejillones son juveniles. La protección contra la desecación depende de múltiples elementos; uno de ellos es el tipo de sustrato al que están adheridos. Esto es importante porque no es lo mismo una roca con grietas y hoyos en donde queda retenida el agua, que un sustrato formado por arena comprimida en donde prácticamente no se retiene el líquido. El tamaño del organismo también es relevante porque un animal grande tiene mayor capacidad para retener el agua que uno menor. Otros

aspectos que permiten que pueda soportar la desecación son algunos inherentes de la población y de la comunidad, por ejemplo en una población con una densidad alta se mantendrá más humedad y por más tiempo que en otra con densidad menor, en una con muchos organismos grandes habrá más humedad que en otra conformada por tallas chicas. Así también la desecación podrá ser mejor tolerada en una comunidad rica en especies que en una pobre en este aspecto. Una comunidad que incluya poblaciones de mejillones, de gasterópodos, de algas y de otros grupos, tiene gran capacidad para retener el agua y también presenta mayor posibilidad para mantenerse húmeda, con la aportación parcial de cada uno de los individuos; lo cual no ocurre bajo condiciones de diversidad escasa.

Vermeij y Dudley (1985) han señalado algunos mecanismos contra la desecación que muestran ciertos bivalvos dulceacuicolas. Los mejillones también presentan varios mecanismos contra la desecación, particularmente los que ocupan la zona intermareal. Entre tales adaptaciones se puede indicar la presencia de músculos aductores fuertes que les permiten cerrar sus valvas con bordes lisos. El cierre es hermético, debido a que los bordes de las valvas están cubiertos con una secreción semiblanda que produce el manto (Yonge, 1976).

Tal vez algunas de las características que les permiten sobrevivir en condiciones de desecación periódica y frente a los depredadores, sean de orden genético. Esto se sugiere con base en las diferencias alélicas detectadas en poblaciones que ocupan los niveles intermareal alto, medio y bajo (Koehn, 1983). Por su parte Paine (1976) ha demostrado experimentalmente que en los mejillones

VARIACIONES GEOGRAFICAS EN LA REPRODUCCION

Existen registros de diversas partes del mundo para el aspecto reproductivo de los mejillones. Sin embargo esos datos fueron tomados de acuerdo con criterios que en ocasiones resultaron distintos, por lo que es conveniente considerarlos como una aproximación. Este aspecto tiene relevancia para el propósito del trabajo que aquí se presenta, porque algunos de los primeros reportes sobre la utilidad de los mejillones como sistema de prueba en mutagénesis se hicieron con cigotos y embriones de pocas células, de la supuesta especie *Mytilus edulis* (Dixon, 1982; Harrison y Jones, 1982). Existen algunas interrogantes sobre tales pruebas, por ejemplo ¿sería posible que dicho procedimiento sea empleado de manera rutinaria? pues quizá no, porque sólo podría emplearse en la época de reproducción. Ahora bien, aquí resulta imprescindible conocer en que temporada se obtienen gametos maduros, para luego lograr los embriones. Otra de las interrogantes es ¿la época de reproducción ocurre en el mismo tiempo en diversas poblaciones del mundo? o bien ¿cuales poblaciones coinciden en época? A las preguntas anteriores se suma otra: ¿se empleó realmente a *M. edulis*? que es la que reportaron Dixon (1982) y Dixon y Clarke (1982) en Inglaterra y Harrison y Jones (1982) en California. Parece ser que en California no se trabajó con *M. edulis*, sino más bien con *M. galloprovincialis* o con un híbrido de tal especie con *M. trossulus*, esto es sugerido por una serie de trabajos sobre Genética de Poblaciones y Evolutiva de los mytilidos de Norteamérica y de otros lugares del mundo (McDonald et al., 1991), en donde no se detecta a *M. edulis* en Tomales Bay, California, que es el sitio donde se colectan

los organismos que trabajan Harrison y Jones (1982). En cuanto a las poblaciones de Inglaterra, ahí se han detectado a *M. edulis* y a *M. galloprovincialis*, así como a sus híbridos, por lo que resulta difícil saber con certeza que especie se estudió.

En los párrafos siguientes se describe de manera global la variación que existe en cuanto a la época de reproducción de los mejillones en diversos lugares del mundo.

Los datos indican que en el hemisferio norte los organismos *Mytilus edulis* de las aguas más tibias (18-20°C) expulsan los gametos (desove) más pronto en el año, que los mejillones de zonas frías (10-12°C), que en general están al norte. En Plymouth, Inglaterra, el desove ocurre primordialmente en los meses de enero a marzo y en menor grado de marzo a junio. En otros lugares de Inglaterra como Conway y Liverpool dicho fenómeno se realiza entre abril y junio.

En Irlanda, en sitios como Cromaine y River Boyne la reproducción se presenta desde marzo a junio, pero en otros lugares como las lagunas de Belfast, aunque se produce el desove de abril a junio, éste también puede ocurrir desde el verano hasta noviembre.

En el mar Blanco, (ex URSS), los organismos se reproducen desde mayo hasta octubre, pero principalmente desde julio hasta principios de septiembre, en Groelandia en octubre, en Finlandia de mayo a junio, lo mismo sucede en algunos lugares de Dinamarca como Limfjord; pero en otras regiones de Dinamarca como The Sound puede darse desde mayo a junio, con periodos adicionales en septiembre y octubre. En Alemania las larvas son abundantes de abril a diciembre, pero principalmente de abril a junio. En Francia el periodo de reproducción es muy amplio; algunos reportes

señalan desoves tempranos en enero y febrero, pero con desoves masivos en marzo y abril y posteriormente la expulsión de gametos se presenta de manera parcial durante mayo y junio. Para España se cuenta con dos temporadas registradas, una es de abril a mayo y la otra de noviembre a enero. En Estados Unidos, en la costa Este está reportado que el desove acontece en mayo en Long Island y que en Woods Hole empieza en febrero y termina en agosto, mientras que en el Pacífico, se estima que la reproducción se realiza de noviembre a febrero en la costa de California (Seed, 1976). Y para Baja California se tiene registrado que se lleva a cabo en esa misma época (Parés, 1987). La información antes citada ha sido referida para *Mytilus edulis*.

Por otro lado, para *M. californianus* se ha registrado que en Ensenada, en el ejido Eréndira, los desoves ocurren durante todo el año, con épocas de intensidad máxima en julio-agosto, diciembre-enero y abril-mayo.

Aquí cabe aclarar y reiterar, que la información señalada para *Mytilus edulis* puede ser un tanto incierta dado que durante la década de los ochenta y en los noventa, se estudiaron muchas poblaciones del mundo con el fin de aclarar algunas dudas de carácter taxonómico. Se suponía que algunas poblaciones denominadas *M. edulis* podrían estar bien identificadas pero que quizá otras fueran *M. galloprovincialis* o *M. trossulus* o bien híbridas de dichas especies. En un trabajo reciente McDonald et al. (1991), señalan que los mejillones estudiados desde un enfoque de análisis de alozimas y/o de conchas, que provenían de Dinamarca, el mar Blanco y el noreste de Estados Unidos, pertenecen a *M. edulis*. Los colectados en Italia, España,

el grado de resistencia a los depredadores como las estrellas de mar, está relacionado con el tamaño y el grosor del músculo aductor, y existen evidencias que indican que dicho rasgo es heredable.

La distribución vertical de los mejillones es muy parecida a la de otros organismos del litoral, ésta es máxima en las costas con gran oleaje. Los animales requieren de un mínimo de energía para poder llevar a cabo de manera normal su metabolismo basal y éste puede estar limitado por las concentraciones de oxígeno. Por lo tanto se considera que la condición de oxigenación del agua es un factor que restringe la penetración vertical de los mejillones.

A partir del estudio de las interacciones entre los mejillones *M. californianus* y la supuesta especie *M. edulis* en las costas de California, se ha llegado a inferir que el incremento en las poblaciones de *M. edulis* promueve la colonización de ambientes menos favorables como aquellos en donde no hay mucho movimiento de agua. Con tales intentos de colonización se ponen a prueba muchos tipos de combinaciones génicas y quizá algunas de éstas confieran a los individuos características que les permitan establecerse como poblaciones permanentes, que con el tiempo lleguen a diferenciarse de las que les dieron origen (Seed, 1976).

Las poblaciones de mejillones que a la fecha se han estudiado mediante marcadores genéticos han mostrado poseer gran variabilidad, lo cual representa una fuente enorme de posibles combinaciones génicas (Koehn, 1983).

Portugal, Sur de California y Hong Kong se agrupan dentro de *Mytilus galloprovincialis*. Los organismos de Oregon, la costa del Pacífico de Siberia y los del mar Báltico, corresponden a *M. trossulus*.

En sus muestras encuentran que coexisten y forman híbridos *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en Inglaterra y Francia, *M. edulis* y *M. trossulus* en el este de Canadá y *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* en el norte de California.

ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD

Desde hace poco mas de dos décadas se empezaron a realizar estudios sobre la descripción de la naturaleza y la dinámica de las interacciones que se generan al interior de las comunidades donde están presentes los mejillones (Paine, 1974).

En las poblaciones de mejillón es notable la ausencia de una distribución polimodal en la distribución por tamaño. Tal vez esto se debe al periodo largo de reclutamiento, junto con la variabilidad en la tasa de crecimiento de los individuos. A lo anterior se le puede sumar el crecimiento lento de la mayoría de las poblaciones, especialmente aquellas en donde muchos individuos pequeños se encuentran adheridos al bisco u otras partes de los organismos mayores. Bajo tales condiciones se producen con frecuencia poblaciones en donde abundan los individuos pequeños.

Otra situación que llama la atención y se desconoce la causa, es que en algunas poblaciones de mejillones persisten a lo largo del año los organismos pequeños. No se sabe si son juveniles verdaderos o enanos, de ocurrir esto último sería importante el conocer si el fenómeno es causado por mecanismos intrínsecos de los organismos o si son ambientales. Por ejemplo, si algún

organismo de la comunidad, como puede ser un alga, libera cierta molécula inhibidora del crecimiento o si el sustrato o el agua contienen algún agente tóxico. En contraste con las poblaciones antes señaladas, existen otras en las que abundan individuos grandes, mientras que los pequeños son escasos. Dicho fenómeno puede ser explicado si se supone que se produce un crecimiento rápido en los organismos así como que se presente una mortalidad selectiva. Existen otras explicaciones posibles, pero todas requieren de corroboración experimental (Seed, 1976).

El reclutamiento anual es muy difícil de seguir en los mejillones porque el tiempo y la intensidad del desove son impredecibles. Se ha sugerido que las fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones se debe a los cambios en la disponibilidad de alimentos. Otra característica que se ha relacionado con los nutrientes es la situación de las poblaciones que integran colonias irregulares en forma de parches en las playas y costas, donde se ubican en una multitud de sustratos. Hay evidencias que indican que los mejillones enriquecen el ambiente en donde se establecen. Por su gran capacidad para retener la humedad y biodepositar materiales, permiten que otras especies también tengan acceso al litoral, lo que de otra manera sería difícil.

Existen dentro de las comunidades algunos depredadores de mejillones, tales como: asteroides, pulpos, caracoles, cangrejos y aves. En el sur de California se localiza un pequeño cangrejo de 2 a 4 cm, *Cancer antennarius* que puede comerse por día de 5 a 7 individuos de *M. edulis* (que en la actualidad han sido designados como *M. galloprovincialis*), pero en cambio sólo de 2 a 4 individuos de *M. californianus*. La diferencia se encuentra en la

concha y en la adherencia al sustrato; los *M. galloprovincialis* tienen una concha delgada y lisa, y están debilmente unidos, mientras que los *M. californianus* poseen una concha gruesa y áspera y están fuertemente pegados al sustrato. Los mismos cangrejos *C. antennarius* así como *Pachygrapsus crassipes* prefieren a *M. galloprovincialis* que al pequeño mejillón *Septifer bifurcatus* que tiene una concha dura y está bien adherido al sustrato (Vermeij, 1980). En las zonas templadas y polares las aves del género *Haematopus* conocidas comunmente como atrapadoras de ostras, porque comen bivalvos, son consideradas como unos de los principales depredadores de los mejillones y las ostras. A partir de un estudio sobre el comportamiento alimentario de tales aves se llegó a la conclusión de que la vulnerabilidad al ataque depende del tamaño de los bivalvos (Hartwick, 1976).

Las estrellas de mar son también depredadores importantes de los mejillones, pero éstos han desarrollado algunos rasgos que les permiten resistir la agresión, entre los que se encuentra su músculo aductor, que es fuerte. Se ha demostrado experimentalmente que los mejillones *M. edulis* de Dinamarca, que presentan un músculo aductor relativamente grande, son depredados con mayor lentitud por la estrella de mar *Asterias rubens* que los organismos de la misma especie provenientes de Inglaterra que tienen un músculo menor. En el Pacífico norte el mejillón *M. californianus* alcanza tallas tan grandes que no puede ser depredado por la estrella *Pisaster ochraceus* que ataca principalmente organismos de tallas chicas. No obstante, en el sublitoral se han observado *Pisaster* de hasta 2,600 g que son capaces de abrir mejillones *Mytilus californianus* de hasta 255 mm, que son los más grandes,

pero los consumen con lentitud (Paine, 1976).

Los datos anteriores sobre la cadena trófica que se presenta en las comunidades de mejillones, son de interés para este trabajo porque los mejillones, que son consumidores primarios, son a su vez filtroalimentadores capaces de bioacumular a los contaminantes en grandes cantidades y bioconcentrarlos en varios órdenes de magnitud superior a la concentración del agua del ambiente. De tal forma que sus depredadores al comerlos incrementan tal concentración en sus tejidos y se exponen a mayores riesgos.

GENETICA Y EVOLUCION

El género *Mytilus* se originó entre los periodos Jurásico y Devónico (Seed, 1976). A partir de entonces surge como uno de los grupos biológicos más cosmopolitas y se inicia su dispersión y diversificación, hacia muchas de las costas del mundo. En ese sentido algunos autores han sugerido que la especie *Mytilus galloprovincialis* se separó de su ancestro, que también lo es de *Mytilus edulis*, tal vez desde el Pleistoceno en el mar Mediterraneo. Desde ahí extendió su distribución hacia el norte hasta alcanzar las costas del Atlántico en Europa occidental (Gosling y McGrath, 1990).

En ciertas zonas de las costas de Inglaterra, Irlanda y Francia existen poblaciones de mejillones híbridos de las especies *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, lo cual ha permitido plantear la interrogante de que hasta que punto pudieran considerarse dos verdaderas especies.

Tradicionalmente esos organismos se distinguen por la forma de la concha y el tiempo de desove; lo cual ha generado controversias. Por ello, distintos autores buscaron otros caracteres que tuvieran un valor de diagnóstico elevado, tales como loci de diversas enzimas por ejemplo: octopina deshidrogenasa (Odh), esterasa-D (Est-D) y leucina aminopeptidasa-1 (Lap-1) (Skibinski 1983; Gardner y Skibinski 1990).

A pesar de tal intento, no ha sido posible la identificación de un locus totalmente diagnóstico, esto es que la distribución de sus frecuencias alélicas no se sobrelapen (Gosling y McGrath, 1990).

A partir de los datos obtenidos sobre sus frecuencias génicas se han podido establecer los valores de identidad y de distancia genética y ellos señalan que algunas poblaciones de *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* están tan próximas como pueden estarlo las subespecies de otros invertebrados. Por otra parte, es conocido que en diversas regiones de Europa no se discrimina a *M. galloprovincialis* de *M. edulis*, de hecho se les considera como de la misma especie. Ahora bien, en Irlanda es más común localizar a *M. galloprovincialis* en las zonas expuestas y es en tales lugares en donde se encuentran mezclados los individuos de dicha especie con los de *M. edulis* y sus híbridos. En tanto en los lugares protegidos, es más fácil detectar a *M. edulis* (Gosling y McGrath, 1990).

Por su parte Gardner y Skibinski (1990), al estudiar a las especies citadas anteriormente y a sus híbridos, en las costas de Inglaterra mediante el análisis de los loci Est-D y Odh y al hacer la correlación de tales datos con el tiempo de desove, encuentran zonas en donde ambas especies coinciden por tiempos prolongados, hasta varios meses, en la reproducción. Lo cual muestran que entre tales poblaciones no se presenta un mecanismo de aislamiento reproductor temporal. Pero ello no significa que en otros lugares ocurra lo mismo, de hecho los hay y muy próximos, citados en ese mismo estudio, en los que existe coincidencia solo en una parte breve del tiempo de reproducción, lo que disminuye las posibilidades de formación de híbridos.

A partir de la información señalada y de otra existente sobre *M. edulis* que es la más cosmopolita y que indica que las distintas

poblaciones del mundo muestran diversas épocas de reproducción (Seed, 1976), se puede inferir en que el tiempo de desove puede estar influenciado por factores tanto genéticos como ambientales.

En un intento por esclarecer como se pueden establecer algunas correlaciones entre la estructura genética de las poblaciones y sus ambientes, Gartner-Kepkay et al. (1980) estudian cuatro poblaciones de *M. edulis* en la costa del Atlántico de Canadá. En ellas revisan cuatro loci que son: 1) LAP-1, 2) Peptidasa-2, 3) PGI y 4) PGM y detectan que el locus LAP-1 posee tres alelos comunes en todas las localidades, que son designados LAP-1_{aa}, LAP-1_{ab} y LAP-1_{ac}. De éstos, LAP-1_{aa} resulta ser el más abundante aunque sus frecuencias varían de zona a zona. Un dato relevante es que en todas las poblaciones se encuentra un elevado número de homocigotos, que se atribuye a la selección propiciada por factores ambientales. Con la información recabada de los cuatro lugares se forman dos pares de poblaciones constituidas a partir de su similitud genética y de la semejanza de sus características ambientales. Esto sugiere que la estructura genética de las poblaciones de *Mytilus edulis* puede ser similar en lugares distantes, siempre y cuando se presenten ambientes parecidos.

Es evidente que en el género *Mytilus* existen algunas poblaciones problemáticas desde el punto de vista taxonómico, pero también parece claro que hay especies identificables, entre las que destacan *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus* y *M. trossulus*. De ellas la más estudiada es *M. edulis* que quizá tiene algunas subespecies en lugares muy distintos a su centro de

origen y que tal vez también son diferentes en un sentido ecológico. Esto es posible dada su amplia distribución por ejemplo los mejillones de Chile, Argentina, Islas Falkland (o Malvinas) y las Islas Kerguelen poseen alelos característicos de tres de las especies del hemisferio norte, excepto de *M. californianus*, pero dichas poblaciones del hemisferio sur son más parecidas al *M. edulis* del norte, por lo que se les ha incluido tentativamente en dicha especie, aunque en su morfología sean intermedias entre *M. edulis* y *M. trossulus*.

Por su parte los mejillones de Australia y Nueva Zelanda son similares en frecuencias alélicas y caracteres morfológicos a *M. galloprovincialis* del hemisferio norte. Ahora bien, se han detectado fósiles de *Mytilus* sp en Australia, Nueva Zelanda y Sudamérica, lo cual sugiere que tales poblaciones pueden ser nativas, más que introducidas por el hombre (McDonald et al., 1991).

En la costa del Pacífico de América del Norte, se encuentran poblaciones de *Mytilus* que por mucho tiempo se denominaron *M. edulis* (Ahmed y Sparks, 1970; Tracey et al., 1975; Bayne, 1976b; Shepard Oldroyd, 1978; Haderlie y Abbott, 1980), pero de acuerdo con datos recientes, obtenidos a partir de análisis morfométricos de sus conchas y de diversos loci enzimáticos, aparentemente no existe dicha especie, por lo menos no es el típico *M. edulis* de la costa del Atlántico. Las poblaciones analizadas del Pacífico norte parecen corresponder a las especies *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*. Y tales especies forman híbridos en el norte de California (McDonald y Koehn, 1988; McDonald et al., 1991).

Algunos autores han señalado que *M. californianus* y el mejillón, que por mucho tiempo se denominó *M. edulis*, pueden coexistir en sitios próximos a las desembocaduras de ríos y arroyos, pero no se cuenta con registros de híbridos, lo cual hace pensar que si se llegan a presentar son escasos y no constituyen poblaciones importantes, a diferencia de lo que ocurre en Europa con los híbridos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Ahmed y Sparks, 1970; Tracey et al., 1975).

La identificación fácil de *M. californianus* y el hecho de que no existen evidencias de que forme híbridos interespecíficos, hacen que dicha especie sea atractiva desde el punto de vista experimental. Por otro lado, se sabe que otras especies de *Mytilus* están muy próximas filogenéticamente, lo que también es de interés experimental, porque significa que si se trabajara con alguna de ellas en Baja California, México, entonces tal vez dichos resultados pudieran reproducirse tanto en otras poblaciones de la misma especie como de especies distintas. Desde luego se tendría que comprobar que la sensibilidad de las especies a los mutágenos fuera similar.

Desde un enfoque citogenético se conoce un solo reporte amplio de *Mytilus californianus* en el cual se determina el número cromosómico diploide de 28 a partir de observaciones realizadas en ovocitos fecundados y en embriones de pocas células (Ahmed y Sparks, 1970). En ese trabajo se muestran los cariotipos realizados con cámara lúcida y se indica que los tipos de cromosomas son: tres pares de acrocéntricos y 11 pares que son metacéntricos y submetacéntricos, sin precisar cuantos de uno u

otro tipo. Mencionan que los cromosomas telocéntricos sólo son detectados una vez. En ese trabajo también se analiza al supuesto *M. edulis* y se señalan las mismas características cromosómicas.

En cuanto a *M. edulis* existe un mayor número de reportes; Lubet (1959) en un estudio de meiosis detecta 14 bivalentes. Después, Menzel (1968) al estudiar organismos colectados en la costa este de Estados Unidos, señala que éstos poseen 24 cromosomas metafásicos, éste dato queda dentro del marco de un amplio trabajo en donde se da a conocer el número de cromosomas de diversas especies sin realizar análisis de cariotipos. Sin embargo otros autores estudian posteriormente a *M. edulis* y detectan 28 cromosomas (Ieyama e Inaba, 1974). Los tipos de cromosomas observados en las poblaciones de Irlanda e Inglaterra son: seis pares de metacéntricos y ocho pares entre submetacéntricos y subtelocéntricos (Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986).

En las poblaciones de Francia otros autores encuentran dos pares de metacéntricos, seis de submetacéntricos y seis de subtelocéntricos (Thiriot-Quévrevaux y Ayraud, 1982; Thiriot-Quévrevaux, 1984a). A pesar de lo anterior, Hinegardner (1974) en una publicación acerca del contenido de ADN en moluscos indica que *M. edulis* tiene un número haploide de 12 cromosomas ($2n = 24$). Dato que quizá proviene del trabajo de Menzel (1968), aunque no lo cita. Parece ser que Menzel (1968) cometió un error en la determinación del número cromosómico de *M. edulis*, lo cual informó por medio de una comunicación personal a Moynihan y Mahon (1983).

En cuanto a *M. galloprovincialis* es Lubet (1959), quién

establece que posee 14 cromosomas bivalentes. Posteriormente Thiriot- Quiévreux y Ayraud (1982) presentan su cariotipo a partir de cromosomas metafásicos obtenidos de branquias y señalan que la única diferencia que existe con respecto a *M. edulis* está en el cromosoma 2 que en *M. galloprovincialis* es telocéntrico mientras que *M. edulis* es metacéntrico, el resto del cariotipo es similar; ésta información que luego fue ratificada por Thiriot-Quiévreux (1984a, b) es discutida después por Dixon y Flavell (1986) quienes estudian comparativamente a las dos especies citadas y no encuentran disparidades en el par cromosómico 2. Cabe aclarar que Dixon y Flavell (1986) analizan *M. galloprovincialis* provenientes de Venecia en tanto que Thiriot-Quiévreux y Ayraud (1982) y Thiriot-Quiévreux (1984a, b) examinan ejemplares de Francia.

En otro estudio realizado con mejillones de Galicia, España, que supuestamente son *M. galloprovincialis* se observa desde un punto de vista citogenético, que dichos organismos son más parecidos a los de Venecia que a los de Francia (Pasantes et al., 1990).

En varios reportes se ha mostrado que algunas de las discrepancias detectadas por diversos autores, seguramente pueden ser aclaradas con trabajos mas finos de tipo cuantitativo y con análisis de bandas en cromosomas metafásicos de excelente calidad (Dixon y Flavell 1986; Méndez et al., 1990). Mediante este último método se detectarían pequeños cambios cromosómicos tales como: inversiones, translocaciones y deleciones (Moore et al., 1986).

La información antes mencionada permite llegar a la idea de que las distintas especies de mejillones presentan más semejanzas

que diferencias en el aspecto cromosómico y las existentes aparentemente son tan pequeñas que es difícil detectarlas de manera inmediata.

LA IMPORTANCIA ECONOMICA DE LOS MEJILLONES

Para aproximarse a la importancia económica de los mejillones se puede indicar que en 1971 se cosecharon en el mundo 370,000 toneladas; del total, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* contribuyeron con el 76% sólo en la costa Atlántica de Europa (Mason, 1976).

En algunos países los mejillones no se emplean como alimento, pero en otros sitios se les tiene tanto aprecio que llegan a ser cotizados tan alto como las ostras. Tal situación ocurre en países de Europa y en algunos de América, como Chile y recientemente en el noroeste de Baja California (BC) en México (Bernáldez, 1987; García-Pámanes, 1990).

La explotación de estos organismos consiste en colectarlos directamente de las poblaciones silvestres en BC, principalmente se colecta a *M. californianus*, sin ningún control, lo que por cierto puede causar daños en las poblaciones ya que con este sistema se eliminan a muchos de los progenitores potenciales. Otra forma de explotación es mediante cultivos, para lo cual se requiere de una fuente de progenitores para obtener gametos y larvas ó bien colectar larvas silvestres y luego sembrarlas. Lo anterior se ha intentado en BC, con las especies *M. californianus* y la denominada *M. edulis*, que de acuerdo con información reciente parece ser que es *M. galloprovincialis*, pero esta última es la que mejores resultados ha brindado (García-Pámanes, 1990). En cualquiera de las formas se requiere del manejo escrupuloso tanto de los progenitores como de los gametos, ya que para alcanzar niveles altos de producción se necesita de poblaciones sanas y vigorosas, cuyos descendientes se desarrollen rápido, alcancen

tallas grandes y sean resistentes a la agresión de parásitos, infecciones bacterianas y de diversas enfermedades (García-Pámanes y García-Pámanes, 1987).

Desde el punto de vista ecológico, los mejillones son de interés porque se alimentan directamente de algunas especies de microalgas y bacterias, de partículas orgánicas e inorgánicas en suspensión, de las que algunas son contaminantes. Por otra parte, se considera que los mejillones convierten más eficientemente los nutrientes y producen más por unidad de área que las especies de niveles tróficos superiores. Por ejemplo, en Europa durante el verano y el otoño *M. edulis* fija entre el 20 y el 30% de la materia orgánica y la convierte en carne (Mason, 1976).

LA MUTACION Y SU RELACION CON EL CANCER Y LAS MALFORMACIONES CONGENITAS. (Aspectos generales, así como particulares en los organismos acuáticos, incluyendo a los mejillones).

El fenómeno de la mutación ha interesado a la humanidad porque debido a él se originan nuevas características en los seres vivos, algunas de ellas pueden ser benéficas, otras son neutras, esto es que no son ni ventajosas ni desventajosas para los organismos, simplemente los hacen diferentes y por último están las que provocan desventajas, que se manifiestan en formas o funciones patológicas y que incluso llevan a la muerte.

La mutación también desencadena en los animales (incluyendo al hombre) la transformación de las células normales en cancerosas, para iniciar muchos de los distintos tipos de cáncer.

Por su parte, las malformaciones congénitas pueden ser ocasionadas por mutaciones, pero también por otros mecanismos distintos a la mutación. De tal forma que no siempre se establecen una relación directa entre la mutagénesis y la teratogénesis.

Un aspecto general que hoy preocupa acerca del ambiente es el precisar a cuales agentes se está expuesto, que posean propiedades mutagénicas, carcinogénicas y teratogénicas; así también es de interés el estudiar sus mecanismos de acción, su distribución y la forma de evitarlos o contrarrestarlos.

LA MUTACION

Las mutaciones han ocurrido a lo largo de la historia de la vida en todos los tipos de seres; ninguna especie ha escapado a ella. Incluso se puede decir que los procesos mutacionales junto con los otros mecanismos de la evolución como la selección natural, la migración y la deriva genética, por citar solo los mas importantes, son los responsables directos de la diversidad

biológica del pasado y del presente.

El término mutación, acuñado a principios de siglo por Hugo de Vries, surge a partir de las observaciones de los cambios que ocurren repentinamente en las plantas del género *Oenothera*. Tal expresión se ha conservado a pesar de que ahora se sabe que esos cambios no correspondían a mutaciones *sensu stricto* (Auerbach, 1973).

Por mutación se entiende al cambio que ocurre en el material genético y que puede ser en cantidad y/o calidad. Algunos autores han clasificado a las mutaciones de acuerdo con sus efectos en los individuos en: letales, subletales, neutras o neutrales y ventajosas o favorables. Otros autores han preferido clasificarlas según el tipo de modificación que sufre el material genético y las han agrupado en: génicas y cromosómicas (Ayala y Kiger, 1984).

En las mutaciones génicas se afecta uno o pocos de los nucleótidos de un gen, de tal modo que los nucleótidos pueden ser eliminados, añadidos o sustituidos.

Las mutaciones cromosómicas a su vez pueden ser aquellas que involucran cambios en el número de los cromosomas o en la ubicación y número de los genes en un cromosoma.

Las mutaciones pueden ser causadas por agentes físicos, químicos y biológicos, algunos de los cuales son naturales y otros son producidos por el hombre (Tabla II).

TABLA II. Tipos de agentes mutagénicos y ejemplos

Agentes físicos: rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta.

Agentes químicos: mitomicina C, colchicina, actinomicina D.

Agentes biológicos: virus SV40, virus *Herpes simplex*,
virus de la Rubeola.

Tal vez el primer experimento diseñado para provocar mutaciones mediante agentes químicos es el realizado por Morgan en 1914, quién toma por organismo experimental a *Drosophila* y prueba en éste el éter y el alcohol. Parece ser que se falla en ese primer intento. Algunos años después, durante la década de 1920, Muller descubre el potencial de las radiaciones ionizantes como agentes mutagénicos y desarrolla el concepto de tasa de mutación (Auerbach, 1973). Desde entonces, se han establecido diversos sistemas de prueba para detectar mutágenos (Tablas III y IV).

La importancia de identificar a los mutágenos radica en el hecho de que las mutaciones pueden tener diversos efectos en los individuos y en las poblaciones. A nivel individual los mutágenos posiblemente afectan gónadas y reducen la viabilidad de los gametos. Luego, si los espermatozoides y ovocitos son viables, quizá presenten fertilidad reducida y en caso de que lleguen a la fecundación pueden aportar genoma dañado que tal vez forme cigotos y embriones con pocas posibilidades de sobrevivir y con malformaciones. En caso de que los productos alcancen la edad adulta, los organismos resultantes pueden ser infértiles, frágiles o malformados (Fig. 2).

Si la mutación afecta a un tejido u órgano del adulto, puede provocar que una célula normal se transforme en cancerosa, lo cual desencadenaría la formación de algún tipo de tumor, que afectarían entonces las expectativas reproductoras y de sobrevivencia del organismo (Legator y Ward, 1984).

A nivel de población las mutaciones son importantes porque tienen la posibilidad de transmitirse a las siguientes generaciones, con lo que el lastre genético de cada población

TABLA III. SISTEMAS DE PRUEBA PARA LA DETECCION Y EVALUACION DE MUTAGENOS

SISTEMA	TIPO DE ALTERACION
ADN	Rompimientos en las cadenas y otros cambios
VIRUS	Mutaciones en genes e induccion de profagos
BACTERIAS: <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Mutaciones génicas diversas (desfasamientos, transiciones, eliminaciones)
HONGOS: <i>Neurospora crassa</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas (delecciones, duplicaciones, no disyunción, desfasamientos, transiciones,...)
PLANTAS: <i>Vicia faba</i> <i>Tradescantia paludosa</i>	Aberraciones cromosómicas y micronúcleos. mutaciones génicas
INSECTOS: <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Habrobracon juglandis</i>	Aberraciones cromosómicas, mutaciones génicas y recombinación mitótica
CULTIVOS CELULARES DE MAMIFERO: (Hela, CHO, Linfocitos)	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, locus específico
MAMIFEROS INTACTOS: Ratón Rata Humanos	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos, locus específico

Tabla IV. Ejemplos de sistemas de prueba propuestos para la evaluación de mutágenos en ambientes acuáticos

SISTEMA	MUTAGENO	TIPO DE ALTERACION
PECES:		
<i>Umbra limi</i>	CF	ICH
	MMS	ICH
	RX	AC
<i>Umbra pygmaea</i>	MMS	Mn
MOLUSCOS:		
<i>Mytilus edulis</i>	MMS	ICH
	MMC	ICH y AC
<i>M. galloprovincialis</i>	VC	Mn
	BaP	Mn y AC
Poliquetos:		
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	MMC	ICH

Abreviaturas: intercambio de cromátidas hermanas (ICH), aberraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (Mn), ciclofosfamida (CF), metilmetanosulfonato (MMS), mitomicina C (MMC), vincristina (VC), benzofalpireno (BaP), rayos X (RX)

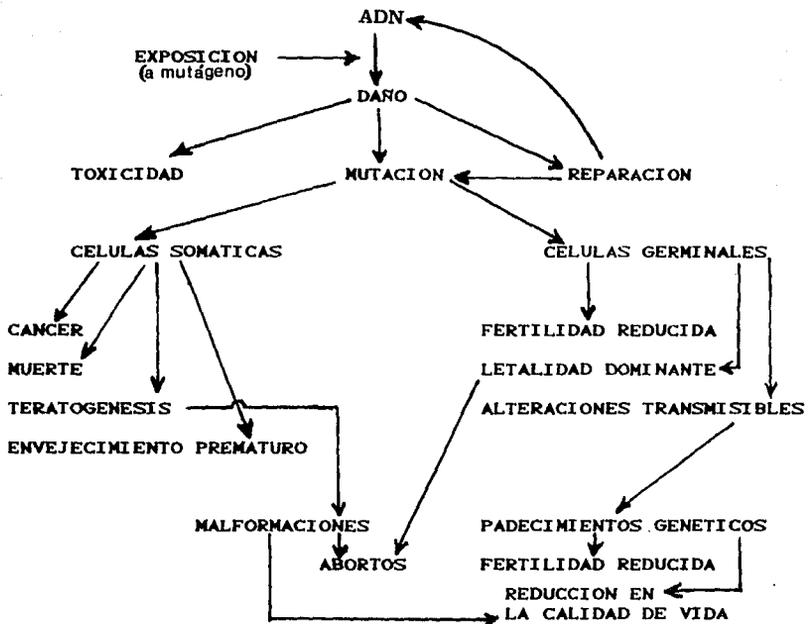


Fig. 2. Posibles manifestaciones de las mutaciones en el hombre y otros seres. (Modificado de Tice, 1984).

tiende a incrementarse y entonces el patrimonio genético acumula genes desventajosos, principalmente de tipo recesivo.

Si la tasa de mutación se incrementara de manera significativa, la población puede entrar a una situación de alto riesgo para su propia continuidad.

La exposición a mutágenos puede ser accidental, experimental, ambiental, laboral, etc., pero los dos últimos son los que mayor preocupación han causado.

De la exposición ambiental es difícil escaparse ya que en principio hay un problema: ¿cómo evadir aquellos peligros que no están plenamente identificados? Nosotros y otros seres estamos expuestos al ambiente a través del aire que respiramos y toca nuestra piel, del agua que bebemos y utilizamos para las actividades cotidianas en el hogar y el trabajo y también a través de los alimentos que consumimos.

Por su parte el aspecto laboral es casi imprescindible en la vida humana y éste frecuentemente acarrea riesgos que muchas veces se desconocen, por ejemplo en algunas industrias los obreros entran en contacto con disolventes, pegamentos, metales, entre otros; en el campo los trabajadores establecen contacto con herbicidas, insecticidas, nematocidas, fertilizantes y diversos agroquímicos (Tice, 1984).

LA MUTACION EN LOS ORGANISMOS ACUATICOS

El fenómeno de la mutación a la fecha se ha estudiado principalmente en organismos terrestres, en tanto que los acuáticos se comienzan a estudiar desde este enfoque, a partir de la década de los setenta. Algunos trabajos están motivados por la posibilidad de inducir mutaciones aprovechables en el cultivo de

organismos importantes económicamente como es el caso del ostión *Crassostrea virginica*. En esta especie se aplican radiaciones gamma y se obtienen cambios morfológicos muy pequeños en las larvas; sin embargo es elevado el número de alteraciones en cromosomas y núcleos, lo cual es el daño típico de estos agentes (Longwell, 1974).

En otros moluscos como el caracol *Littorina saxatilis* se ha intentado establecer un vínculo a niveles celular y cromosómico, entre un ambiente acuático de calidad reducida y el índice de anomalías embrionarias, detectándose que los embriones malformados presentan gran cantidad de células con núcleos interfásicos con cromatina muy condensada, característica de heteroploidosis, lo cual ha sido interpretado como indicativo de muerte o degeneración celular. Así también se establece mediante microdensitometría un decremento de hasta el 50% de ADN en algunos de los núcleos anormales (Dixon et al., 1985).

Los poliquetos de la especie *Neanthes arenaceodentata* son utilizados por primera vez para probar un mutágeno químico, la mitomicina C (MMG), que induce intercambios de cromátidas hermanas, en igual forma que a los mamíferos (Pesch y Pesch, 1980). También se ensaya en ellos las radiaciones gamma y sus efectos en las células y los organismos completos, en éstos se analiza la reducción en la tasa reproductora y la mortalidad. Los autores de tales trabajos sugieren que los poliquetos representan un sistema experimental adecuado para los estudios de mutagénesis en los ambientes marinos, sin embargo poco se ha avanzado en esta orientación, quizá por las características de movilidad de los organismos, su tamaño u otras razones.

El nemátodo de vida libre *Panagrellus redivivus* también genera expectativas en el sentido de que pudiera emplearse como sistema para detección de mutágenos en ambientes acuáticos debido a la facilidad que presenta para la identificación de mutaciones en diversos loci, por ejemplo algunos ubicados en el cromosoma X (Samoiloff et al., 1980) no obstante se le ha empleado poco.

Dentro de los invertebrados marinos, los erizos ocupan un lugar especial por lo mucho que se conoce de su biología. Uno de los aspectos que más se ha trabajado es el relativo a la embriogénesis, bajo condiciones normales y experimentales. De manera complementaria a la evaluación de anormalidades embrionarias en *Sphaerechinus granularis* y *Paracentrotus lividus* (Pagano et al., 1985a, b; Cipollaro et al., 1986) se han revisado los efectos citogenéticos de agentes como el arsénico y cambios en pH, entre las alteraciones analizadas están: puentes anafásicos, isocromosomas, cromosomas retardados (o con centrómero inactivado, expresión propuesta por Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1983; Villalobos-Pietrini y Gómez-Arroyo, 1983).

Diversas especies de peces se han propuesto como modelos para la evaluación de mutágenos, entre ellas hay varias dulceacuícolas. Una es *Umbra limi* en la que se han analizado los efectos de las radiaciones X que provocan aberraciones cromosómicas (Kligerman et al., 1975) y también se ha examinado la capacidad de agentes como el metil metanosulfonato, la ciclofosfamida y el endrin para inducir intercambio de cromátidas hermanas (Kligerman y Bloom, 1976; Kligerman, 1979; Kligerman et al., 1984; Vigfusson et al., 1983). La especie *Umbra pygmaea* se ha utilizado en Europa para analizar los efectos mutagénicos de las aguas del río Rhin y de

agentes como el etil metanosulfonato (Prein et al., 1978; Alink et al., 1980; Hooftman y de Raat, 1982). Sin embargo, las especies de *Umbra* presentan el inconveniente de que no se obtienen fácilmente en los sitios donde interesa realizar las evaluaciones.

A *Nothobranchius rachowi*, también dulceacuicola, se le ha propuesto como una alternativa a *Umbra limi* y *U. pygmaea*, ya que mientras éstas últimas poseen 22 cromosomas, la primera sólo tiene 16; así mismo se ha señalado que otra ventaja es que se puede cultivar más fácilmente bajo condiciones de laboratorio (Hooftman, 1981; Van der Kerkhoff y Van der Gaag, 1985). Existen más peces de agua dulce que se han estudiado desde el enfoque de la mutagénesis, tales como la mojarra agalla azul *Lepomis macrochirus* y la trucha arcoiris *Salmo gairdneri*, actualmente denominada *Oncorhynchus mykiss*, de la que existen varias subespecies. De éstas últimas, las truchas son las que más atención han recibido, quizás por su importancia económica y alimentaria y porque en ellas se ha observado cierta susceptibilidad para padecer distintos tipos de cáncer y de malformaciones (Shugart, 1988).

Diversos peces marinos se han propuesto como sistemas de prueba para la evaluación de mutágenos entre ellos destaca *Opsanus tau* porque se le ha trabajado tanto *in vivo* como *in vitro*. En este pez se han analizado aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y daño al ADN. Uno de los aspectos de mayor interés es que se le puede coleccionar en los estuarios y se le mantiene en acuarios durante semanas, de tal suerte que también se emplea en trabajos *in situ*, además de los experimentos *in vivo* bajo condiciones de acuario e *in vitro* (Kelly y Maddock, 1985; Ellingham et al., 1986; Guobaitis et al., 1986; Maddock et al.,

1986).

Fundulus heteroclitus es un pez marino que en años recientes se ha empleado como modelo en mutagénesis y teratogénesis; éste se colecta fácilmente en las costas del Atlántico de Estados Unidos y se puede mantener en acuarios. Parece ser tan atractivo como *Opsanus tau*, pero los estudios son escasos desde el enfoque de la mutagénesis (Means et al., 1988; Perry et al., 1988). Y así como se ha experimentado con varias especies en Estados Unidos y Europa, en India se ha propuesto como modelo a *Boleophthalmus dussumieri* que es un pez disponible en las costas de Bombay, de tamaño relativamente pequeño, abundante, fácil de mantener en el laboratorio y con un cariotipo de 46 cromosomas (Krishnaja y Rege, 1982).

Los peces se han empleado ya como centinelas en la detección de mutágenos en el mar. Una de las investigaciones realizadas in situ es de la zona del sur de California, en la proximidades de Los Angeles, en donde se colectaron las especies *Genyonemus lineatus* y *Paralabrax clathratus* (Hose et al., 1987). Otro trabajo fue llevado a cabo en la costa este de Estados Unidos en la especie *Pseudopleuronectes americanus* (Hughes y Hebert, 1991). En los estudios se analizó la frecuencia de micronúcleos, principalmente porque es independiente del cariotipo de las especies. Un dato interesante es que se registraron dos tipos de micronúcleos: uno fue el típico señalado por Heddie (1973) que es redondo y separado del núcleo principal y el otro es redondo o algo semirredondo y está muy próximo e incluso adherido al núcleo. La segunda anomalía ha sido referida previamente por Hose et al. (1987) en un estudio efectuado con truchas.

Sería difícil citar todos los intentos para obtener sistemas de prueba en la mutagénesis de los ambientes acuáticos, tanto dulceacuícolas como marinos, sin embargo los trabajos que en párrafos anteriores se señalan reflejan esta historia. Un enfoque distinto, pero tal vez complementario es el que consiste en obtener extractos de organismos de zonas contaminadas o bien muestras del ambiente mismo, como agua de mar o de ríos y probar sus efectos mutagénicos en líneas celulares o bacterianas, (Parry *et al.*, 1976; 1985; Kurelec, *et al.*, 1979; Odense *et al.*, 1984; Müllerschön y Miltenburger, 1986). Sólo falta por comentar lo que se ha realizado en mejillones, que tal vez son hasta la fecha los organismos más prometedores y de los que se conocen numerosos aspectos; éstos se abordarán en un capítulo aparte.

CANCER

El término cáncer se refiere a un grupo grande de tumores y de crecimientos celulares desordenados, que aparecen en diferentes órganos del hombre y de todos los seres. Es un hecho conocido que todos los tejidos y órganos pueden desarrollar tumores, que reciben diferentes nombres según donde se originen. Los que se forman en los epitelios se llaman carcinomas; los de músculo, hueso y tejido conjuntivo, son los sarcomas y los de las células sanguíneas se denominan leucemias.

Se supone que la mayoría de los tumores o neoplasias son los denominados benignos, éstos en general crecen con lentitud y no producen metástasis; es decir el traslado de células del tumor desde el órgano afectado de origen a otros órganos y tejidos. Sin embargo, aún los tumores de este tipo también son peligrosos

cuando crecen y presionan órganos y tejidos vitales, ya que afectan sus funciones. Por otra parte, los tumores denominados malignos son los que pueden presentar metástasis y extenderse a muchas partes del cuerpo. De lo referido antes lo que queda como conclusión es que ningún tumor es bueno.

Los tumores se originan cuando una célula normal se transforma en maligna, un factor importante de la alteración puede ser una mutación. Una vez transformada la célula, se divide sin control, hasta formar las masas celulares que caracterizan a los tumores. La mutación provoca cambios irreversibles de carácter hereditario, de tal modo que todas las descendientes de la primera transformada, serán similares. Dicho en otras palabras, una célula cancerosa dará lugar a otras células cancerosas (Turbiana, 1985).

Ahora bien, los tumores afectan tanto al hombre como a cualquier tipo de animal. No son un producto reciente en la historia de la vida ya que el hombre los ha presentado desde hace miles de años. De esto existen evidencias directas a partir de fósiles y de escritos antiguos, por ejemplo en los papiros de Ebers (3730 a 3710 años AC) y en las narraciones de Sushrut de los libros sagrados de la India (aproximadamente 1500 años AC) se hacen descripciones detalladas de los tumores. En manuscritos chinos antiguos también se han encontrado referencias sobre ellos, se les clasifica y hasta se abordan sus posibles causas entre las que se incluyen a traumas y el uso de ciertas sustancias en los alimentos.

Fue Hipócrates quién acuñó el término cáncer, para designar a los tumores de los epitelios, dado su parecido con la imagen de un cangrejo o langosta y también el término ^{car}sarcoma que significa

tumor carnosos, el nombre fue establecido por la semejanza que observó entre algunos tumores de tejido conjuntivo y la carne de pescado (Chaklin, 1979).

Con lo comentado se pretende destacar que el cáncer es conocido como entidad patológica desde hace muchos años y que en la actualidad lo que preocupa no es su presencia esporádica en las poblaciones, sino mas bien su elevada incidencia en algunos grupos humanos, en donde resulta necesario y urgente identificar y eliminar a los agentes causales.

Es quizás, Sir Percival Pott quién descubrió así en 1775 la primera relación fuerte entre un agente ambiental y un tipo de cáncer, al observar que los deshollinadores eran propensos a sufrir cáncer de escroto, de lo cual dedujo que la causa era la prolongada exposición al hollín que se acumulaba en los pliegues de la piel. Posteriormente se descubrieron diversos carcinógenos entre los que destacan los rayos X como causantes de leucemias y cáncer de piel, la luz ultravioleta como agente causal de cáncer de piel y labio, el tabaco relacionado con cáncer en diversas partes tales como: boca, laringe, pulmón, entre otros (Miller, 1978; Chaklin, 1979; Turbiana, 1985).

En nuestro país conviene agilizar los estudios de detección de carcinógenos ambientales, particularmente en los estados en donde es mas elevada la tasa de mortalidad por cáncer, entre los que se encuentran: Coahuila, Baja California Sur y Baja California (Verduzco et al., 1986).

Una forma de avanzar en la detección es a través de las pruebas de laboratorio para mutagénesis, ya que existen fuertes evidencias en el sentido de que muchos de los mutágenos también

provocan cáncer (Miller, 1978). Sin embargo, tal correlación debe tomarse con reservas ya que existen mutágenos que no ocasionan cáncer y también se conocen carcinógenos que no son mutágenos, es por ello que únicamente se puede afirmar que un mutágeno es sólo eso y no necesariamente un carcinógeno (Nestmann, 1986).

CANCER EN ORGANISMOS ACUATICOS

En diversos grupos de organismos acuáticos (pelecipodos, gasterópodos, cefalópodos y peces) se han descrito tumores, sin embargo, muchos de estos trabajos no incluyen análisis histopatológicos bien interpretados que permitan distinguir entre una neoplasia y un proceso inflamatorio, como el que se puede generar como consecuencia de una infección o una lesión (Pauley, 1969).

Las neoplasias han sido mencionadas de manera ocasional en moluscos desde 1887, pero tales reportes son mas frecuentes desde la década de los sesenta principalmente en ostiones, mejillones, almejas y peces. Los factores causales no están claros para estos grupos de organismos, aunque se supone que pueden ser algunos carcinógenos existentes como contaminantes en el ambiente y quizá también ciertos procesos virales (Brown *et al.*, 1977). En Estados Unidos se inició en 1966 un proyecto denominado registro de tumores en organismos inferiores, en atención a la creciente preocupación por los tumores detectados y por el hecho de que a partir de algunos fenómenos básicos que ocurren en organismos inferiores es posible entender con mayor facilidad lo que sucede en formas superiores (Harshbarger, 1969).

A diez años de iniciado el registro de tumores antes citado,

Harshbarger (1977), reporta que se habían recibido aproximadamente 10,000 ejemplares, de los que se diagnosticó como neoplásicos al 53%. La mayoría de las muestras fueron de peces, poco menos del 50% y en segundo término quedaron los especímenes de moluscos con el 20%. En dicho registro se tienen datos de neoplasias en casi todos los órganos y tejidos de los peces, moluscos y otros grupos de animales.

Los trabajos sobre cáncer en organismos acuáticos son tanto de tipo epidemiológico como experimental. Así, se tienen trabajos como el realizado con diez poblaciones de la almeja *Mya arenaria* en Nueva Inglaterra, Estados Unidos, que consistió en analizar histopatológicamente a 1,325 especímenes, de los cuales 159 tenían un tipo de neoplasma. La incidencia de tumores varió del 0 al 64% entre las distintas poblaciones y las características del neoplasma más frecuente son similares a las de los linfosarcomas que se presentan en vertebrados superiores. Se observó que las células neoplásicas tenían un núcleo grande y ovoide, frecuentemente lobulado, algunas veces eran binucleadas, con cromatina compactada. Tales células invadieron los tejidos adyacentes y también fueron localizadas en distintos órganos, estos datos llaman la atención porque algo similar ocurre con la metástasis en vertebrados. Otro dato es que se observaron numerosas mitosis en las células neoplásicas en más del 60% de almejas (Brown et al., 1977). Esto último es de interés ya que en los padecimientos denominados granulocitomas, que son un tipo de inflamaciones no-neoplásicas, en general no se detectan mitosis ni células gigantes multinucleadas (Lowe y Moore, 1979).

En otro estudio llevado a cabo en Bahía Yaquina de Oregon,

EUA, sobre la frecuencia de neoplasias en el ostión *Ostrea lurida* se encontró una incidencia de aproximadamente el 2% en dos muestras de mas de 100 organismos nativos, mientras que no se observó ninguna neoplasia en 1,426 ejemplares de la misma especie, pero importados de otros sitios. Una característica común en los tejidos afectados fue un tipo de célula muy grande, que otros autores ya habían reportado con anterioridad en neoplasias de *Ostrea lurida* y del mejillón *Mytilus edulis* (Mix et al., 1977).

Un trabajo desarrollado de manera conjunta por Canadá, Estados Unidos y Japón, acerca de la incidencia de neoplasmas en diversas especies de peces del mundo reveló que un tipo de papiloma de piel es frecuente en el Océano Pacífico mientras que en las costas del Atlántico prácticamente no existe. Luego, de las poblaciones estudiadas en el Pacífico destacan las de las cercanías de Los Angeles, California, en donde se detectó de 0.1 al 2.6% en tanto que no se registró ningún neoplasma en muestras de cinco especies colectadas en Bahía Magdalena, Baja California Sur. En los ejemplares provenientes de lugares de Canadá y Estados Unidos considerados con poca contaminación se apreció del 0 a 0.1% mientras que en sitios próximos a ciudades importantes como Vancouver, Seattle y San Francisco es muy elevada la frecuencia pues llegan al 58.6, 15.0 y 29.0%, respectivamente. Los datos citados representan sólo los extremos, pero lo que se concluye de tales cifras es que existe una fuerte correlación entre la aparición de cáncer en peces y el grado de contaminación del ambiente y la presencia en éste de carcinógenos o de los denominados agentes promotores de cáncer (Stich et al., 1977). En otros trabajos se ha evidenciado la correlación entre ambientes

contaminados y la frecuencia elevada de cáncer en los organismos residentes mediante análisis histopatológicos y estudios sobre el contenido de tóxicos en los carcinomas, algunos carcinógenos detectados son benzoflpireno y benzoflantraceno (Baumann y Harshbarger, 1985).

La información referida sobre epidemiología de neoplasmas ya contaba con un fuerte fundamento en cuanto a la caracterización en moluscos (ostiones, mejillones, almejas), peces y otros, basado en análisis histopatológicos y citológicos, realizados tanto en el nivel de microscopía óptica como electrónica. Tales análisis en la mayoría de los casos revelaron células con núcleos más grandes que los normales, algunas veces lobulados e irregulares, con uno o más nucleólos, la cromatina con frecuencia presentó heteroplicnosis, también se detectaron células gigantes multinucleadas, así como un número excesivo de mitosis (Farley, 1976; Frierman, 1976; Harshbarger, 1976; Yevich y Barszcz, 1976).

Dentro de los organismos dulceacuícolas las truchas y otros salmónidos ocupan un sitio especial debido a que se cuenta con un amplio conocimiento sobre su biología, su mantenimiento en cautiverio y quizás la razón principal es por su alta sensibilidad a carcinógenos. Un tipo de cáncer en hígado apareció con elevada frecuencia en la trucha arcoiris cultivada en Estados Unidos entre 1957 y 1960, esto motivó la realización de numerosos trabajos que culminaron en el descubrimiento del carcinógeno que fue la aflatoxina B₁, que es producida por el hongo *Aspergillus flavus*. Dicho hongo se encontraba presente en los alimentos concentrados, básicamente en la parte obtenida de semilla de algodón. Tal información coincidió con las investigaciones realizadas

previamente en Europa, donde se identificó a las micotoxinas como responsables de necrosis aguda en el hígado de los pavos. Las aflatoxinas, el benzofalpyreno y otros agentes se convirtieron en un campo amplio de investigación sobre carcinogénesis en peces, uno de los principales sistemas de prueba es la trucha arcoiris *Salmo gairdneri*, que actualmente se denomina *Oncorhynchus mikiss* (Sinnhuber et al., 1977; Black et al., 1988; Metcalfe et al., 1988).

Por otra parte, diversas especies de peces pequeños, como los de acuario, se han propuesto como sistemas de experimentación en carcinogénesis, entre ellas se encuentran *Poecilia reticulata*, *Orzias latipes*, *Cyprinodon variegatus* y *Fundulus grandis*, por citar sólo algunos ejemplos. Estos se han escogido por la facilidad de colecta, de mantenimiento en cautiverio y crianza, así como por lo sencillo de su manejo durante la experimentación y por su respuesta positiva ante carcinógenos conocidos (Courtney y Couch, 1984; Ishikawa et al., 1984; Zimmerer, 1984).

En la década de los ochenta se introducen nuevos métodos para el estudio del cáncer, uno es la citofluorometría que permite evaluar el grado de ploidía que tienen las células neoplásicas. Sin embargo este procedimiento no reemplaza a los tradicionales de la Citología y la Histología (Elston et al., 1988). Otro adelanto técnico es la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de neoplasia hematopoyética en almejas (Reinish et al., 1988; Smolowitz y Reinish, 1988). Un avance más es la identificación y caracterización de oncogenes como por ejemplo el c-myc de trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mikiss*) que tiene semejanza con los oncogenes c-myc de gallina y de humano

(Van Beneden et al., 1988); otro oncogene es c-Ki-ras y su relación con cáncer en el pez *Pseudopleuronectes americanus* (McMahon et al., 1988).

MALFORMACIONES CONGENITAS

Las malformaciones congénitas han sido registradas por diversas culturas de la antigüedad a través de sus pinturas y esculturas, en donde se aprecian dedos supernumerarios y malformaciones craneofaciales, entre otras. Pero es hasta la década de 1920 cuando se establece la primera correlación entre un agente físico, los rayos X, y malformaciones congénitas en niños recién nacidos con circunferencia craneal pequeña y retardo mental. Tiempo después se establecen correlaciones múltiples en humanos, como por ejemplo las siguientes: el virus de la rubéola con cataratas congénitas y otras alteraciones y la talidomida con brazos reducidos y diversas malformaciones (Miller, 1978).

En la actualidad se conocen numerosos padecimientos tanto de origen genético como ambiental o de una combinación de ambos que entre sus características se encuentran una o mas malformaciones corporales. Se ha estimado que en los humanos el 10% de las malformaciones tiene por origen una mutación *de novo*, el 20% es de segregación mendeliana (monogénica), el 60% es causado por genes múltiples (herencia poligénica) y el 10% es provocado por factores ambientales (Swanson, 1981).

En nuestro tiempo resulta difícil establecer pruebas de laboratorio para la detección de teratógenos que posean un elevado poder predictivo, ya que existe una correlación escasa y débil entre la mutagénesis y la teratogénesis, mientras que hay una

correlación elevada entre mutagénesis y carcinogénesis. Esto se debe a que existe gran diversidad de mecanismos relacionados con la teratogénesis.

Algunos autores han señalado que la teratogénesis implica un cambio en tejidos u órganos enteros, mientras que la carcinogénesis y la mutagénesis se deben a un hecho raro estadísticamente, que en general ocurre primero en sólo una célula. Los teratógenos interfieren con la función de gran cantidad de células, pero no necesariamente alteran la información genética en ellas.

Pocos teratógenos ambientales son también carcinógenos y la carcinogenicidad de algunos no está bien probada, por ejemplo el alcohol. A su vez, este agente, la radiación ionizante y los andrógenos, aparentemente inducen cáncer por medio de un proceso diferente del incluido en la teratogénesis. Sin embargo se conocen agentes excepcionales tales como DES, que provocan malformaciones en el tracto genital de mujeres y ocasionalmente puede dar lugar a cáncer en el mismo sitio (Miller, 1978).

MALFORMACIONES CONGENITAS EN ORGANISMOS ACUATICOS

Se han llevado a cabo numerosos estudios tanto de campo como de laboratorio en diversos grupos de organismos, tales como: gasterópodos, bivalvos y peces. Por ejemplo, dentro de las investigaciones de campo se exploran en Inglaterra las poblaciones de gasterópodos como *Littorina saxatilis* que habitan ambientes marinos contaminados, detectándose una frecuencia alta de malformaciones en embriones tales como anormalidades en concha, masas celulares separadas del cuerpo principal y otras (Dixon y Pollard, 1985; Dixon et al., 1985). En uno de esos trabajos también

se analizó a las células de los embriones malformados y se detectó que muchas de ellas presentan heteropicnosis y disminución en el contenido de ADN (Dixon *et al.*, 1985). Otros gasterópodos propuestos son las especies del género *Nucella* (*N. lamellosa*, *N. emarginata*, *N. lima* y *N. canaliculata*) que son abundantes en la costa del Pacífico de Canadá, en Inglaterra y otras regiones del mundo. Algunos autores han señalado que la sobrepuesta de características sexuales masculinas sobre las femeninas en el mismo individuo (fenómeno designado imposex) es un indicador de la presencia de concentraciones elevadas de tributilina (TBT). Tal contaminante se encuentra en las zonas de mucho tráfico de embarcaciones y en esos sitios se ha detectado hasta un 100% de imposex, mientras que en zonas con escaso tráfico puede ser 0%, no obstante los resultados no siempre presentan esta correlación ya que en lugares considerados limpios es posible registrar frecuencias altas. Lo cual hace que el fenómeno de imposex requiera de ser estudiado en su fundamentación biológica y en los mecanismos básicos (Ellis y Pattinson, 1990; Saavedra Alvarez y Ellis, 1990; Bryan y Langston, 1992). El efecto teratogénico de la TBT ha resultado positivo en otros organismos como el cangrejo *Uca pugilator* (Weis y Kim, 1988).

Diversos agentes se han probado en cuanto a su capacidad teratogénica en otros sistemas; cuando los gametos y los cigotos de la almeja *Spisula solidissima* son expuestos a nitrato de plata, se obtienen numerosas anormalidades en las larvas (Eyster y Morse, 1984).

En los erizos de mar también se han revisado los efectos teratogénicos de agentes como el cloranfenicol y distintos pH

inducidos por ácidos inorgánicos como el clorhídrico y el sulfídrico (Cipollaro et al., 1986; Fujiwara y Yasumasu, 1974; Pagano et al., 1985a, b).

La trucha arcoiris *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) y el salmón *Oncorhynchus kisutch* también han sido de utilidad en el estudio de las anormalidades provocadas por agentes como benzofalpireno (Ostrander et al., 1988).

Además de malformaciones en embriones y adultos, también se han correlacionado los contaminantes ambientales con otros fenómenos como son las alteraciones en el comportamiento de las almejas al hacer las madrigueras (Phelps et al., 1985).

MUTACION, CANCER Y MALFORMACIONES EN MEJILLONES DEL GENERO *Mytilus*

Los mejillones son organismos que han motivado el estudio de la mutación por múltiples razones: su capacidad de bioacumular y bioconcentrar contaminantes, su amplia distribución, su fácil manejo, su número aceptable de cromosomas, entre otras.

Durante la década de los setenta, cuando se propusieron y desarrollaron trabajos de gran magnitud en la evaluación de los contaminantes en el medio marino (Goldberg et al., 1978; Bayne et al., 1980) mediante el empleo, como organismos centinelas, de varias especies de bivalvos, entre ellas los mejillones del género *Mytilus*, también se consideró hasta que grado los mejillones contendrían mutágenos así se obtuvieron extractos de sus cuerpos y se probaron con el sistema bacteriano de Ames (Parry et al., 1976; Odense et al., 1984). El esquema de trabajo citado lo único que señala es hasta que grado los extractos son mutagénicos para las bacterias, pero no indica en cuanto pueden ser afectados los

organismos que habitan en el medio marino, lo cual representa otra pregunta, que para resolverse requiere de un buen modelo, como se supone que es el mejillón.

En los primeros trabajos se emplearon mejillones *Mytilus edulis* de la costa de California, EUA, con el fin de ver la posibilidad de analizar intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en larvas expuestas a bromodesoxuridina (BrdU), mitomicina C y metilmetanosulfonato (Harrison y Jones, 1982; Jones y Harrison, 1987). Otros se llevaron a cabo en Inglaterra, donde Dixon (1982) examina las aneuploidias que presentaban los embriones obtenidos en laboratorio a partir de gametos de organismos colectados en una zona contaminada; no fue posible evaluar aberraciones cromosómicas estructurales porque a la mayoría de las células no se les pudo hacer el cariotipo. De manera paralela se realizaron ensayos con organismos adultos de talla pequeña, que se trataron con mitomicina C y a BrdU, con el propósito de examinar intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en células de primera división, los resultados logrados indican que quizás se pudieran realizar evaluaciones de campo si se resolvieran dos problemas: 1) incrementar la cantidad de células de segunda división y 2) desarrollar un procedimiento de exposición a la BrdU aplicable *in situ* (Dixon y Clarke, 1982). Esos problemas fueron comentados después en revisiones (Dixon, 1983; Moore *et al.*, 1986).

En un experimento llevado a cabo después, se estudiaron los efectos de la ciclofosfamida (CPA) y el fenobarbital (PB) en el ICH tanto en adultos como en embriones. Se observa que la CPA incrementó la frecuencia de ICH en los mismos términos tanto en

adultos como en larvas, pero las frecuencias aumentaron cuando los organismos recibieron un pretratamiento con PB. Una limitante encontrada fue la baja producción de mitosis en adultos aún con dosis bajas de CPA (Dixon et al., 1985). En tal investigación se utilizaron organismos adultos de Whitsand Bay, Cornwall, Inglaterra y las larvas fueron obtenidas de ejemplares colectados en Tomales Bay, California, EUA. La razón para ello fue porque trabajaron de manera conjunta dos instituciones y aunque parece que para los ensayos con adultos sólo se emplearon los de Whitsand Bay, mientras que para los de larvas sólo los de Tomales Bay, lo que llama la atención es que se trataron como si fueran de una sola población y especie. Ahora bien, en aquellos años se sospechaba (aunque faltaban datos) que los supuestos *M. edulis* de California eran en realidad *M. galloprovincialis*, lo cual a la fecha está apoyado fuertemente (McDonald et al., 1991).

La especie *M. galloprovincialis* del mar Mediterráneo también ha sido utilizada en estudios de mutagénesis, en ésta se han analizado aberraciones cromosómicas en branquias de organismos adultos, que es el mismo órgano que otros autores habían reportado en *M. edulis* (Al-Sabti y Kurelec, 1985). En *M. galloprovincialis* también se observó el problema de bajo número de mitosis, de tal modo que los autores comentan el tiempo que invierten en revisar las preparaciones. Dicho problema podría resolverse de dos formas: una es con un método para incrementar el número de mitosis por preparación y la otra es mediante la evaluación del daño genético en los núcleos interfásicos, en donde es posible identificar micronúcleos.

En mejillones *M. galloprovincialis* se han analizado

miconúcleos en organismos expuestos experimentalmente a mitomicina C, cloruro de zinc y vincristina (Majone *et al.*, 1987; 1988; Scarpato *et al.*, 1990) y a varios ambientes contaminados (Brunetti *et al.*, 1988; Scarpato *et al.*, 1990). Se ha demostrado que la frecuencia de micronúcleos persiste durante semanas, lo cual sugiere que a través de su cuantificación se pueden hacer evaluaciones de la calidad ambiental en cuanto a presencia de mutágenos (Majone *et al.*, 1987; Brunetti *et al.*, 1988). La especie *M. galloprovincialis* también ofrece la posibilidad de llevar a cabo experimentos con cigotos y larvas de pocas células, al igual que *M. edulis* (Brunetti *et al.*, 1986).

En *M. galloprovincialis* se han realizado estudios acerca de la formación de complejos moleculares entre genotóxicos y ADN, los que son considerados por diversos autores como fenómenos de iniciación en la carcinogénesis. Los procedimientos para detectar los complejos se basan en la utilización de carcinógenos (benzo[*a*]pireno y 2-aminofluoreno) marcados con isótopos radiactivos o con fluorescencia. Dichos métodos ofrecen un potencial enorme para la detección de genotóxicos (Kurelec *et al.*, 1988). Otro fenómeno estudiado en la misma especie es la disminución de la actividad transcripcional de las ARN polimerasas nucleares debido a la acción de agentes como el sulfato de cobre (Viarengo *et al.*, 1982). Tal efecto, así como la formación de complejos antes citada, aunque no se consideran mutaciones, son otros tipos de genotoxicidad que ameritan estudiarse y quizá pudieran aplicarse a la investigación de los efectos de los contaminantes ambientales.

Desde un enfoque distinto se ha revisado la capacidad que

tienen los mejillones para acumular mutágenos, lo cual se ha evaluado por medio de extractos de *M. edulis* colectados en sitios contaminados como Plymouth y Mumbles y en lugares aparentemente limpios como Anglesey en Inglaterra. Los resultados señalan la presencia de agentes mutagénicos para bacterias (*Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*) sólo en los extractos de ambientes contaminados, mientras que esto no es así en los otros (Parry et al., 1976). Tiempo después en Canadá también se probaron extractos de *M. edulis* (tanto activados metabólicamente como no activados) en el sistema bacteriano de Ames (*Salmonella*) y no se detectó actividad mutagénica ni en las muestras provenientes de puertos industriales ni en las de lugares supuestamente limpios; en cambio se observó mutagenicidad en los obtenidos de organismos expuestos deliberadamente a mutágenos conocidos (Odense et al., 1984). Los diferentes resultados logrados en los trabajos mencionados, quizá se deban a la presencia o ausencia de mutágenos en los distintos ambientes de colecta o bien a diferencias no aclaradas de los diseños experimentales o tal vez a falsos positivos o falsos negativos del sistema de Ames; todo ello deberá ser resuelto para poder confiar en ese tipo de pruebas. De manera alterna es posible continuar explorando otros sistemas de prueba *in vitro*, tal y como diversos autores lo han propuesto, esto es que además de experimentar con bacterias también han ejecutado ensayos con líneas celulares de mamífero (Parry et al., 1985). En experimentos relacionados se ha demostrado que la fracción postmitocondrial de la glándula digestiva de *M. galloprovincialis* activa de forma selectiva a los carcinógenos como las aminas aromáticas, mientras que no es así con el benzofalpreneno, para convertirlos en

mutágenos que tienen efecto en *Salmonella typhimurium* (Britvic y Kurelec, 1986).

El fenómeno de la carcinogénesis en mejillones, al igual que en otros bivalvos, como ostiones y almejas, se había estudiado desde la década de los setenta desde un punto de vista citológico e histopatológico y se logran establecer correlaciones entre ambientes contaminados y alta incidencia de cáncer (Mix et al., 1977). Sin embargo, los mecanismos básicos moleculares y celulares empezaron a examinarse recientemente, por ejemplo se ha determinado que un tipo de neoplasia hémica en el supuesto mejillón *M. edulis* de California, EUA, es causada por un agente transmisible que se sospecha puede ser un retrovirus, aunque faltan evidencias (Elston et al., 1988). Las consecuencias de las neoplasias hémicas en mejillones son diversas pero una bien demostrada es que los hemocitos con núcleos enormes presentan disminución en la capacidad fagocítica, en comparación con las células de organismos sanos, lo cual puede tener relación con la elevada tasa de mortalidad que se ha registrado en los organismos con este tipo de neoplasias (Kent et al., 1989).

En mejillones se ha trabajado poco sobre teratogénesis (Martin et al., 1981), pero pudieran ser un sistema de prueba de calidad similar al de las almejas, las ostras y otros invertebrados marinos, debido a que se cuenta con información abundante acerca de los gametos, de la fecundación y del desarrollo de embriones y larvas (Bayne, 1976b).

LA CONTAMINACION EN LA COSTA DE BAJA CALIFORNIA

La contaminación ambiental ha despertado inquietudes debido a que en un tiempo muy breve de la historia del planeta, de pocas décadas, se han introducido miles de agentes químicos que han pasado a ser parte de la vida cotidiana, unos que brindan beneficios y otros perjuicios. Un dato destacado es el del registro de la Sociedad Americana de Química, que en 1977 contenía más de cuatro millones de distintas entidades químicas, con un incremento promedio de 6,000 por semana. También es notable el hecho de que en el mundo existían en esas fechas aproximadamente 70,000 agentes químicos de uso común y que la industria enviaba anualmente al mercado alrededor de mil nuevos compuestos (Maugh, 1978; Tice, 1984).

La contaminación marina se ha investigado desde diversos enfoques, uno de ellos es el de cuantificar las sustancias acumuladas en bivalvos, entre los que destacan mejillones, ostiones y almejas (Goldberg et al., 1978; Morse et al., 1985; Neff et al., 1985). Se han escogido con frecuencia a los bivalvos porque presentan gran capacidad para bioacumular o bioconcentrar los contaminantes del agua y de los alimentos y como entre estos últimos se encuentran microalgas y bacterias, que a su vez pueden contener contaminantes como metales pesados y pesticidas, entonces es posible que ocurran tanto la bioconcentración como la bioamplificación, siendo este último proceso el incremento de la concentración de los contaminantes en los tejidos de los seres vivos conforme se suceden en las cadenas alimentarias.

La costa de Baja California y en particular la zona fronteriza

ha recibido atención especial en cuanto a la contaminación del agua, aire y tierra debido a los conflictos que han ocurrido con el país vecino, así como por el interés que tiene México por exportar productos marinos y terrestres, que cumplan con los requisitos de sanidad y calidad. En la región norte de BC la calidad del agua está siendo afectada por las deficiencias en la colecta y el tratamiento de aguas residuales, tanto domésticas como industriales, así como por los desechos industriales y agrícolas.

Recientemente la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE, actualmente SEDESOL) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) se propusieron de manera conjunta, evaluar el volumen de los residuos peligrosos y de los residuos sólidos en el área fronteriza, así como la cantidad de desechos que genera la industria y la forma en que se dispone de ellos. En ese mismo sentido se han orientado algunas acciones, entre las que destaca el proyecto sobre sanidad del agua para la zona Tijuana/San Diego, cuyo costo es de varios cientos de millones de dólares (SEDUE/EPA, 1991).

Las investigaciones sobre contaminación marina en Baja California se iniciaron en la década de los setenta, se orientaron principalmente a la medición de DDT y metales (Cu y Zn) en mejillones *Mytilus californianus* (Suárez Vidal y Acosta Ruiz, 1976 a,b). En esos trabajos se detectaron concentraciones bajas de los metales al comparárseles con los datos reportados para otras regiones, así también se encontró que la distribución de las concentraciones de DDT no presentaron un patrón definido.

Poco después se estudió en la misma especie de mejillones la concentración de Aroclor 1254 que es un tipo de bifenilo policlorado (BPC) a lo largo de la costa desde Popotla, sitio próximo a la frontera, hasta Bahía San Quintín; los resultados mostraron que en las zonas más retiradas de la frontera, como San Quintín y Eréndira, no se registró BPC o bien se detectó solo como traza, mientras que en la localidad cercana a la frontera (Popotla) las concentraciones fueron de 3.1 ng/g hasta 7.3 ng/g en diferentes meses (Gutiérrez-Galindo y Cajal-Medrano, 1981). Esas cifras son muy bajas en comparación con las observadas en *M. californianus* colectados en EUA, cerca de la frontera, en La Jolla, California, que fueron de 85 ng/g (1978) hasta 37 ng/g (1979) y de 1,700 ng/g (1978) y 1,400 ng/g (1979) en el denominado *M. edulis* de San Diego (Martin et al., 1980).

Gutiérrez-Galindo et al. (1983a, b) analizan de nuevo la presencia de Aroclor 1254 (BCP) y de pesticidas organoclorados, DDT y sus metabolitos, heptacloro, epóxido de heptacloro y aldrin, en la costa de BC. Establecen que las concentraciones de BCP son inferiores a la medida señalada como aceptable para el consumo humano por la Agencia Norteamericana de Alimentos y Fármacos que es de 2 mg/Kg-d. Así mismo determina que la razón de Σ DDT/BPC es menor que 1. Un aspecto que llama la atención de los trabajos citados es que se observaron las menores concentraciones de DDT en músculo aductor y manto, mientras que las más altas en vísceras, y las intermedias en gónadas y branquias.

La cantidad de DDT también se han medido en organismos como el ostión japonés *Crassostrea gigas* que se cultiva en Bahía San

Quintín y se ha observado que las concentraciones son cinco veces menores a las presentadas por los mejillones del sur de California, EUA (Gutiérrez-Galindo et al., 1984).

El mercurio se ha evaluado en los mejillones *M. californianus* residentes en la zona comprendida desde la frontera México-EUA, hasta Bahía San Quintín, BC, donde se determinó que el patrón de concentraciones cambia con el tiempo, ya que en la región sur, en sitios como Eréndira, Punta China y San Quintín, que están alejados de las ciudades se detectaron las mayores cantidades de Hg en los meses de abril y julio, en tanto que en la parte cercana a las ciudades, hacia el norte, las cifras más altas fueron en febrero. Los datos de la parte sur, que de manera inesperada resultaron muy elevados, son debidos quizá a fuertes surgencias que hacen que suban a la superficie los contaminantes que han sido arrastrados por las corrientes que vienen del norte, de tal suerte que quedan a la disposición de los mejillones de la zona intermareal (Gutiérrez-Galindo y Flores-Muñoz, 1986).

La plata es otro elemento que se ha estudiado como indicador de desechos domésticos a lo largo de las costas de California, EUA y de Baja California. Se encuentra una correlación estrecha entre las descargas domésticas y la concentración de plata en los mejillones *M. californianus*, por ejemplo en lugares con descargas enormes como son las playas próximas a San Diego, California, presentan hasta 100 veces mas plata que en los sitios considerados limpios, como lo es Punta Abreojos, BC (Martin et al., 1988).

La presencia de DDT también se ha analizado en mejillones de la supuesta especie *M. edulis* de Baja California, en un estuario

próximo a Ensenada (Galindo-Bect y Flores-Baez, 1991; Flores-Baez y Galindo-Bect, 1989). Los trabajos con dicha especie son más limitados debido a que sus poblaciones son escasas en nuestras costas.

Los estudios comentados se refieren a la costa occidental de Baja California, pero recientemente se han extendido a la zona de riego del Valle de Mexicali y a la costa del Golfo de California, en donde se han examinado especies distintas, tales como almejas, peces y mejillones. La información citada puede complementarse y confrontarse con la enorme cantidad de datos que han generado de manera continua diversos grupos e instituciones de investigación de los EUA (Goldberg *et al.*, 1978; Sañudo-Wilhelmy y Flegall, 1991).

EL MEJILLON *Mytilus californianus* (CONRAD, 1837) COMO SISTEMA EXPERIMENTAL EN MUTAGENESIS

Uno de los problemas más difíciles de resolver es el de seleccionar la especie que se utilizará en el trabajo de mutagénesis. Ya sea que el propósito consista en realizar el estudio *in situ* con el objetivo de detectar sitios de riesgo, o para llevar a cabo experimentos bajo condiciones controladas de laboratorio *in vivo* o *in vitro* o bien que se pretenda trabajar de las tres formas.

Para hacer dicha selección se requiere de criterios y en este punto es posible hacer uso de algunos empleados en campos del conocimiento afines como son: la Toxicología y la Ecotoxicología, y conjugarlos con los de Mutagénesis.

El mejillón *Mytilus californianus* posee muchas cualidades que hacen de él un buen sistema experimental en mutagénesis, entre ellas destacan las siguientes:

1. Tiene un cariotipo de 28 cromosomas, que aunque no son gigantes, tampoco pequeños. El cariotipo de *M. californianus* es parecido al de otras especies de *Mytilus* (*M. galloprovincialis* y *M. edulis*) (Ahmed y Sparks, 1970; Dixon y Flavell, 1986; Méndez *et al.*, 1990).
2. Es abundante en las playas rocosas de América del Norte; su distribución geográfica es amplia ya que se le encuentra desde las Islas Aleutianas hasta el Sur de Baja California y es de fácil acceso (Haderlie y Abbott, 1980; Aguilar-Rosas *et al.*, 1988). Por lo tanto es posible pensar que siempre se podrían obtener ejemplares para la experimentación.
3. Es un organismo de fácil manejo durante la colecta de muestras y la transportación, además se le puede mantener fácilmente en

condiciones de acuarios y en el laboratorio durante tiempo indefinido.

4. Es amplio el conocimiento biológico que existe de *Mytilus* y es abundante la información conocida sobre *M. californianus*, en campos tales como: Genética, Taxonomía, Ecología, Fisiología, Embriología y Biología de la reproducción (Bayne, 1976b)

5. *M. californianus* es un organismo que no tiene problemas de carácter taxonómico ya que se puede identificar fácilmente. Su situación es distinta a la que presentan las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en diversas regiones del mundo, que incluyen la costa del Pacífico de América del norte (Soot-Ryen, 1955; McDonald y Koehn, 1988; McDonald *et al.*, 1991).

6. Se conoce el papel que desempeña en el ambiente natural, por ejemplo como especie dominante en muchas de las comunidades de la zona intermareal rocosa, así como por su destacado papel en la modificación de sustratos, que favorece el establecimiento de otras especies. Es también un consumidor de productores primarios y es capaz de bioacumular y bioamplificar a diversos contaminantes de su ambiente (Seed, 1976; Bayne *et al.*, 1980).

7. Los mejillones se han empleado desde la década de los setenta como organismos centinelas de contaminación química por su capacidad para bioconcentrar y bioamplificar agentes ambientales

("Mussel Watch") y es abundante la información recabada tanto local (en BC) como regionalmente (en las costas de EUA) de tal suerte que dichos datos pudieran complementarse con lo que se lograra obtener desde el enfoque de la mutagénesis ambiental (Bayne, 1978; Bayne *et al.*, 1980; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1983a,b; Martin *et al.*, 1988).

condiciones de acuarios y en el laboratorio durante tiempo indefinido.

4. Es amplio el conocimiento biológico que existe de *Mytilus* y es abundante la información conocida sobre *M. californianus*, en campos tales como: Genética, Taxonomía, Ecología, Fisiología, Embriología y Biología de la reproducción (Bayne, 1976b)

5. *M. californianus* es un organismo que no tiene problemas de carácter taxonómico ya que se puede identificar fácilmente. Su situación es distinta a la que presentan las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en diversas regiones del mundo, que incluyen la costa del Pacífico de América del norte (Soot-Ryen, 1955; McDonald y Koehn, 1988; McDonald et al., 1991).

6. Se conoce el papel que desempeña en el ambiente natural, por ejemplo como especie dominante en muchas de las comunidades de la zona intermareal rocosa, así como por su destacado papel en la modificación de sustratos, que favorece el establecimiento de otras especies. Es también un consumidor de productores primarios y es capaz de bioacumular y bioamplificar a diversos contaminantes de su ambiente (Seed, 1976; Bayne et al., 1980).

7. Los mejillones se han empleado desde la década de los setenta como organismos centinelas de contaminación química por su capacidad para bioconcentrar y bioamplificar agentes ambientales ("Mussel Watch") y es abundante la información recabada tanto local (en BC) como regionalmente (en las costas de EUA) de tal suerte que dichos datos pudieran complementarse con lo que se lograra obtener desde el enfoque de la mutagénesis ambiental (Bayne, 1978; Bayne et al., 1980; Gutiérrez-Galindo et al., 1983a,b; Martin et al., 1988).

8. Es una especie importante en varios aspectos, por ejemplo en los siguientes: económico, ecológico, alimentario y recreativo. Por lo que la información acerca de la mutagénesis que se pudiera obtener de ellos, no se necesitaría extrapolar al hombre, ya que los mejillones son importantes por sí mismos. Sin embargo, si se deseara intentar hacer alguna extrapolación tanto al hombre como a otros organismos que son consumidores de mejillones.

Cabe decir que se buscaron más opciones animales que pudieran ser buenos sistemas experimentales en mutagénesis marina, entre ellos cabe citar a diversas especies de peces, almejas, ostiones, gasterópodos y quitones; así también se revisaron otras dos especies de mejillones, el denominado *Mytilus edulis* de Baja California (que probablemente es *M. galloprovincialis*) y el otro es *Modiolus capax*, que es abundante en el Golfo de California y que se supone también está distribuido en la costa del Pacífico. De todos los organismos examinados desde diversos enfoques, tanto prácticos como teóricos, el que resultó mejor como modelo experimental fue el mejillón *Mytilus californianus*. Desde luego con este sólo es posible realizar trabajos *in situ* en la costa del Pacífico y particularmente en los sitios rocosos o con rocas y arena. Sin embargo, también pudiera ser útil en experimentos en donde se trasladara a otros sitios y se expusiera a los ambientes contaminados, así como en investigaciones de laboratorio.

OBJETIVO GENERAL

Obtener un modelo animal para la investigación de mutagénesis en el ambiente marino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar la especie que se utilizará como modelo.
2. Ubicar las colonias del organismo en la zona de estudio.
3. Establecer las condiciones de colecta, transporte y mantenimiento de los organismos en acuarios.
4. Montar las técnicas de obtención de suspensiones de células, elaboración de preparaciones y de tinción.
5. Determinar el índice mitótico (I.M.) en células de branquias y tubo digestivo.
6. En el caso de que el I.M. sea bajo, entonces desarrollar un método para incrementarlo, de tal manera que sea factible realizar el análisis cromosómico.
7. Determinar las características del cariotipo de la especie seleccionada como modelo.
8. Analizar los tipos de daños en cromosomas y núcleos interfásicos en organismos colectados en diversos sitios de la costa de Baja California.
9. Evaluar la posibilidad del cultivo de branquias y hemocitos.

MATERIALES Y METODOS

1. SELECCION DE LA ESPECIE QUE SE EMPLEO COMO MODELO

Fue seleccionada a partir de una revisión bibliográfica amplia sobre aspectos biológicos, tales como distribución geográfica y local, situación taxonómica, reproducción, genética, importancia ecológica, entre otros. También se corroboraron en un sentido práctico numerosos datos, entre los que destacan facilidad de identificación, de colecta, de manejo y de mantenimiento en condiciones de laboratorio.

2. UBICACION DE LAS ZONAS DE ESTUDIO Y TIEMPO DE COLECTA

Después de haber seleccionado a la especie que funcionaría como modelo, el mejillón *Mytilus californianus*, se procedió a ubicar los lugares de colecta a partir de una exploración directa de la costa de Baja California, desde Rosarito hasta San Quintín. Se decidió que fueran cuatro sitios, tres de ellos quedaron ubicados en la Bahía de Todos Santos, que fueron Km 105 (cerca de Punta Morro), El Rompeolas y Punta Banda y la localización del restante fue Eréndira (Ver fig. 3).

Las muestras utilizadas en la evaluación del daño genético en branquias se tomaron en septiembre de 1989 y las de tubo digestivo en diciembre del mismo año.

3. CONDICIONES DE COLECTA Y MANEJO DE ORGANISMOS

Las condiciones de colecta, transporte y mantenimiento en el laboratorio, se establecieron de manera empírica.

La colecta se realizó siempre en las mismas poblaciones de la zona intermareal, que fueron escogidas por su fácil acceso y por su número elevado de organismos de diferentes tallas. Al principio se

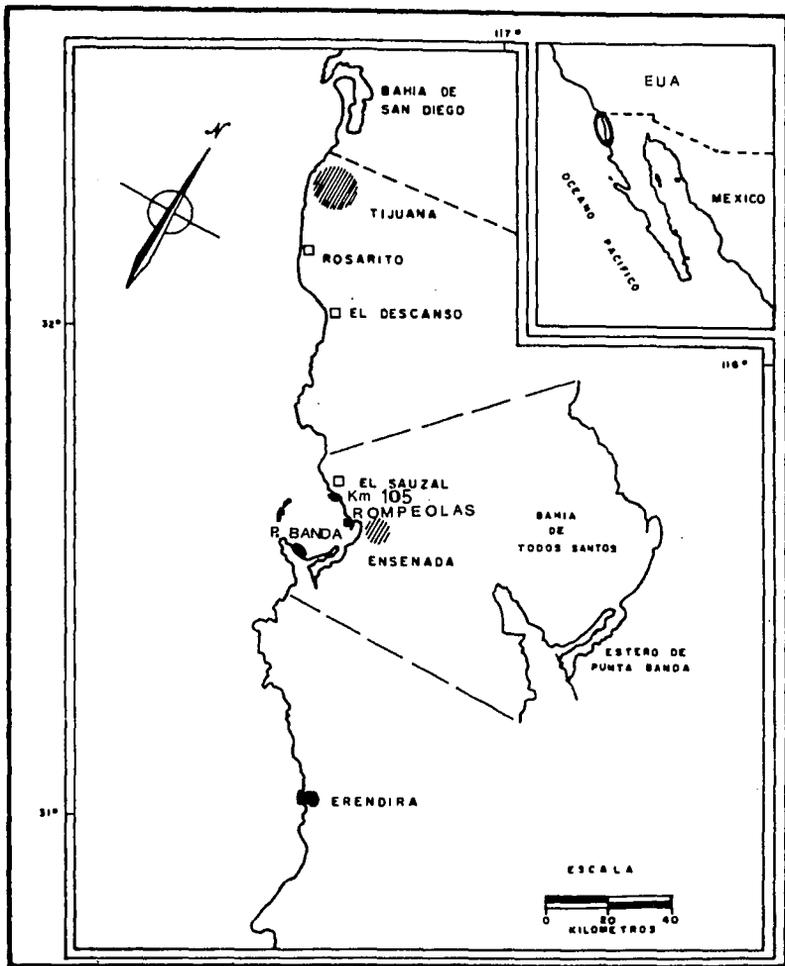


Fig. 3. Zonas de estudio

revisaron varias formas de transporte por ejemplo se envolvían en papel, mantas o costales de ixtle húmedos, también se probó con una cubierta de las macroalgas más abundantes de cada sitio, así como sin ésta. Se decidió transportarlos sin cubierta alguna cuando se les iba a procesar de inmediato o bien para los estudios de evaluación de daño genético en los lugares escogidos, que se llevaron a cabo dentro de las primeras 24 horas después de tomadas las muestras. Se escogieron ejemplares con tallas de 6.0 a 8.0 cm, para los ensayos con branquias y tubo digestivo. Para los cultivos de hemocitos se trabajó con mejillones de longitudes comprendidas entre 10 y 14 cm. Los organismos colectados, de 30 a 40 por cada sitio, se transportaron en recipientes de plástico y de inmediato se colocaron en acuarios de 120 L con aeración constante y sin alimentación en los casos en que se les procesaría dentro de un lapso de 24 horas. Cuando se analizó el daño genético, el agua de los acuarios fue tomada del mismo lugar de colecta.

4. TECNICAS DE OBTENCION DE GELULAS, ELABORACION DE PREPARACIONES Y TINCIONES

La técnica básica de la cual se partió es la que emplearon Moynihan y Mahon (1983) para obtener cromosomas de branquias del mejillón *Mytilus edulis* y que deriva del procedimiento que Bantock y Cockaine (1975) utilizaron para analizar cromosomas de tejido testicular del gasterópodo *Nucella lapillus*, que a continuación se describe:

Se extrajeron las branquias de *M. californianus* y se colocaron en colchicina diluida al 0.04% en agua de mar al 50%, durante 30 minutos. En este trabajo se probaron además otros

Tabla V. Constituyentes del medio Benex

Substancias	Concentración (g/L)
NaCl	10.00
KCl	1.00
MgCl ₂	0.15
CaCl ₂	0.20
NaHCO ₃	0.70
Na ₂ HPO ₄	0.30
KH ₂ PO ₄	0.12
Glucosa	2.00
Vitamina C	0.10
Amortiguadores de fosfato y bicarbonato	
ANTIBIOTICOS	(UI/μl)
Penicilina	100
Colimicina	500

tiempos que variaron de 1 a 8 horas. Después se dejaron reposar 30 minutos en agua de mar al 25%. Se fijaron con etanol absoluto y ácido acético (3:1) durante 15 minutos, esto se repitió cuatro veces. Cada trozo de branquia se transfirió al ácido acético al 50%, en donde permaneció aproximadamente 15 minutos y luego se agitó vigorosamente hasta que se formó una suspensión de células. Se tomó una muestra con una pipeta Pasteur y se dejaron caer tres gotas sobre un portaobjetos caliente (40°C) y se secaron en un termoplató a esa misma temperatura; luego se introdujeron en amortiguador de fosfatos a pH 7.0 durante 2 minutos y se tñieron con Giemsa al 2% por 10 minutos. Se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire.

Técnica de la inyección de colchicina

La técnica de Moynihan y Mahon (1983) no brindó buenos resultados en cuanto a metafases y por ello se probaron otras formas de aplicación de la colchicina, varios tiempos de exposición, entre otras variaciones, que a continuación se describen:

A los mejillones de se les aplicó una inyección de colchicina diluida al 0.04% en medio de Benex. Se utilizó una jeringa de 3 ml y la aguja se introdujo a través del orificio del pie. El medio de Benex fue escogido porque es el recomendado para el cultivo de órganos del mejillón *M. edulis* y se preparó de acuerdo con lo indicado en la tabla V, ya que así lo describe Gomot (1977).

Los volúmenes ensayados fueron: 1.0, 0.5 y 0.25 ml; los tiempos de tratamiento a probarse fueron 1, 2, 4, 6 y 8 horas durante los cuales los organismos permanecieron en acuarios.

Transcurrido el tiempo de cada tratamiento, se les cortó el músculo aductor y se les extrajeron las branquias y el tubo digestivo completos. Después se cortaron en trozos de 1 cm de longitud. Los segmentos de tracto digestivo se abrieron, se lavaron suavemente con agua de mar hasta que se apreciaron limpios. A cada fragmento se le colocó en 7 ml de agua de mar al 25% y se raspó suavemente con un bisturi y luego se le dejó reposar durante 20 a 30 minutos. Se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, enseguida se les aplicó 5 ml de fijador (metanol y ácido acético, 3:1). Los tejidos permanecieron a temperatura ambiente (20°C) durante 30 minutos, se volvió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante. De nuevo se añadieron 5 ml de fijador y así permanecieron reposar durante 1 hora. Después se desechó el fijador y se agregaron 5 ml de ácido acético al 50% y se agitó suavemente, luego se dejó en reposo durante 30 minutos. Este paso puede ser omitido cuando se realiza un raspado muy fino de las branquias y el tubo digestivo. Transcurrido el tiempo, se agitó cada tubo fuertemente, hasta observarse una suspensión blanquecina y algunos fragmentos grandes que fueron eliminados. Se centrifugó otra vez y se desechó el sobrenadante, se dejó aproximadamente 1 ml por encima del paquete celular. Con el material precipitado se hicieron preparaciones con la técnica de goteo y se secó a 40°C (aproximadamente). Después se aplicó colorante Giemsa diluido 1:20 en amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 7.0, durante 10 minutos. Finalmente se desechó el colorante, se lavó con agua destilada o con agua corriente filtrada, durante 2 minutos y se dejó secar al

aire. Las observaciones se realizaron en un microscopio American Optical 110 con accesorios para micrografía.

Técnica del acuario con colchicina

Otro procedimiento probado consistió en introducir a los mejillones en un acuario con colchicina al 0.04% en agua de mar. De manera preliminar se utilizaron dos volúmenes: 1 y 2 L. Pero el volumen mayor fue el que se utilizó en el análisis de cromosomas. En cada acuario se colocaron de 6 a 8 ejemplares con tallas de 5 a 7 cm de longitud, durante 1, 4, 6 y 8 horas. Después se abrieron los mejillones, se les extrajeron las branquias, se cortaron en trozos y se repitieron los pasos citados en el procedimiento anterior, hasta obtener las preparaciones teñidas con Giemsa. Las diferencias entre este procedimiento y el antes citado, son que en éste no se diluye la colchicina en medio de Benex, se sumerge al animal completo y se le mantiene en un acuario pequeño.

Análisis citogenético del mejillón *Mytilus californianus*

Durante el estudio acerca del cariotipo del mejillón californiano se colectaron organismos con tallas de 6 a 7 cm de longitud, de la Bahía Todos Santos, Ensenada, BC y se les aplicaron los tratamientos descritos antes, principalmente el del acuario. En algunos casos varió ligeramente el procedimiento, en los puntos siguientes:

1. Después de haber expuesto los organismos durante 6 y 8 horas, se les extrajeron las branquias y se cortaron en trozos de 0.5 a 1 cm. Luego se les aplicó dos veces el choque hipotónico durante 20 minutos.

2. Después se fijaron en metanol-ácido acético (3:1) en tres ocasiones y se hizo una suspensión celular.
3. Con las células en suspensión se hicieron preparaciones mediante la técnica de goteo y secado al calor de un foco.
4. Se tifieron con Giemsa diluida 1:20 en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 para obtener una tinción uniforme. Las bandas se obtuvieron al aplicar una tinción con Giemsa diluida 1:15 en amortiguador de boratos a pH 9.0 durante 8 a 10 minutos. El resto del análisis de cariotipo se hizo con lo que a continuación se indica:
5. El número cromosómico diploide se determinó mediante el conteo directo de más de 20 células por individuo.
6. Se escogieron las mejores metafases y profases para realizar los cariotipos.
7. Los idiogramas de las bandas se elaboraron manualmente, a partir del análisis de todas las regiones de cada cromosoma.

En adición a lo anterior, los parámetros cuantitativos siguientes: longitud relativa (LR), relación de brazos (RB) e índice centromérico (IC), se obtuvieron mediante la aplicación del paquete de cómputo LEON 1 (Márquez y Licea, 1991). Pero las mediciones de los brazos p y q se realizaron directamente sobre amplificaciones en papel y el resto del proceso, desde el punto 3, lo ejecuta el programa, inclusive los idiogramas. A continuación se describe el procedimiento:

Procedimiento para obtener los parámetros citogenéticos LR, RB e IC

1. Aparear los cromosomas preliminarmente de acuerdo con el tamaño

y a la posición del centrómero. Cuando tienen bandas también se toma en cuenta el patrón de bandeo.

2. Para cada cromosoma se hacen cuatro mediciones: longitud de brazo corto (p), donde se miden las cromátidas izquierda y derecha y en brazo largo (q), también se miden las dos cromátidas.

3. Se obtiene el promedio de ambas cromátidas, tanto de brazos cortos como largos y la suma de los dos promedios (de p y q) es la extensión de un cromosoma. Sacar de la misma forma las longitudes de todos los cromosomas de la metafase.

4. La longitud absoluta de un par de cromosomas se logra si se obtiene el promedio de la longitud de las cuatro cromátidas de dicho par de cromosomas.

5. El total del complemento haploide es igual a la mitad de la suma de la longitud de todos los cromosomas.

6. La longitud relativa (LR) de un determinado par de cromosomas se calcula de la siguiente manera:

$$LR = 100 \times \frac{\text{longitud absoluta de un par de cromosomas}}{\text{longitud total del complemento haploide}}$$

$$RB = \frac{\text{longitud de brazo corto}}{\text{longitud de brazo largo}}$$

$$IC = 100 \times \frac{\text{longitud de brazo corto}}{\text{longitud cromosómica total}}$$

PRUEBAS CON MITOMICINA C

Los mejillones fueron colectados de la zona de Eréndira y se escogieron tallas de 6 a 7 cm. Después se trataron 4 organismos con cada una de las concentraciones de mitomicina C (6×10^{-6} M y 1.2×10^{-5} M) y un tercer lote fue el testigo. Cada grupo se colocó en acuarios pequeños de 4 L de capacidad, cerrados y con aeración constante y a temperatura de 18 a 20°C.

Transcurridas las 24 horas, los mejillones que se utilizaron para analizar las aberraciones cromosómicas fueron expuestos durante 6 horas a colchicina al 0.04% dentro de un acuario, luego se les extirparon las branquias y se procesaron de acuerdo con la descripción mencionada para el método de inyección.

Por otra parte, los mejillones que se emplearon para evaluación de micronúcleos no se expusieron a colchicina ni al choque hipotónico, mientras que el resto del procedimiento fue igual.

Antes de manipular los organismos se les lavó con agua de mar limpia y se usaron guantes de plástico.

Para el análisis de aberraciones cromosómicas se examinaron en promedio 54 metafases que tuvieran por lo menos 24 cromosomas. En cada grupo se estudiaron en promedio 217 células.

Para la evaluación de micronúcleos en branquias se observaron 2,000 células por individuo.

EVALUACION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y MICRONUCLEOS EN BRANQUIAS DE 3 POBLACIONES

La evaluación *in situ* del daño genético se realizó con muestras de dos sitios al interior de la Bahía Todos Santos, Km 105 y el Rompeolas, y uno al exterior, Eréndira (Fig. 3). Se estudiaron 10 organismos por cada lugar para aberraciones cromosómicas y 10 para micronúcleos. Los organismos se procesaron inmediatamente después de la colecta o en el transcurso de las siguientes 24 horas. Cuando permanecieron varias horas en el laboratorio se les colocó en acuarios que contenían el agua de su ambiente, que fue trasladada en recipientes de 60 a 80 litros. El procesamiento para análisis de cromosomas y de micronúcleos se hizo en los términos descritos previamente.

EVALUACION DEL DAÑO GENETICO EN EL TUBO DIGESTIVO

Los mejillones escogidos midieron en promedio 7 cm y se tomaron 10 organismos en 4 lugares Km 105, Rompeolas, Punta Banda y Ejido Eréndira (Fig. 3).

Se decidió hacer énfasis en los micronúcleos y en los núcleos heteroploicóticos porque en ensayos preliminares se obtuvieron pocas metafases por preparación. Se observaron 1,000 células por ejemplar, esto es 10,000 por cada sitio, porque la cantidad de material es menor que en las preparaciones de branquias.

El procesamiento del tubo digestivo se describió en el método de inyección.

Para las observaciones se empleó microscopía de campo claro y de contraste de fases, en un microscopio American Optical 110.

CRITERIOS DE EVALUACION DE MICRONUCLEOS

1. Se consideraron sólo micronúcleos redondos u ovalados, con un color similar al del núcleo principal.
2. Sólo se tomaron en cuenta los micronúcleos a un lado del núcleo principal y en el mismo citoplasma. Aquí fue útil la microscopía de contraste de fases.
3. Se escogieron células redondas u ovaladas, del mismo tamaño y de forma parecida.
4. Se excluyeron células con tinción poco clara o bien con exceso de colorante.
5. También se eliminaron células traslapadas o con artificios como cristales de colorante, basura o restos de tejido.

PRUEBAS ESTADISTICAS

Se utilizaron las pruebas no pramétricas Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre más de dos grupos y Mann-Whitney que es útil en la comparación de dos grupos. Las pruebas se realizaron con la ayuda del paquete estadístico PRIMER.

CULTIVO DE HEMOCITOS

Los mejillones colectados para este propósito en la zona de Eréndira tuvieron tallas de 10 a 14 cm. Se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Extracción de hemolinfa de los senos venosos por medio de una jeringa para insulina.
2. De la hemolinfa se tomaron 0.5 ml y se vertieron a tubos de ensayo (13x100 mm), que ya contenían 1 ml del medio a probar y 5 gotas de antibiótico (penicilina 5,000 UI/ml y estreptomycinina 5 mg/ml). Los medios a probar fueron: hemolinfa libre de células (HLC), agua de mar esterilizada (AME), medio de Benex (MB) y una mezcla de medio McCoy con medio de Benex (MB+MC).
3. Los cultivos fueron cerrados y mantenidos a temperatura ambiente entre 18 y 20° C.
4. Se hicieron evaluaciones cada 24 horas sobre la viabilidad celular para lo que se empleó la técnica de exclusión del azul de tripano y se cuantificaron en un hemocitómetro. El resto de las células fueron centrifugadas a 500 rpm durante 15 minutos.
5. Después de la centrifugación se fijaron con metanol y ácido acético (3:1) en tres ocasiones.
6. Con el botón celular se hicieron preparaciones por goteo y el secado fue al calor de un foco.
7. La tinción se hizo con Giemsa a pH 7.0 diluida 1:20, durante 20 minutos.

E) Otros datos generales (turbidez, color del medio y olor).

Por normal se entiende a las características de las células obtenidas de organismos recién sacrificados.

Para resumir la información de la evaluación se diseñó un sistema de calificación que consiste en lo siguiente:

El valor máximo es igual a 10 y corresponde a los cultivos que presentan las características de un cultivo inicial.

7 = Cuando se conservan tres características relevantes tales como: movimiento, tamaño, forma y coloración.

5 = Cuando se conservan sólo dos de las características.

0 = Pérdida de los cilios.

Este sistema de calificación podría tener otras notas intermedias si así se deseara.

R E S U L T A D O S

I. METODOS PARA EL INCREMENTO DEL NUMERO DE METAFASES POR PREPARACION

RESULTADOS

METODO DE LA INYECCION DE COLCHICINA

Se obtuvieron buenos resultados en branquias de organismos tratados con 1.0 y 0.5 ml de colchicina diluida al 0.04% en medio de Benex, se observaron de 40 a 60 mitosis por preparaci3n (Fig. 4a). En los tratamientos en que se inyect3 1.0 y 0.5 ml de colchicina y se dej3 reposar a los organismos durante 4 y 6 horas se alcanzaron de 15 a 45 mitosis. Con las aplicaciones de 0.25 ml, la producci3n de mitosis fue escasa, asi como con los ensayos en los que el tiempo de exposici3n al f3rmaco fue de 1 y 2 horas. Los resultados se muestran en las Figs. 5 y 6.

Los resultados logrados con el procedimiento de la inyecci3n se comparan con los alcanzados cuando se utiliz3 la t3cnica que refieren Moynihan y Mahon (1983) y considerada como b3sica al principio de este trabajo (Fig. 6). Algo destacado es que con 1 y 2 horas no existen diferencias entre ambas t3nicas, en tanto que con tiempos mayores es grande la diferencia y fue mejor la aplicaci3n de colchicina con inyecci3n.

En las preparaciones de tubo digestivo se observ3 un bajo n3mero de mitosis. Los promedios de dichos datos se comparan con los de branquias en la figura 5. Cabe aclarar que este es un intento por incorporar a los estudios de an3lisis citogen3ticos a un 3rgano que hasta la fecha no ha sido considerado por otros autores.



Fig. 4. Metafase del mejillón *M. californianus* con un núcleo interfásico al lado (A) y un campo con tres metafases (B)

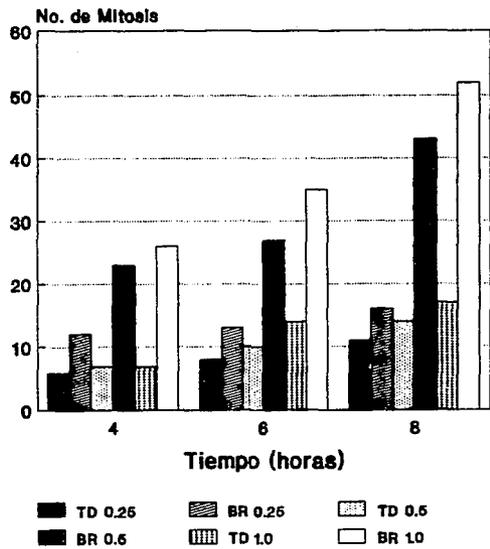


Fig. 5. Promedio de mitosis en preparaciones de tubo digestivo y de branquias

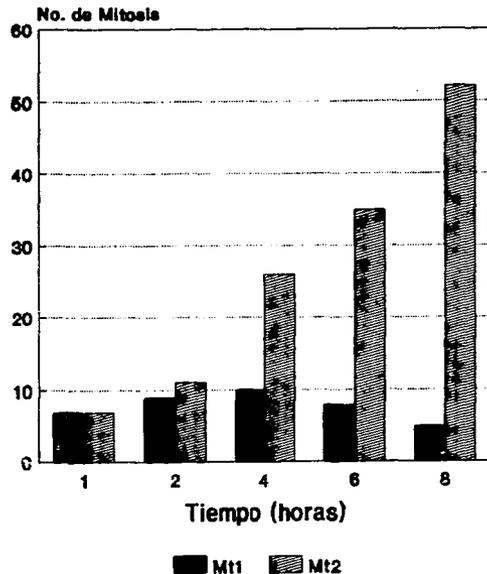


Fig.6. Comparación del número de mitosis por preparación obtenido con dos métodos

METODO DEL ACUARIO CON COLCHICINA

Con el procedimiento de inyección se alcanzaron resultados moderados en cuanto a la cantidad de metafases y buenos en la calidad. Pero a pesar de que con tal avance se podían realizar diversos análisis citogenéticos, se decidió explorar otra opción, que consistió en la preparación de 2 L de colchicina al 0.04% diluida en agua de mar filtrada, misma que fue depositada en un acuario con capacidad de 4 L con aeración. Ahí se colocaron 8 ejemplares de 5 a 7 cm de longitud del eje mayor, durante 1, 4, 6 y 8 h (fueron dos organismos por tiempo y por acuario y se usaron dos acuarios). Los datos (Fig. 7) indican que tal forma de aplicar la colchicina es excelente, ya que la cantidad de metafases obtenida es superior a la que se logró con el método de la aplicación mediante inyección y desde luego no tiene punto de comparación con los resultados que se alcanzaron con el método de Moynihan y Mahon (1983). Los mejores resultados muestran un promedio de 210 metafases, incluso en algunos individuos tratados durante 8 h se registraron mas de 400 por preparación y en algunos campos es posible apreciar varias metafases (Fig. 4b). Con 6 h de exposición se lograron aproximadamente 130 metafases y con 4 horas el promedio fue 54 metafases por preparación. Un dato relevante es que los ejemplares no responden en términos iguales ya que existe una variabilidad alta en la respuesta. Se observa que el número de metafases obedece al tiempo de exposición al fármaco.

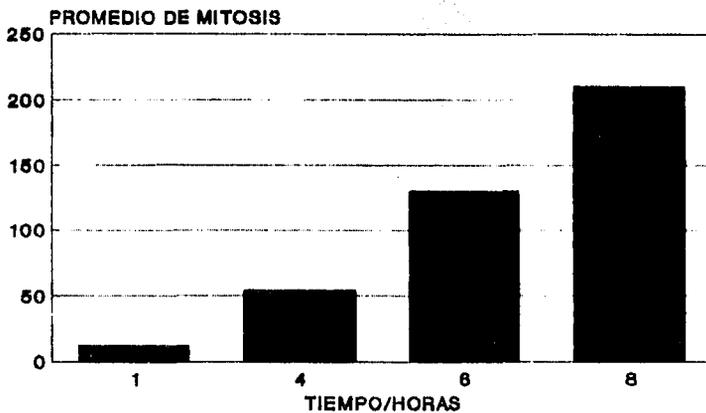


Fig. 7. Promedio de mitosis obtenidas con colchicina 0.04% durante tiempos diversos de exposición

RESULTADOS

II. CITOGENETICA DE Mytilus californianus

- A) ANALISIS DE CROMOSOMAS METAFASICOS
- B) ANALISIS CUANTITATIVO DEL CARIOTIPO
- C) ANALISIS PRELIMINAR DE ALTA RESOLUCION
EN CROMOSOMAS PROFASICOS CON BANDAS G

LOS CROMOSOMAS DE *Mytilus californianus*

1. DATOS BASICOS A PARTIR DE CROMOSOMAS METAFASICOS

Se contaron los cromosomas de 10 a 15 células mitóticas de 40 organismos y se confirmó el número cromosómico diploide de 28. El análisis de células meióticas en metafase I mostró 14 cromosomas bivalentes (Fig. 9).

2. Se determinó que el cariotipo consta de los siguientes cromosomas: metacéntricos = 3 pares, submetacéntricos = 6 pares subtelocéntricos = de 4 a 5 pares y telocéntricos = 1 par o ausentes (Figs. 8).

3. El número cromosómico fundamental (NF) fue de 56 al seguir el criterio de asignar a los cromosomas subtelocéntricos dos brazos (p y q), aunque los p sean pequeños. Sin embargo, para quienes consideran que los subtelocéntricos y telocéntricos poseen sólo un par de brazos el NF es de 46.

II. ANALISIS CUANTITATIVO

1. Se obtuvieron los siguientes parámetros: longitud relativa (LR), relación de brazo (RB), índice de brazo (IB) e índice centromérico (IC) (Tabla VI).

2. Con los datos de la tabla VI se realizaron idiogramas (Figs. 10 y 11).

III. ANALISIS DE CROMOSOMAS PROFASICOS.

1. Se construyó un cariotipo con cromosomas profásicos con el fin de realizar análisis de alta resolución. Aunque no es óptima la calidad lograda en el patrón de bandas G parece que este tipo de análisis sí podría practicarse en un futuro próximo (Fig. 12).

2. También se preparó de manera manual un idiograma a partir del

examen de cada una de las regiones de los cromosomas, se logran apreciar aproximadamente 300 bandas (oscurecidas y claras) por juego haploide (Fig. 13).

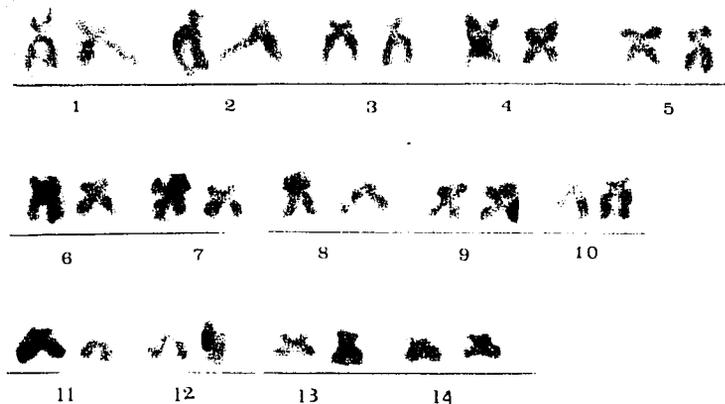


Fig. 8. Cariotipo del mejillón *M. californianus* con sus 28 cromosomas metafásicos

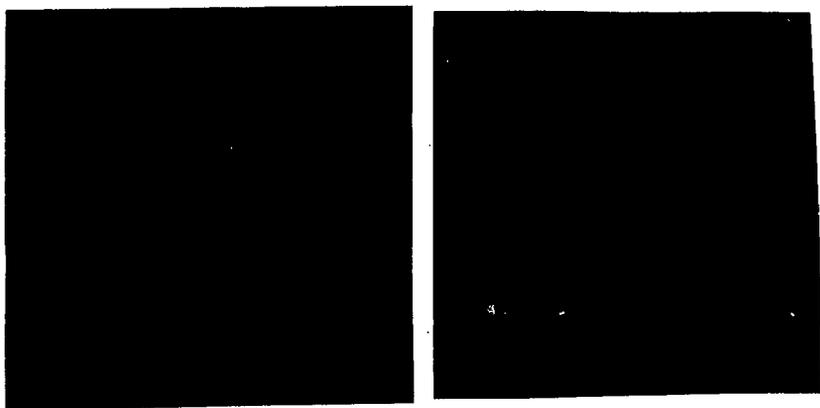


Fig. 9. Células meióticas en metafase I con sus 14 cromosomas

Tabla VI. Parámetros citogenéticos de los 14 pares de cromosomas. El número que se indica para los cromosomas corresponde al orden en que se introdujeron los datos al programa León 1.

Pareja	Cromosomas	LR	RB	IB	IC
1	5- 1	8.719	0.690	1.450	40.816
2	2- 4	8.541	0.500	2.000	33.333
3	6- 8	7.829	0.630	1.588	38.636
4	3- 9	7.740	0.582	1.719	36.782
5	7- 10	7.473	0.714	1.400	41.667
6	14- 20	7.295	0.547	1.828	35.366
7	24- 15	7.295	0.519	1.929	34.146
8	11- 23	7.117	0.538	1.857	35.000
9	16- 13	6.940	0.773	1.294	43.590
10	18- 25	6.762	0.520	1.923	34.211
11	12- 22	6.495	0.622	1.607	38.356
12	21- 19	6.406	0.333	3.000	25.000
13	17- 26	6.139	0.643	1.556	39.130
14	28- 27	5.249	0.595	1.682	37.288

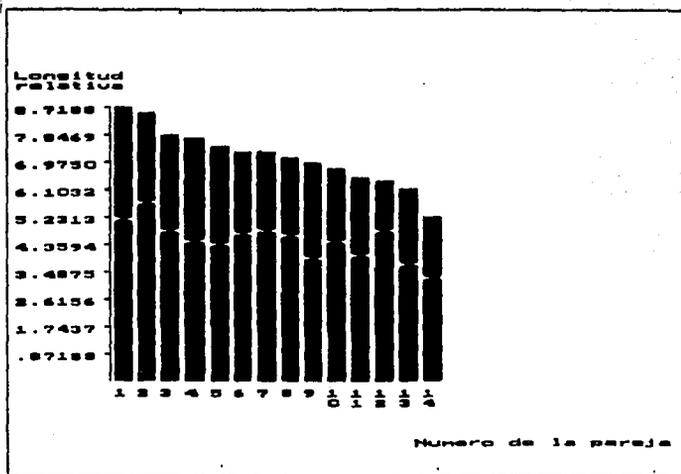


Fig. 10. Idiograma de *Mytilus californianus* ordenado por longitud relativa e índice centromérico.

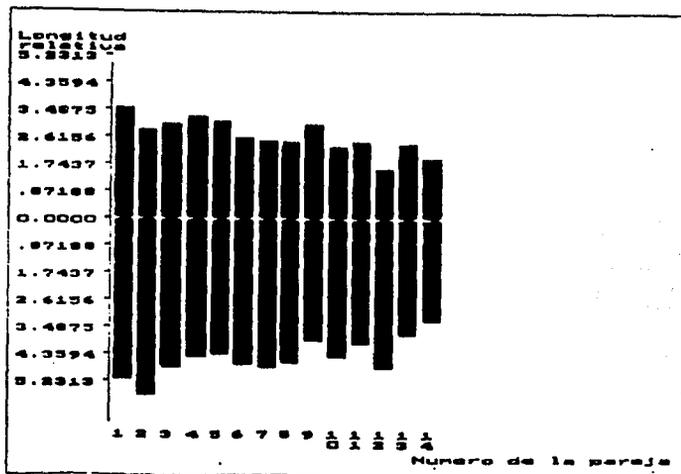


Fig. 11. El mismo idiograma de la fig. anterior, pero ordenado a partir de la posición del centrómero.

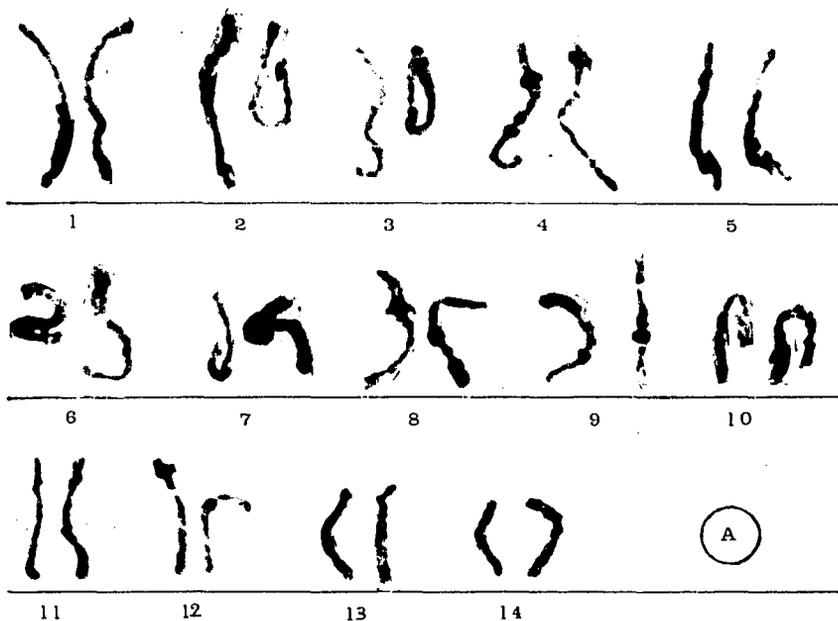
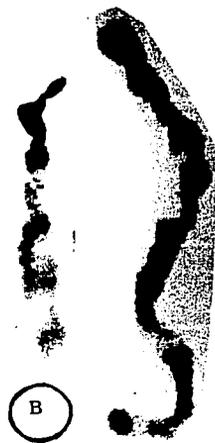


Fig. 12. Cariotipo de alta resolución de *M. californianus* realizado con cromosomas profásicos y bandas G (A) y los cromosomas 3 y 13 amplificados (B).



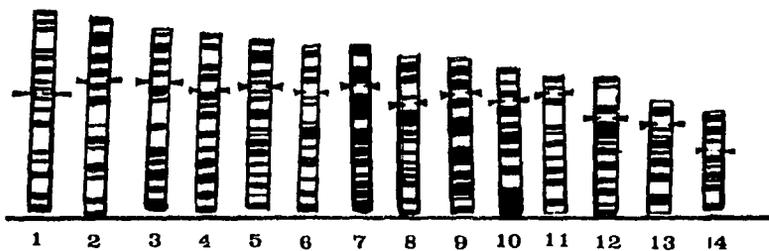


Fig. 13. Idiograma del cariotipo de *M. californianus* elaborado a partir de cromosomas profásicos con bandas G

RESULTADOS

III. DAÑO GENETICO EN MEJILLONES ADULTOS

Mytilus californianus

- A) EVALUACION IN SITU DEL DAÑO EN BRANQUIAS
(ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y MICRONUCLEOS)
- B) EVALUACION IN SITU DEL DAÑO EN TUBO
DIGESTIVO (MICRONUCLEOS Y OTROS TIPOS DE
ANORMALIDADES EN NUCLEO INTERFASICO)
- C) ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y MICRONUCLEOS
INDUCIDOS POR MITOMICINA C EN BRANQUIAS

ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y ALTERACIONES EN NUCLEO INTERFASICO.

En células de branquias y tubo digestivo fue posible identificar diversos tipos de aberraciones cromosómicas y de anomalías nucleares, por ejemplo:

I. En núcleo interfásico: a) micronúcleos y b) núcleos heteropicnóticos

II. En cromosomas metafásicos: a) cromosomas aberrantes (crompimientos cromosómicos y cromatídicos, fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos, anulares, tri y tetrarradiales).

b) Pulverización cromosómica. c) Poliploidías.

d) Desespiralización cromosómica.

Los tipos de daño se muestran en las Figs. 14 a la 20.

EVALUACION *IN SITU* DEL DAÑO GENETICO EN BRANQUIAS

Se evaluaron células con aberraciones cromosómicas pero se excluyeron a las aneuploidías porque resulta difícil establecer cuáles son causadas por la técnica misma de elaboración de preparaciones y cuáles son provocadas por citotóxicos que afectan a los microtúbulos o a los centrómeros. También se eliminaron a las hendiduras o brechas porque su análisis es tema de controversia.

En esta parte se examinaron células en las que se pudieron observar 24 ó más cromosomas. Se examinaron 50 metafases por organismo, en promedio. Los datos se muestran en porcentajes de células con aberraciones cromosómicas (AC), de tal modo que cuando existen células que presentan más de un daño se indica sólo como una metafase con AC, por ejemplo en los casos en que existe

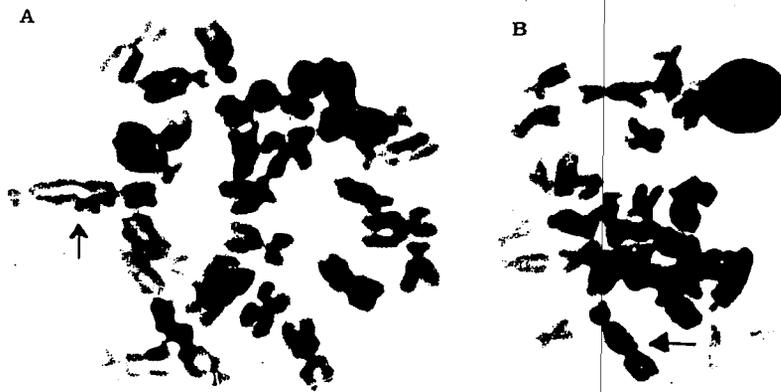


Fig. 14. Células con una aberración cromosómica, cromosomas trirradio (A) y dicéntrico (B)



Fig. 15. Células con dos o más aberraciones cromosómicas
 a) cromosomas pulverizados, b) desespiralizados
 c,d) intercambios cromatídicos, e) brecha
 cromatídica

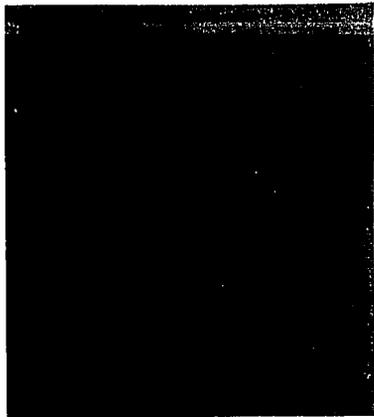


Fig. 16. Cromosoma anular (A) y fragmento acéntrico (B)



Fig. 17. Célula poliploide



Fig. 18. Núcleo gigante

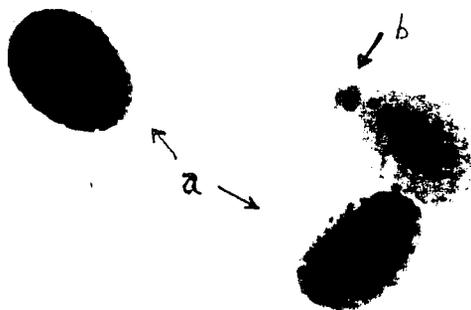


Fig. 19. Núcleos normales (a) y micronúcleo (b)



Fig. 20. Núcleo heteroploide

pulverización cromosómica o cuando hay daños múltiples. Se optó por tal criterio porque es uno de los más utilizados en la literatura y porque así se podrá facilitar la comparación de los datos y la discusión y también porque las células con múltiples daños son escasas. Si se hubieran registrado zonas en donde los organismos presentaran una frecuencia excepcionalmente alta, entonces habría sido conveniente adoptar un criterio distinto. En una evaluación paralela se analizaron sólo micronúcleos en branquias; para ello se examinaron 2,000 células por cada uno de los 10 organismos por zona. Estos mejillones fueron distintos a los 10 procesados para evaluar aberraciones cromosómicas.

Se observa (Tablas VII a y b, Fig. 21) que el porcentaje mayor de aberraciones cromosómicas fue en la zona denominada Km 105 (6.96), en segundo lugar el Rompeolas (5.04), aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ellas. La zona menos afectada fue el ejido Eréndira (2.04) y esta es diferente estadísticamente de las dos zonas ubicadas en la Bahía Todos Santos, en Ensenada. En cuanto a micronúcleos se observa (Fig. 21, Tablas VIII a y b) una tendencia similar con los datos anteriores, aunque los porcentajes detectados son menores a los de metafases con aberraciones cromosómicas, ya que en Km 105 se registró (0.47), en el Rompeolas (0.37) y en el Ejido Eréndira (0.16). Entre los dos primeros no existe diferencia significativa pero entre estas dos y el ejido Eréndira sí la hay.

Tabla VIIa. Aberraciones cromosómicas (AC) detectadas en branquias del mejillón *Mytilus californianus* colectados en tres sitios de BC

Sitio	total de metafases	metafases con AC	AC/100 metafases ± D.E.
Km 105	503	35	6.96 ± 3.42
Rompeolas	516	26	5.04 ± 2.96
Eréndira	568	12	2.11 ± 1.89

Prueba de Kruskal-Wallis H = 10.597 p<0.01

Tabla VIIb. Comparación de aberraciones cromosómicas en 100 metafases de branquias de *M. californianus* colectados en tres sitios de BC

	Rompeolas	Eréndira
Km 105	ns	**
Rompeolas		*

Prueba de Mann-Whitney * p<0.05; ** p<0.01
ns = no significativo

Tabla VIIc. Aberraciones cromosómicas en branquias de *M. californianus* expuestos a Mitomicina C y testigos

Grupo	Total de metafases	Metafases con AC	AC/100 metafases ± D.E.
Testigo	212	6	2.83 ± 1.19
MMC [6x10 ⁻⁶ M]	229	34	14.85 ± 3.93
MMC [1.2x10 ⁻⁵ M]	211	44	20.48 ± 8.91

Tabla VIIIa. Micronúcleos en branquias de mejillones *M. californianus* colectados en tres sitios de BC

Sitio	Micronúcleos/100 interfases \pm D.E.
Km 105	0.47 \pm 0.18
Rompeolas	0.37 \pm 0.21
Eréndira	0.16 \pm 0.11

Prueba de Kruskal-Wallis H = 12.619 p<0.01

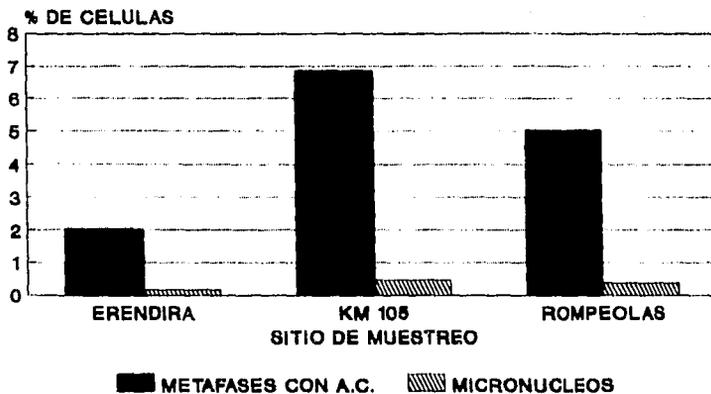
Tabla VIIIb. Comparación de micronúcleos/100 interfases de branquias de mejillones *M. californianus* colectados en tres sitios de BC

	Rompeolas	Eréndira
Km 105	ns	**
Rompeolas		*

Prueba de Mann-Whitney * p<0.05 ** p<0.001
ns = no significativo

Tabla VIIIc. Micronúcleos en branquias de mejillones expuestos a Mitomicina C

Grupo	Micronúcleos/100 interfases \pm D.E.
Testigo	0.19 \pm 0.14
MMC [6×10^{-6} M]	1.85 \pm 0.42
MMC [1.2×10^{-5} M]	2.8 \pm 0.67



**Fig. 21. Células con aberraciones cromosómicas o con micronúcleos en branquias
(Se utilizaron mejillones distintos)**

EVALUACION *IN SITU* DE LOS DAÑOS EN NUCLEOS INTERFASICOS DEL TUBO DIGESTIVO

En otra evaluación diferente se analizaron las células epiteliales del tubo digestivo de los mejillones de cuatro zonas (las tres citadas anteriormente mas Punta Banda, que está situada en el extremo sur de la Bahía Todos Santos). Se examinaron 10 organismos por cada sitio, pero sólo se observaron aproximadamente 1,000 células por mejillón debido a que las preparaciones son menos ricas en células que las de branquias. En tubo digestivo resulta difícil el análisis de aberraciones cromosómicas ya que el índice mitótico obtenido hasta la fecha es bajo, por ello se decidió examinar micronúcleos, así como núcleos heteropícnóticos. El lugar con mayor frecuencia de micronúcleos (Tablas IX a y b, Figs. 22 y 23) fue el Km 105 (0.33%) y el menos afectado Eréndira (0.05%). Se aprecia que en los tres sitios de la Bahía Todos Santos existe una mayor frecuencia de micronúcleos que en Eréndira que está al sur (a mas de 60 Km).

Los núcleos heteropícnóticos son el tipo de alteración que alcanza las frecuencias más altas (Tablas X a y b, Fig. 24) (Rompeolas = 16.86 y Punta Banda = 14.09). Sin embargo, existen localidades en que las frecuencias son muy bajas (Km 105 = 3.38 y Eréndira = 3.63). Los últimos resultados son inesperados por el hecho de que un sitio está al interior de la Bahía (Km 105) y el otro afuera.

Tabla IXa. Micronúcleos en tubo digestivo de mejillones *M. californianus* colectados en cuatro sitios de BC

Sitio	micronúcleos/100 interfases \pm D.E.
Km 105	0.33 \pm 0.20
Rompeolas	0.17 \pm 0.17
Punta Banda	0.18 \pm 0.20
Eréndira	0.05 \pm 0.08

Prueba de Kruskal-Wallis H = 12.358 p<0.01

Tabla IXb. Comparación de micronúcleos/100 interfases del tubo digestivo de *M. californianus* colectados en cuatro sitios de BC

	Rompeolas	Punta Banda	Eréndira
Km 105	ns	ns	**
Rompeolas		ns	ns
Punta Banda			*

Prueba de Mann-Whitney * p<0.05; ** p<0.001
ns = no significativo

Tabla Xa. Núcleos heteropícnóticos en células del tubo digestivo de *M. californianus* colectados en cuatro sitios de BC

Sitio	núcleos heteropícnóticos/100 células \pm D.E.
Km 105	3.38 \pm 2.12
Rompeolas	16.86 \pm 6.57
Punta Banda	14.09 \pm 5.28
Eréndira	3.63 \pm 1.96

Prueba de Kruskal-Wallis H = 28.462 p<0.001

Tabla Xb. Comparación de núcleos heteropícnóticos de células del tubo digestivo de *M. californianus* colectados en cuatro sitios de BC

	Rompeolas	Punta Banda	Eréndira
Km 105	*	*	ns
Rompeolas		ns	*
Punta Banda			*

Prueba de Mann-Whitney * p<0.001
ns = no significativo

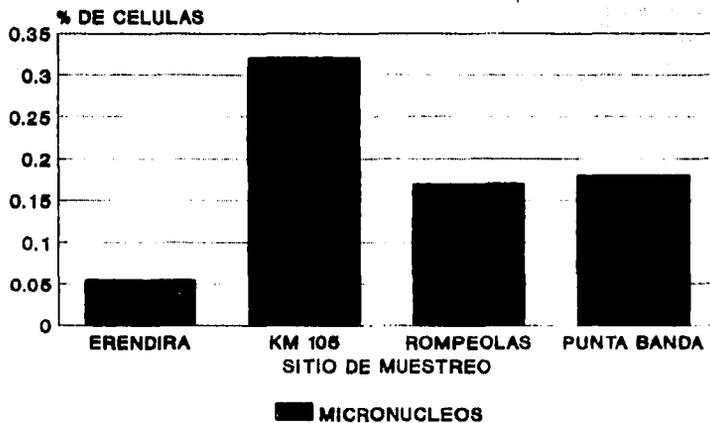


Fig. 22. Micronúcleos en células de tubo digestivo (cuatro sitios de BC)

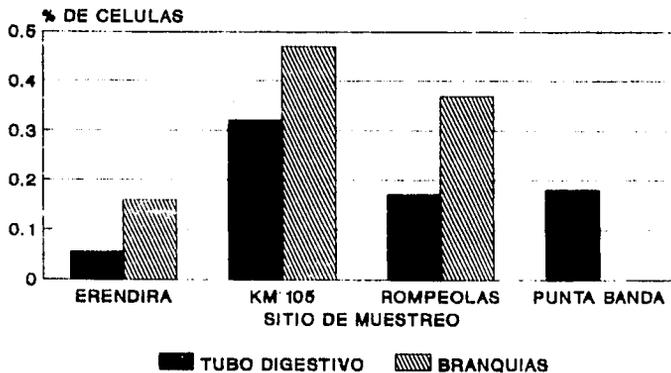


Fig. 23. Micronúcleos en células de tubo digestivo y de branquias tomadas de muestras independientes

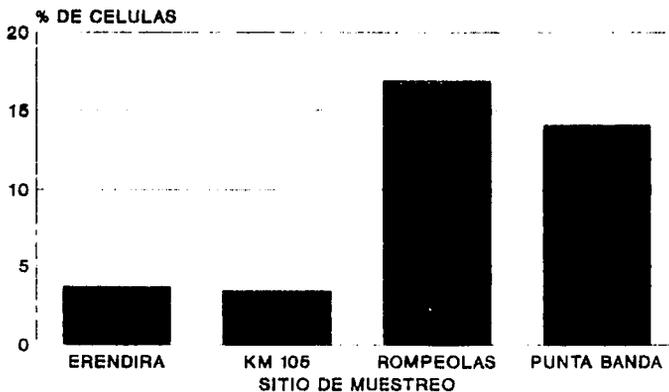


Fig. 24. Núcleos heteroploidicos en células de tubo digestivo (cuatro sitios de BC)

ABERRACIONES CROMOSOMICAS Y MICRONUCLEOS EN BRANQUIAS INDUCIDOS POR MITOMICINA C (MMC)

Se hicieron ensayos para obtener datos sobre la respuesta de las branquias ante un mutágeno conocido como lo es la MMC. Lo que se observa es que existe una respuesta positiva al agente apreciándose una relación dosis-efecto (Fig. 25, Tablas VII c y VIII c). Los datos del grupo testigo (mejillones de Eréndira al igual que los expuestos al fármaco) son parecidos a los de otros organismos colectados para la evaluación *in situ* de Eréndira. En esta parte se procesaron sólo cuatro ejemplares por lote y fueron diferentes en los que se analizaron micronúcleos y aberraciones cromosómicas.

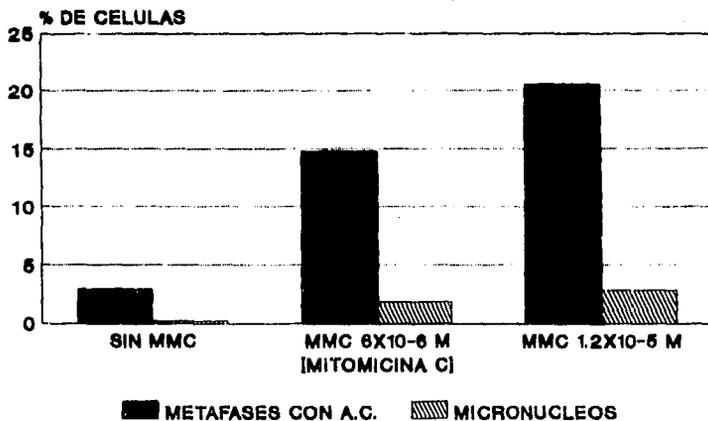


Fig. 25. Aberraciones cromosómicas y micronúcleos inducidos por mitomicina C

R E S U L T A D O S

IV. ENSAYOS IN VITRO

A) SOBREVIVENCIA DE LOS HEMOCITOS

B) SOBREVIVENCIA DE LAS BRANQUIAS

ENSAYOS *IN VITRO*

HEMOCITOS

Los sistemas de cultivo de células son en la actualidad herramientas indispensables para la experimentación en Mutagénesis y Toxicología, porque disminuye considerablemente el problema de la variabilidad interindividual, reducen los costos y el tiempo de la experimentación, se eliminan los problemas del sacrificio excesivo de organismos experimentales, entre otras cualidades. Desde luego que no sustituyen a los experimentos con organismos completos, pero si los complementan.

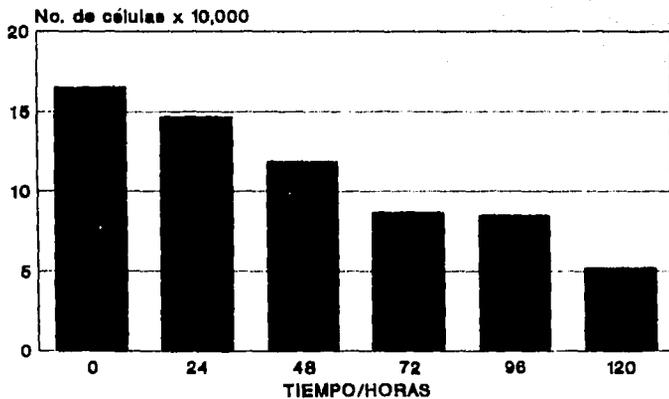
Por las bondades de los sistemas *in vitro* se decidió probar en principio la posibilidad de mantener, por varios días, las células de los mejillones. Se optó por los hemocitos, debido a su analogía con los leucocitos de otros seres y también a las branquias por ser el órgano que más ventajas ha mostrado hasta la fecha para el estudio de los cromosomas.

Para cultivar a los hemocitos se probaron 4 medios: 1) Agua de mar esterilizada por filtración, 2) hemolinfa libre de células, 3) medio de Benex y 4) medio McCoy + Benex. En el ensayo con agua de mar se observa que al principio se tienen $16.5 \times 10,000$ células por ml (en todos los datos siguientes la cifra es $\times 10,000$) y estas disminuyen de manera constante hasta llegar a 5.2 a las 120 horas (Fig. 26). En hemolinfa libre de células el comportamiento es parecido al anterior, se inicia con $18 \times 10,000$ células por ml y declina al cabo de 120 horas a 4.83 (Fig. 27). En medio de Benex las células presentan una sobrevivencia similar a la de los dos primeros medios (Fig. 28). En cambio el medio McCoy adicionado con

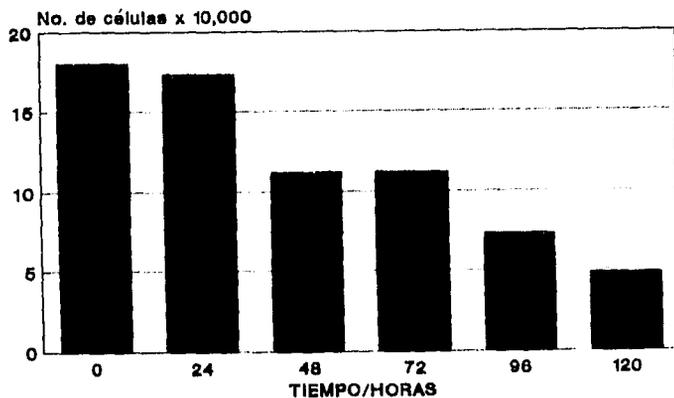
el de Benex resulta ser el mejor ya que la cantidad de células se mantiene con pocos cambios durante 120 horas, pues se principió con $11.5 \times 10,000$ células por ml y 120 horas después había 10 (Fig. 29). En la figura 30 se muestra comparativamente la sobrevivencia de los hemocitos en los diferentes medios.

Se observaron tres tipos básicos de células que son: granulocitos (que representan del 85 al 90%), hialinocitos (del 8 al 10%) y multinucleadas (del 1 al 3%) (Fig. 31).

El hialinocito es el que parece más apropiado para estudios de daño genético, por ejemplo para análisis de micronúcleos, porque son grandes y en su citoplasma no existen inclusiones o gránulos, como en los granulocitos. Su número no es elevado, pero tampoco es el más bajo y además existen evidencias de que se divide *in vitro* de manera espontánea (Fig. 32).



**Fig. 26. Sobrevivencia en agua de mar
(total de células)**



**Fig. 27. Sobrevivencia en hemolinfa
libre de células**

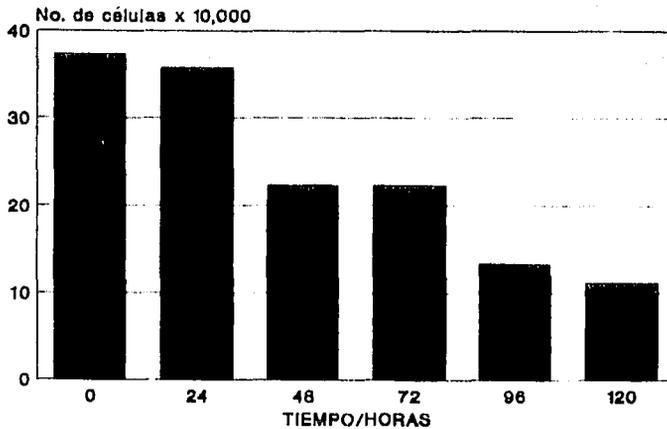


Fig. 28. Supervivencia en medio Benex

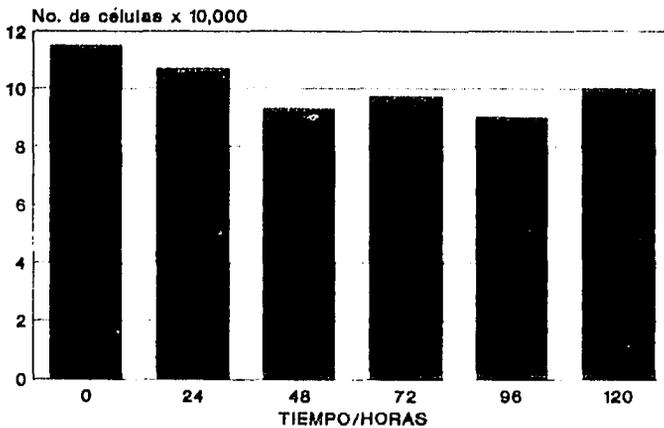


Fig. 29. Supervivencia en McCoy + Benex

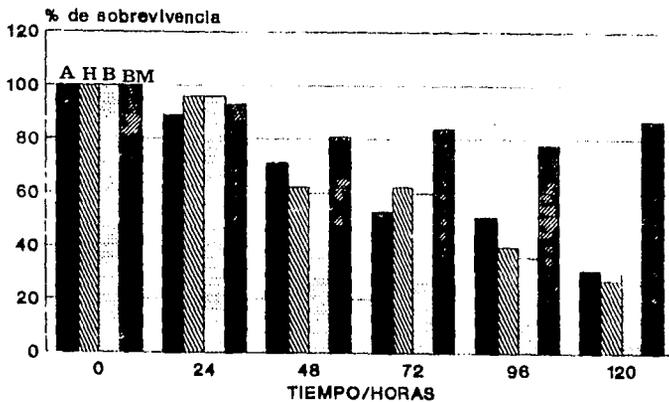


Fig. 30. Porcentajes de sobrevivencia en
 AME, HLC, MB, MB+MC
 (A) (H) (B) (BM)

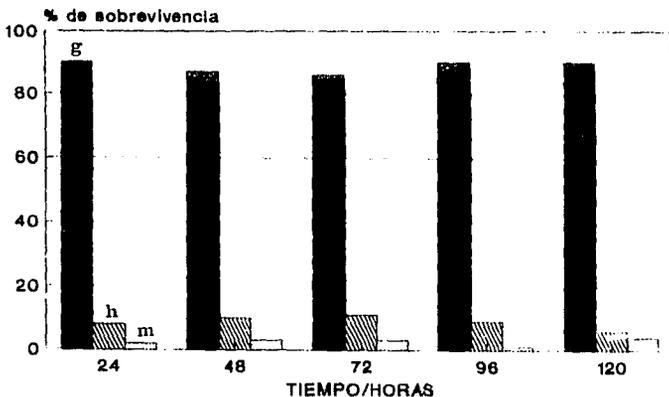


Fig. 31. Sobrevivencia de granulocitos,
 hialinocitos y multinucleadas



Fig. 32. Mitosis de hemocitos en cultivo

ENSAYOS *IN VITRO*

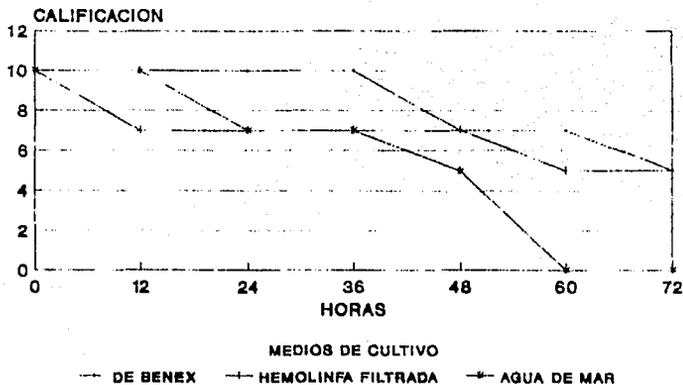
BRANQUIAS

Las ventajas que presentan éstas respecto a los hemocitos en los mejillones son muy grandes, de tal forma que de un organismo de 8 a 10 cm de longitud se pueden obtener 30 ó 40 fragmentos para ser cultivados. En cambio, la cantidad de hemolinfa que es factible extraer de un ejemplar de la misma talla es aproximadamente 1 ml, con lo cual sólo es posible cultivar de 2 a 3 tubos.

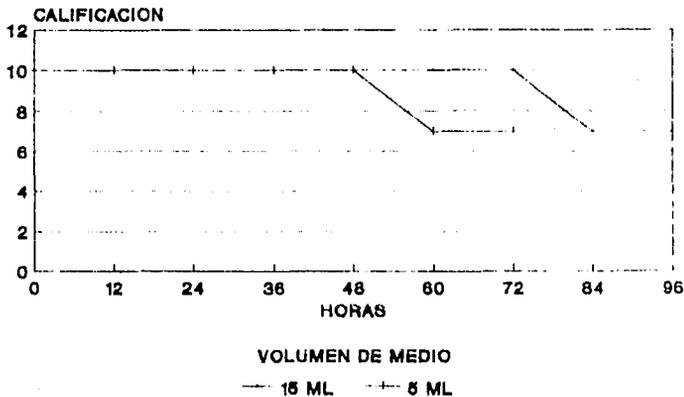
En este trabajo se probaron 3 medios: Benex, hemolinfa libre de células y agua de mar esterilizada por filtración. Se cultivó hasta 96 h y se hicieron evaluaciones cada 12 h. Se apreció que el mejor medio es el de Benex. La hemolinfa es un medio rico que permite que se conserven la mayoría de las características, excepto el movimiento ciliar, el cual se pierde en menos de 24 h. Por su parte el agua de mar sólo permite la sobrevivencia en tiempos breves, menores a 12 h (Fig. 33).

Una vez establecido que el mejor medio fue el de Benex, entonces se probaron dos volúmenes, 15 y 5 ml y resultó más apropiado el volumen mayor (Fig. 34).

De manera paralela a la observación de las células vivas, también se hicieron preparaciones fijadas y teñidas bajo el procedimiento empleado para el análisis de micronúcleos. Se apreció que la calidad de las laminillas hechas con branquias cultivadas durante 24 y 48 horas, es similar a las realizadas con tejidos recién extirpados.



**Fig. 33. Cultivo de branquias
Pruebas en tres medios (2 ml)**



**Fig. 34. Branquias in vitro
Pruebas en medio de Benex**

DISCUSION Y CONCLUSIONES

METODO DE LA INYECCION DE COLCHICINA.

Existía un problema de método que limitaba el análisis de cromosomas y éste consistía en que se obtenían pocas mitosis por preparación con las técnicas para bivalvos citados en la literatura. Una de ellas es la que requiere de huevos fertilizados y embriones de pocas células, que se ha aplicado en diversas especies de mejillones *Mytilus* (Ahmed y Sparks, 1970; Dixon, 1982; Brunetti *et al.*, 1986), en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Longwell *et al.*, 1967; Rodríguez-Romero *et al.*, 1978) y en otros bivalvos (Menzel, 1968; Stiles y Choromanski, 1984, 1987). Una de las desventajas de la técnica es que sólo se puede practicar en la época de reproducción, otra es que en los huevos fecundados con frecuencia se aprecia material celular que interfiere en la observación de los cromosomas.

Otro procedimiento que se ha aplicado en mejillones es el que emplea branquias, que tiene por principal ventaja el hecho de que se puede utilizar en cualquier época del año (Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986; Méndez *et al.*, 1990). Pero no está exenta de dificultades, una que ha sido mencionada por diversos autores, es la del bajo número de mitosis por preparación en los organismos adultos (Dixon, 1983; Moynihan y Mahon, 1983; Al-Sabti y Kurelec, 1985).

Por la problemática mencionada se procedió a buscar alternativas y una fue la de inyectar colchicina, diluida en solución fisiológica, a los mejillones, permitiéndoles reposar

durante varios tiempos en un ambiente fresco y con burbujeo de aire, con ello se logró que las células del organismo continuaran su ciclo hasta quedar detenidas en metafase debido al efecto de la colchicina (Therman, 1986). Este procedimiento es muy diferente al citado por otros autores, por ejemplo Moynihan y Mahon (1983) que extraen las branquias, luego las cortan en trozos que sumergen durante 30 minutos en colchicina diluida en agua de mar al 50%, lo cual resulta un medio hipotónico para ese tipo de tejidos. Tal tratamiento es muy agresivo para las células y además la exposición es breve; quizás por ello se obtienen pocas metafases. En contraste, en el método de la inyección se amplió considerablemente la duración de la exposición a la colchicina que alcanzó hasta 8 horas, mientras que los lapsos que comúnmente se utilizan en la mayoría de los sistemas experimentales, varían de 30 minutos a 2 horas. Esto sugiere que en experimentación, cuando se persiguen ciertas metas, es válido el salirse de los marcos convencionales. Cabe aclarar que con el método que aquí se presenta se alcanza una cantidad moderada de metafases, pero es suficiente para abordar diversos temas que incluyen análisis cromosómico. Para precisar este punto cabe mencionar que Al-Sabti y Kurelec (1985), en un estudio de aberraciones cromosómicas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* examinaron un promedio de 20 células por preparación y comentan acerca del tiempo invertido en el análisis; en *M. californianus* es posible obtener 60 ó más metafases por laminilla.

En cuanto a tubo digestivo se observan pocas metafases por preparación, sin embargo este es un avance que genera expectativas

en el sentido de que se podría aumentar tal cantidad si se probaran otras formas de aplicación de la colchicina o bien otras concentraciones.

METODO DEL ACUARIO CON COLCHICINA

Otro procedimiento que se realizó fue el que consistió en sumergir a los organismos en un acuario que contenía colchicina diluida al 0.04% en agua de mar filtrada. Algunos autores habían comentado en diversos trabajos que exponían los mejillones de las especies *Mytilus edulis* (Dixon y Clarke, 1982) y *M. galloprovincialis* (Al-Sabti y Kurelec, 1985) a la colchicina. En tales reportes se indican básicamente dos datos:

1) la concentración de la colchicina fue 0.04% y 2) el tiempo de exposición fue de 6 horas. Entre los detalles que no fueron mencionados y que quedaban como interrogantes están los siguientes: 1) ¿Qué volumen de colchicina se utilizó?, 2) ¿como se aplicó la colchicina, esto es por medio de inyección o por inmersión de los organismos en la solución?, 3) si se sumergían cómo se les mantenía ¿con o sin aeración?. Para resolver dichas interrogantes se probaron dos volúmenes de colchicina, 1 y 2 L, en ensayos preliminares y con ambos se obtuvo respuesta positiva; sin embargo, se optó por la cantidad mayor porque los organismos permanecen varias horas y al igual que cualquier ser vivo excretan, de tal forma que en 1 L se "estresan" más que en 2 L. Se probaron de 1 hasta 8 horas y los mejores resultados fueron con 6 y 8 horas; en promedio 210 metafases con 8 horas, sin embargo con una exposición de 4 horas se pueden obtener más de 50

metafases. El acuario con colchicina siempre se mantuvo cerrado, con aeración y en lugar fresco con temperaturas que oscilaron entre 18 y 21°C. En tales condiciones se pueden procesar adecuadamente de 6 a 8 organismos con tallas de 5 a 7 cm de longitud.

Un aspecto clave es el tipo de tratamiento que se practique y el manejo que se le proporcione al organismo completo y a sus tejidos, ya que no es lo mismo extraer trozos de branquias y aplicarles a colchicina diluida en agua de mar (Moynihan y Mahon, 1983), que exponer al mejillón vivo, sin ser maltratado, a un ambiente fresco y con aeración que de alguna forma simula al normal, excepto por la presencia de colchicina que está deteniendo a las células en metafase.

Las limitaciones del método del acuario con colchicina son diversas: una es su costo en reactivos, requiere mucha colchicina, otra es el riesgo para la salud, por lo que deben de extremarse las precauciones al manejar los organismos sumergidos en el fármaco y una desventaja mas es que en los tiempos mayores de exposición los cromosomas se acortan, lo cual dificulta su análisis.

Como comentario adicional se puede señalar que la concentración de colchicina al 0.04% no es la única que se ha utilizado en mejillones, por ejemplo Dixon (1982) la ha empleado al 0.01% en embriones de *Mytilus edulis* durante 2 horas. Otros autores también han aplicado variaciones menores a diferentes animales marinos. Lo que es más importante en este tipo de reportes es que se presenten los detalles técnicos, cada vez que

un autor resuelva un problema para una especie en particular y no pasarlos por alto o dejarlos en calidad de obvios.

ACERCA DE LOS CROMOSOMAS DE *Mytilus californianus*

El conocimiento del cariotipo completo es fundamental para realizar un estudio de aberraciones cromosómicas. Es necesario conocer la forma y el tamaño de cada uno de los cromosomas normales, así como sus polimorfismos en estructuras como tallos, satélites, constricciones secundarias, etc. Esto es básico para evitar confundir, por ejemplo constricciones prominentes con hendiduras o bien satélites grandes cuyos tallos no estén tejidos o que sean muy delgados, con fragmentos cromosómicos.

Como algo complementario, el análisis cuantitativo también es de apoyo, ya que por medio de él se puede saber con más precisión si un cromosoma muy grande o uno muy pequeño en una célula es normal o anormal, a partir de la comparación de parámetros cuantitativos, tales como longitud relativa, entre los cromosomas de células normales y anormales. Esto sería de utilidad en caso de que hubiera dudas, puesto que se podría saber cuanto es más grande el cromosoma "muy grande" en relación con un cromosoma normal, por ejemplo número 1 ó en su caso cuanto es menor el cromosoma diminuto con respecto al mas pequeño de los normales. También se podrían detectar inversiones, por ejemplo las pericéntricas, a través de las cifras del índice centromérico y de la relación de brazos. Así mismo, los parámetros longitud relativa e índice de brazos, conjuntados permitirán evidenciar inversiones pericéntricas y translocaciones.

El reporte de Ahmed y Sparks (1970) es el único antecedente conocido a la fecha sobre los cromosomas de *M. californianus*, en el cual se estableció el número diploide = 28 y se señaló que el cariotipo constaba de tres pares de acrocéntricos y de 11 pares de submetacéntricos y metacéntricos, sin indicar cuantos de uno u otro tipo. El cariotipo fue realizado con los dibujos de cámara lúcida de los cromosomas de ovocitos fecundados y de embriones de pocas células. La calidad del cariotipo impedía precisar las características cromosómicas.

La información que se maneja en esta tesis es el producto del análisis de células de branquias. Los cromosomas son nítidos en cuanto a forma y se puede determinar su cariotipo: metacéntricos (M) = 3 pares, submetacéntricos (SM) = 6 pares, subtelocéntricos (ST) = de 4 a 5 pares y telocéntricos (T) = 1 par o ausentes.

M. californianus puede presentar un par de telocéntricos en el cariotipo de algunos organismos, pero es posible que en otros dicho par sea ser subtelocéntrico o también puede ocurrir la situación de heterocigosis (T/ST). Lo cual quizá refleja alguno de los heteromorfismos que detectaron Ahmed y Sparks (1970). Al comparar el cariotipo de *M. californianus* con el de otras especies, por ejemplo con *M. edulis* de Irlanda e Inglaterra, se aprecian algunas diferencias pequeñas, *M. edulis* presenta 6 pares de metacéntricos y 8 pares entre submetacéntricos y subtelocéntricos (Moynihan y Mahon, 1983; Dixon y Flavell, 1986). En tanto que en poblaciones de Francia se ha observado que posee 2 pares de metacéntricos, 6 de submetacéntricos y 6 de subtelocéntricos (Thiriot-Quévrevux y Ayraud, 1982; Thiriot-Quévrevux, 1984a). Es

evidente que aún entre las poblaciones de *M. edulis* existen diferencias, obsérvese por ejemplo el número de metacéntricos; sin embargo al comparar los pares de cada tipo que presentan las distintas poblaciones, se encuentra que *M. californianus* de la costa norte de Baja California tiene cierta semejanza con *M. edulis* de Francia. Por otro lado al comparar el cariotipo de *M. californianus* con el de *M. galloprovincialis* hay una pequeña discrepancia en el número de metacéntricos, ya que, Thiriot-Quévieux y Aurad (1982) y Thiriot-Quévieux (1984a) hallaron que las poblaciones de Francia sólo mostraba una diferencia menor con respecto a las poblaciones de *M. edulis* de la misma zona, ésta consiste en que el par 2 de *M. edulis* es metacéntrico mientras que en la otra especie es telocéntrico. Cabe aclarar que dicha desigualdad no fue registrada en un estudio comparativo que hicieron Dixon y Flavell (1986) con las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, sin embargo los organismos provenían de regiones distintas, ya que la segunda especie fue colectada en Venecia.

En lo referente al aspecto cuantitativo, las disimilitudes son algo más finas y resulta más compleja su discusión e interpretación, por ejemplo Thiriot-Quévieux (1984) compara los datos de tres especies de mejillones entre ellas *M. edulis* y *M. galloprovincialis* y encuentra que el par 1 es metacéntrico y tiene una longitud relativa entre 9 y 10 y en ambas especies existe una discrepancia mínima. En *M. californianus* el par 1 también es metacéntrico y su longitud relativa es cercana a 9, la pregunta inmediata es la siguiente: ¿es ésta una diferencia real o es sólo

un reflejo de una disparidad en la toma de datos, por ejemplo en las mediciones? otra pregunta es ¿ qué significado podría tener tal disimilitud en caso de que fuese real, por decir algo, en el sentido de la evolución cromosómica en el género *Mytilus*?. En síntesis, si existen múltiples variaciones cuantitativas, principalmente pequeñas, en varios pares de cromosomas entre las especies *M. californianus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, pero su significado no es claro.

Una forma distinta de abordar el análisis de cromosomas es mediante las técnicas de bandas (G, Q, R, C y NOR), que ofrecerían un tipo de información complementaria a la cuantitativa, pero los estudios con este enfoque son escasos en bivalvos, aunque hace más de 15 años Babrakzai *et al.* (1976) plantearon su utilidad, sin hacer una demostración práctica. Uno de los primeros trabajos de este tipo es el de bandas G en cromosomas metafásicos de *Crassostrea virginica* (Rodríguez-Romero *et al.*, 1979).

En mejillones existen pocos antecedentes: uno es el esquema de bandas que presentan Moore *et al.* (1986), en *Mytilus edulis* proveniente de Inglaterra en donde se pueden contar 152 bandas (oscuras y claras) pero aquí se observa que tal esquema no es acompañado por fotografías. En un trabajo distinto, Dixon *et al.* (1986) presentan algunas regiones heterocromáticas que son referidas como organizadoras del nucleolo. Otro avance fue dado por Méndez *et al.* (1990), en *M. galloprovincialis* colectado en España, en cuyos cromosomas metafásicos pueden detectarse 160 bandas. A los datos citados viene a sumarse la información de esta tesis, las bandas G de los cromosomas profásicos de *Mytilus*

californianus de Baja California, en donde es posible identificar aproximadamente 300 bandas (oscuras y claras) por juego haploide. Y aunque no son de óptima calidad, éstas se observan en la fotografía que se adjunta al esquema (Fig. 12). El cariotipo con cromosomas profásicos que aquí se presenta tiene como propósito el mostrar la posibilidad de ejecutar análisis muy finos de cromosomas que permitirá detectar inversiones, deleciones y translocaciones muy pequeñas, en la misma forma que actualmente se analizan los cromosomas de humanos, de simios y de ratones. Tal vez los estudios de alta resolución no se pudieran practicar en mejillones de manera rutinaria, así como tampoco lo son en Citogenética clínica de humanos, pero seguramente se podrían realizar en investigaciones de carácter básico, por citar un caso: para conocer si cierto agente químico lesiona con mas frecuencia alguna región o banda de un cromosoma. También los estudios de cromosomas profásicos podrían aplicarse para entender mejor la evolución del género *Mytilus*.

Desde luego que es más factible llevar a cabo los análisis de bandas G y Q en cromosomas metafásicos, sólo que las técnicas para moluscos aún no se aplican de manera cotidiana debido a que no han sido definidas con precisión.

DAÑO GENETICO EN MEJILLONES

A) EVALUACION IN SITU DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN BRANQUIAS

Una vez establecidos los procedimientos para obtener un número elevado de metafases y conocidos adecuadamente los cromosomas del mejillón *Mytilus californianus*, entonces se procedió a hacer

evaluaciones de aberraciones cromosómicas en tres sitios de Baja California. Se escogieron dos lugares (Rompeolas y Km 105) dentro de la Bahía Todos Santos, por ésta es donde se descargan las aguas residuales domésticas e industriales de la Ciudad y Puerto de Ensenada, BC (durante años esos lugares, entre otros, se han cerrado a los bañistas). El tercer sitio es el Ejido Eréndira (particularmente Punta Gabras) que queda aproximadamente a 80 Km al sur de Ensenada. En este lugar existen poblaciones grandes de mejillones expuestas al oleaje intenso de mar abierto. Se puede considerar a Eréndira como una de la zonas ricas en mejillones, que está menos impactada por la ciudades y el campo; ya que a lo largo de la costa de BC existen varias ciudades y pueblos pequeños, así como varias regiones agrícolas.

Se decidió practicar el análisis de aberraciones cromosómicas en branquias porque es el órgano que proporciona mayor número de metafases por preparación y porque es de los más expuestos al ambiente.

En la tabla VIIa, se observa que el sitio con menos frecuencias de aberraciones cromosómicas es Eréndira, que es el mas limpio, el cual a su vez presenta diferencias estadísticamente significativas con relación a los dos sitios de la bahía; no existen discrepancias entre estos últimos (Tabla VIIb).

Al comparar la información de Eréndira con la de los testigos de los ensayos realizados con mitomicina C (MMC) (Tabla VIIc), no se aprecia diferencia significativa. Cabe hacer la aclaración que los mejillones provenían del mismo sitio y que las diferencias fueron: el proceso experimental que duró 24 horas de exposición a

1 L de agua de mar con aeración y sin MMC, así como el número de organismos analizados, que fueron 4 por cada lote experimental. En los dos grupos que se trataron con MMC durante 24 horas y con colchicina 6 horas adicionales, se puede observar una respuesta positiva en cuanto a la producción de aberraciones cromosómicas (Tabla VIII). Las diferencias son significativamente más elevadas (14.85% y 20.48%) que las más altas de los sitios analizados in situ (Km 105 = 6.96% y Rompeolas = 5.04%).

Todos los organismos se procesaron o se utilizaron en los experimentos, dentro de las primeras 24 horas después de la colecta. Esto se hizo para evitar que los factores ambientales de los acuarios los afectaran, tales como: el agua (que es tratada con luz ultravioleta), la alimentación, las bacterias u otros elementos los cuales han sido comentados por algunos autores (Jones y Harrison, 1987), como elementos que pudieron haber alterado a sus propios estudios con *Mytilus edulis*. No obstante otros los han omitido en las discusiones de sus artículos (Dixon y Clarke, 1982; Al-Sabti y Kurelec, 1985). Los datos que se obtuvieron de Eréndira, que son los más bajos en aberraciones cromosómicas, son similares a los que se detectaron en Whitsand Bay, Inglaterra, (Dixon y Clarke, 1982). Sin embargo existen desigualdades entre los trabajos, de éstas destacan las siguientes: en Inglaterra se emplearon organismos *Mytilus edulis* con tallas de 1.5 a 2.6 cm (en BC se utilizó *M. californianus* de 5 a 7 cm), se les mantuvo en acuarios durante 10 días en donde se les alimentó con una dieta para peces tropicales (en BC se les procesó inmediatamente después de la colecta o dentro de las

siguientes 24 horas) y se les trató con bromodesoxuridina (BrdU) (en BC no se aplicó ese agente). Aunque sólo se analizaron aberraciones cromosómicas en las células de primera división, la BrdU no deja de ser un factor externo que afecta a los organismos. Dixon y Clarke (1982), observan que con una concentración de 6×10^{-5} M de MMC se producen de 10 a 28% de AC (aproximadamente), en tanto que con la misma concentración en *M. californianus* se obtuvo en promedio $14.85\% \pm 3.93$ y con el doble de MMC se alcanzó un $20.48\% \pm 8.91$.

Al comparar los datos recopilados de Eréndira con los que registraron Al-Sabti y Kurelec (1985) en el area de Rovinj, en el norte del mar Adriático, en Yugoslavia, se observa que la frecuencia de AC (2.11%) de Eréndira es más baja que la obtenida en el sitio con menor frecuencia de Rovinj (2.9%) y a su vez la más alta de la Bahía Todos Santos (6.96%) fue menor que la de Rovinj (7.7%) y notablemente inferior que la que obtuvieron los yugoslavos en un experimento de transplante, en donde expusieron sus organismos a diferentes sitios (en uno de ellos se alcanzó 10.1% de AC). Aquí se debe aclarar que en Yugoslavia se utilizó a la especie *Mytilus galloprovincialis* con tallas de 5 a 7 cm y se procesaron en el lapso de 1 h después de la colecta. El procedimiento practicado en BC es similar al de los yugoslavos, con la diferencia de que en el nuestro se utiliza a la especie regional más abundante que es *Mytilus californianus*. En esta etapa del trabajo de BC se emplearon branquias al igual que los europeos, pero es difícil compararlos ya que se trata de organismos de especies distintas, colectados en latitudes

diferentes y con tallas diversas. Algunos autores han comentado la conveniencia de uniformizar en principio las tallas, particularmente se ha señalado para los estudios de contaminación química (Bayne, 1976a; Goldberg et al., 1978). Sin embargo, también es conocido que la longitud sólo indica una aproximación a la edad, ya que si los organismos de la misma especie se desarrollan en ambiente distintos (diferente temperatura, alimentación, contaminación, etc.) alcanzan dimensiones diversas en un tiempo idéntico (Bayne, 1976a). De igual manera se ha demostrado que cuando son especímenes de diferentes especies, éstos logran tamaños dispares en el mismo ambiente, en un tiempo dado (Lobel et al, 1990) y por lo tanto si se confunden especies y se colectan sólo por su longitud en un sitio, lo que se encuentra es que algunos han bioacumulado más agentes químicos, por el hecho de haber estado expuestos al ambiente durante un período mayor, por tener mas edad (Evtushenko et al., 1990). Ello tiene sus implicaciones en mutagénesis ambiental ya que no es adecuado comparar a ejemplares con diferente lapso de exposición a mutágenos y analizarlos, como si fueran iguales. Ni es conveniente mezclar organismos viejos con jóvenes, ni a los de una especie con otra porque su metabolismo no es similar, lo cual ha sido demostrado en diversos sistemas de prueba, como son: ratones, ratas, plantas, etc. (Bukema et al., 1982; Ma et al., 1982; Aeschbacher, 1986).

Los trabajos de Dixon y Clarke (1982) y de Al-Sabti y Kurelec (1985) son los únicos que tratan de aberraciones cromosómicas en mejillones; de ellos, el segundo es el que aborda el análisis de

adultos expuestos a condiciones ambientales. Otro trabajo que no puede compararse directamente con la información antes citada, es el desarrollado por Dixon (1982) en donde se presentan datos sobre aneuploidias en embriones de pocas células. Los mejillones de los que se extrajeron los gametos y a partir de ellos embriones, se colectaron en dos lugares: uno considerado contaminado y otro limpio, pero no se analizan aberraciones cromosómicas porque la calidad de los cromosomas obtenidos no lo permitió. Los resultados indican que el 40% de los embriones tienen anormalidades mitóticas en el ambiente contaminado, en tanto que en el considerado limpio se detecta sólo el 18% de alteraciones. Tales datos sugieren que el daño genético pudo ser causado por los agentes tóxicos acumulados en las reservas de los lípidos del embrión, lo que debería comprobarse bajo experimentos de laboratorio en los que se evaluara la relación dosis-efecto, pero ello implicaría necesariamente un trabajo largo bajo un esquema que demostrara fielmente que las gónadas y sus gametos acumularon ciertas cantidades del agente que se estudia. Los experimentos de este tipo se han realizado en erizos de mar y se ha demostrado que con el cadmio se produce descendencia anormal (Gnezdilova *et al.*, 1989).

(B) EVALUACION IN SITU DE MICRONUCLEOS EN BRANQUIAS

Paralelamente al estudio de aberraciones cromosómicas se hizo el análisis de micronúcleos (Mn), para lo cual se colectaron otros 10 mejillones en cada sitio (distintos a los empleados para AG). Los organismos se procesaron sin tratamiento de colchicina y sin

choque hipotónico.

Los resultados muestran que el sitio con menor frecuencia de micronúcleos es Eréndira (0.16%) mientras que los más contaminados presentan frecuencias altas (Km 105 = 0.47 y Rompeolas = 0.37%), existen diferencias significativas entre Eréndira y los 2 últimos (Tablas VIIa y VIIb), en tanto que entre Km 105 y Rompeolas existe una discrepancia en apariencia, pero ésta no es significativa de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney (Tabla VIIb).

De manera paralela se trataron 2 lotes de 4 organismos con MMC durante 24 h y se dejó un tercero como testigo. Se observó un incremento significativo en los expuestos, como era de esperarse (Tabla VIIIc), mientras que el testigo se comportó de manera similar a Eréndira (Tabla VIIa), que fue donde se colectaron los mejillones del experimento con MMC.

El efecto de la MMC sobre la frecuencia de Mn en branquias de mejillones, ya había sido probado por Majone *et al.* (1987) en la especie *M. galloprovincialis*, quienes detectaron a una concentración de 10^{-7} M entre 0.9 y 1.0% de Mn, que es más bajo a lo obtenido en el ensayo con *M. californianus*, aunque en éste se empleó una concentración mayor (6×10^{-6} M) (Tabla VIIIc).

La prueba de micronúcleos es antigua, ya desde la década de los 50, se le empleaba para medir el daño genético en *Vicia faba* provocado por agentes como los rayos gamma (Evans *et al.*, 1959). Sin embargo es hasta la década de los 70 cuando se convierte en un ensayo de amplio uso en diferentes especies y que a la fecha sigue siendo vigente (Matter y Schmid, 1971; Jenssen, 1982;

Högstedt y Karlsson, 1985; Villalobos-Pietrini et al., 1990).

Los micronúcleos empezaron a ser evaluados en branquias de mejillones *Mytilus galloprovincialis* del mar Mediterráneo, primero bajo condiciones experimentales de acuarios (Majone et al., 1987; 1988; Scarpato et al., 1990) y después en organismos colectados de diferentes ambientes, algunos considerados contaminados (Brunetti et al., 1988; Scarpato et al., 1990). De hecho esta prueba ha sido considerada como la opción mas práctica para la evaluación del daño genético en las poblaciones de mejillones, debido a que diversos autores han encontrado dificultades para la obtención de metafases analizables (Brunetti et al., 1988). Tal vez esos señalamientos sean provocados por la elevada variabilidad interindividual en cuanto a la producción de metafases, que también se ha evidenciado en nuestros trabajos con *M. californianus*. Tal variabilidad es mucho mayor que la que se puede apreciar en otros casos, por ejemplo en los cultivos de linfocitos humanos.

En Italia los trabajos acerca de las frecuencias de Mn revelan datos altos en zonas contaminadas con descargas industriales y urbanas como son La Spezia Roads y Laguna de Venecia (Brunetti et al., 1988). Al confrontar tal información con la de BC la diferencia es notable con relación a La Spezia Roads. El valor mayor con *M. californianus* fue 0.47% (Km 105) y el menor 0.16% (Eréndira); en La Spezia Roads el más elevado fue 0.93% y el bajo 0.41%, mientras que en Laguna de Venecia el alto fue 0.49% y el bajo 0.21%. Cabe hacer notar que el tamaño de muestra por sitio fue igual (10 organismos), la talla fue parecida (de 5 a 7 cm en

los de BC y de aproximadamente 5 cm en los de Italia), en *Mytilus californianus* se revisaron 2,000 células por organismo y en los de Italia 1,000.

En el trabajo de Scarpato et al. (1990), se hicieron diversos experimentos de laboratorio y de trasplantes en un estuario y en un puerto. La especie *M. galloprovincialis*, se colectó en varios sitios de La Spezia en Italia, cada muestra consistió de sólo 3 organismos (talla de 4 cm), excepto en los testigos que son 5 y examinaron 2,000 células por individuo. Al comparar las cifras de sus testigos se observa que son diferentes (0.22%, 0.29% y 0.67%) y las frecuencias más altas se obtuvieron después de tres semanas del trasplante al estuario de Fiume Morto (0.95%) y al Puerto de Livorno (0.95%). Resulta curioso el dato de que la frecuencia de Mn baja conforme transcurre el tiempo de exposición, por ejemplo disminuye en Fiume Morto a 0.55% a las 12 semanas y a 0.43% a las 15 semanas, después vuelve a aumentar pero no se alcanza el 0.95%. Dicho fenómeno también fue detectado por Brunetti et al. (1988), en el estudio de las Spezia roads, precisamente en la única que analizaron tres muestras con dos semanas de intervalo entre cada una (muestra 1 = 0.93% , muestra 2 = 0.56% y muestra 3 = 0.15% Mn). De los tres lugares restantes sólo en dos, tomaron dos lotes de organismos y éstos no variaron significativamente y señalan que en el tiempo transcurrido entre las muestras 1 y 2 fue reportada mortalidad en masa de peces en la zona. Ahora bien, si para detectar micronúcleos se requiere que las condiciones ambientales no provoquen muerte, entonces quizás la causa de la disminución de las frecuencias de Mn se deba al aumento de los

niveles de contaminación marina, que a su vez provocó muerte en los mejillones, cuestión que es probable puesto que se apreció una disminución en el tamaño de la población durante la toma de la muestra 3.

C) EVALUACION IN SITU DE MICRNUCLEOS Y NUCLEOS HETEROPICNOTICOS EN TUBO DIGESTIVO

En mejillones el tubo digestivo no se había empleado para hacer estudios de daño en cromosomas y núcleo interfásico. Se consideró que sería conveniente intentar hacer evaluaciones en dicho órgano, puesto que haría avanzar mas el entendimiento de lo que ocurre en los individuos, como unidades. Así mismo se avanzaría en el sentido de hacer del mejillón un sistema de prueba parecido a lo que en la actualidad son: el ratón, la rata y la mosca de la fruta, entre otros. En el tracto digestivo de otras especies (ratones) se han realizado ensayos de genotoxicidad (Dolara *et al.*, 1986; Goldberg y Chidiac, 1986). También se ha utilizado en la obtención de metafases para análisis de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en peces (Kligerman *et al.*, 1975; Kligerman, 1979).

El tubo digestivo está tan expuesta como las branquias al ambiente o tal vez más, ya que entra en contacto con el agua, que a su vez lleva microalgas, bacterias, partículas de materia orgánica y también agentes tóxicos y los mejillones filtran todo eso porque no son selectivos, de ahí su enorme importancia para la evaluación de la calidad del ambiente (Bayne, 1978; Goldberg *et al.*, 1978). Luego, los tóxicos disueltos en el agua afectan por

igual a las

branquias y al tracto digestivo; sin embargo en el tubo digestivo además se lleva a cabo la lisis y metabolismo de las microalgas y bacterias que pueden tener adsorbidas a su pared celular o contener en su citosol a contaminantes como: Zn, Co, Cd, Hg, etc, que entonces entrarían en contacto con las células del tracto digestivo y del resto del organismo (Skel et al., 1976; Biggs et al., 1980; Egorov y Kulebakina, 1988).

En almejas y mejillones se ha demostrado que las enzimas del aparato digestivo convierten a las aminas aromáticas en mutágenos detectables por la prueba de Ames (Anderson y Döös, 1983; Britvic y Kurelec, 1986). Así mismo se ha observado que poseen la capacidad de biotransformar a diversos carcinógenos en agentes capaces de dañar al ADN (Kurelec et al., 1988).

Por otra parte, los estudios del contenido de agentes como Cd, bifenilos policlorados y otros contaminantes, han demostrado que en bivalvos, las branquias son de los órganos con menores concentraciones, mientras que las mas altas se localizan en el aparato digestivo (Gutiérrez-Galindo et al, 1983a, b; Evtushenko et al., 1990).

Por todo lo expuesto, se hizo una evaluación de los micronúcleos y de núcleos heteropicnóticos en el tubo digestivo de los mejillones *M. californianus*. No se presentan los resultados de aberraciones cromosómicas porque es baja la cantidad de metafases analizables que hasta la fecha se ha podido lograr. Se evaluaron cuatro poblaciones: tres ubicadas en la Bahía Todos Santos (una adicional a las dos del estudio de aberraciones cromosómicas en

branquias, denominada Punta Banda) y la cuarta que es Eréndira, al sur de Ensenada. Los 10 organismos por sitio se colectaron en diciembre de 1989, aproximadamente dos meses después de los que se emplearon para el análisis de branquias y su talla media fue de 7 cm. Se examinaron en promedio 1,000 células por individuo, porque es menor la cantidad de material por preparación si se comparan con lo que se registra en las branquias.

Se observa que la zona con menor frecuencia de micronúcleos es Eréndira con 0.05% y la más alta fue Km 105 con 0.33%. Es inesperado que el sitio más próximo a Km 105, que es Rompeolas, aproximadamente 2 Km de distancia, presente 0.17% y que éste a su vez sea tan parecido al del extremo sur de la bahía que es Punta Banda (0.18%) (Tablas IXa y IXb).

Algo notable es que la tendencia en cuanto a frecuencias de Mn se mantiene en relación con las branquias (0.16%); esto es que en los dos órganos se observan las cifras más bajas en Eréndira y las más altas al interior de la bahía, no obstante que en el tubo digestivo se alcanzan frecuencias menores de micronúcleos que en las branquias, lo cual no se esperaba (Fig. 23). Una explicación puede ser que existan diferencias en las tasas de proliferación celular de los epitelios de ambos órganos de tal manera que posiblemente el que tenga menor tasa manifestará frecuencias más bajas de Mn, ya que éstas estructuras dependen de que se lleve a cabo la mitosis. Un hecho que apoya tal hipótesis es el escaso número de metafases obtenidas en mejillones tratados con colchicina, en otros experimentos, en los que se observa un índice mitótico bajo. Otro planteamiento es que si el tubo digestivo está expuesto

a agentes citotóxicos que abaten la proliferación celular, entonces también disminuirá la frecuencia de Mn. Desde luego estas hipótesis requieren de una comprobación experimental.

Por otra parte, la evaluación de la heteropicnosis se hizo en las mismas preparaciones en que se analizaron los micronúcleos del tracto digestivo. En este aspecto se observó que Eréndira presenta 3.63% de núcleos heteropicnóticos, mientras que en dos de los sitios de la bahía se registraron 16.86% (Rompeolas) y 14.09% (Punta Banda) y el tercero 3.38% (Km 105) (Tablas Xa y Xb, Fig. 24). Las muestras de Km 105 habían tenido en los análisis anteriores, las frecuencias más altas de aberraciones cromosómicas y de micronúcleos, en branquias y tubo digestivo, por ello se puede sospechar que probablemente el fenómeno que conduce a que la cromatina se condense en extremo y se muestre heteropicnótica, no tiene relación directa con los procesos que llevan a la formación de los micronúcleos, como son: el rompimiento de cromosomas, la inactivación de centrómeros y la destrucción de los microtúbulos del aparato mitótico.

En cuanto a la evaluación de heteropicnosis, se puede señalar que se realizó como una observación adicional a la prueba de micronúcleos, ya que aunque no es propiamente una mutación se ha considerado por mucho tiempo como indicadora de citotoxicidad. Este fenómeno que algunos autores en ocasiones lo llaman picnosis o cromatina con alto grado de compactación (Brown *et al.*, 1977), se ha observado regularmente en diversos tipos de neoplasias de mejillones, almejas, ostiones y otros; desde luego dicha característica no es única, ya que también se registran

núcleos gigantes, células multinucleadas y núcleos lobulados e irregulares (Farley, 1976; Hashbarger, 1976). Así también en intestino de ratones se han realizado análisis de anomalías en núcleo interfásico con el propósito de evaluar a los agentes cancerígenos (Wargovich *et al.*, 1983; Goldberg y Chidiac, 1986).

El significado de la heteroploidosis no está muy claro, tal vez está asociado a cambios en los diferentes niveles de estructuración de la cromatina y a los consecuentes efectos en la represión o desrepresión de los genes (Nicolini, 1983; Weintraub, 1985).

Una cuestión real es que cuando se examinan las células en preparaciones de órganos como las branquias y el tubo digestivo se aprecia que la mayoría de los núcleos tienen aspecto que se denomina normal, pero el resto está constituido por núcleos fragmentados, heteroploidicos, apoptóticos, etc; sin embargo estos datos con frecuencia no se anotan, por lo que queda una pregunta que es: ¿hasta que punto se está haciendo una buena evaluación de la genotoxicidad del ambiente o del agente que se está estudiando? Una opción sería el cuantificar las diferentes anomalías, aunque no se tenga muy claro el mecanismo que las causa ni cuales son sus efectos, ya que también este es el caso de los intercambios de cromátidas hermanas, método que se emplea con frecuencia y que es más costoso en tiempo y recursos.

D) ENSAYOS DE SOBREVIVENCIA *IN VITRO* DE HEMOCITOS Y BRANQUIAS

Es necesario reconocer que la historia de los cultivos de células es antigua; existen registros de que Roux en 1885 mantuvo vivos por un tiempo breve a tejidos de pollo y por su parte Arnold en 1887 cultivó leucocitos por primera vez al transplantarlos bajo la piel o la cavidad abdominal de una rana. Poco después principió la era de los cultivos fuera de los cuerpos, esto es, los estudios *in vitro*. Entre los investigadores más destacados que estudiaron estudiaron los leucocitos se encuentra Jolly, quien en 1903 investigó la sobrevivencia y la división bajo condiciones *in vitro* (Wasley y May, 1970). Coincidentemente, también se ha atribuido a Jolly (1905) la primera descripción de los micronúcleos (Brunetti et al., 1988).

En moluscos se han desarrollado diversos métodos para el cultivo de órganos como pie, corazón y manto, que se fundamentan en soluciones balanceadas y en algún tipo de suero u otro componente nutricional. Al principio el propósito principal fue el análisis de los efectos de patógenos como bacterias o parásitos (Flandre, 1971), lo cual hasta la fecha sigue siendo importante, no sólo en esos campos sino también en otros como Fisiología celular, Endocrinología y Toxicología (Bayne, 1976b; Goldberg y Frazier, 1989; Madhyastha et al., 1991).

En la Toxicología en los últimos años se han notado dos problemas graves dentro de las experimentación con animales completos: 1) el costo elevado de las pruebas que requieren los miles de sustancias nuevas que salen al mercado y 2) el reclamo que hacen público, las sociedades protectoras de animales, de las denominadas 'matanzas' o sacrificio inútil de miles de animales

durante los experimentos (Goldberg y Frazier, 1989). De hecho es conocido que existen revistas que no aceptan para su publicación las investigaciones en donde esté involucrado el sacrificio innecesario de animales.

Una de las alternativas a la experimentación con animales completos es el trabajo con cultivo de fragmentos de órganos y células. Estos, en bivalvos como almejas, ostiones y mejillones, se han cultivado con el medio de Benex, que contiene varias sales, glucosa, vitamina C y antibióticos. La especie de mejillón que más se ha investigado desde este enfoque es *M. edulis* (Lubet et al., 1978; Cornet, 1992). De *M. californianus* es menos lo que se conoce (Ellis y Bishop, 1984).

En cuanto al cultivo de los hemocitos de diferentes moluscos se tienen antecedentes como el reporte de Tripp et al. (1966) quienes mantienen explantes de corazón en una mezcla compleja (solución salina, suero de pollo y suero de vertebrados), durante muchos días y realizan observaciones sobre la fagocitosis y acerca del origen de las células multinucleadas. En dichos fenómenos también trabajaron Foley y Cheng (1975), principalmente en fagocitosis del ostión *Crassostrea virginica* y la almeja *Mercenaria mercenaria* y Anderson (1987), en el origen ontogenético de los hemocitos multinucleados de la almeja *M. mercenaria*. Pero a pesar de los antecedentes, no existe alguno que indique que hubiesen detectado evidencias de la división de los hemocitos in vitro (Tripp et al., 1966; Anderson, 1987; Kumazawa et al., 1990). De ahí la importancia relativa de los datos que en esta tesis se presentan.

El primero es acerca de la posibilidad de mantener vivos a los hemocitos por varios días en un sistema de cultivo, en este estudio fueron 5 días, pero pudieran ser más (Fig. 30); en comparación, otros autores sólo han logrado mantener vivos los hemocitos de gasterópodos durante 3 días (Kumazawa *et al.*, 1990).

El segundo es mostrar la utilidad de una combinación de dos medios (McCoy + Benex), no empleada antes y que genera expectativas de éxito (Fig. 29).

El tercero es la presentación de evidencias de división celular como profases (Fig. 33). Falta aún probar el efecto mitogénico de diversas lectinas como fitohemaglutinina y concanavalina, de las que existen varios tipos.

Una desventaja de los hemocitos de los mejillones es la pequeña cantidad disponible por individuo. Se requieren de las tallas más grandes (12 a 15 cm) para obtener de 1 a 2 ml de hemolinfa y con eso se pueden cultivar pocos tubos (en promedio 4 por cada ml de muestra). Por otra parte los organismos grandes únicamente se localizan en lugares retirados de la Bahía de Todos Santos, de tal forma que no son accesibles en cualquier momento. Una alternativa es extraer la hemolinfa de 5 o más ejemplares de tallas menores (de 6 a 8 cm) y mezclarla; luego se puede desarrollar el experimento deseado. Esta opción también contribuye a eliminar la variabilidad interindividual en la respuesta al sistema de cultivo, por ejemplo cuando se está probando un medio durante 96 h y se hacen observaciones cada 12 h por duplicado, entonces se deben tener 18 tubos y eso nunca se podría realizar con la hemolinfa de un sólo ejemplar. La mezcla de este fluido

también sería apropiada para los estudios de mutagénesis y citotoxicidad.

Las branquias por su parte, son órganos grandes y accesibles de los que se pueden extraer numerosos fragmentos para su cultivo, de tal modo que este no sería un factor limitante para la experimentación. En la literatura, se mencionan estudios de branquias que se mantiene vivas durante pocas horas, por ejemplo, cuando se trabajan el movimiento ciliar (Bayne, 1976b). En cuanto a lo que es propiamente cultivos existe escasa información (Le Douarin, 1971; Cornet, 1992). En branquias de *M. edulis* no se ha tenido éxito en la producción de mitosis, lo cual ha sido uno de los principales retos en los estudios de análisis cromosómicos (Cornet, 1992).

En *Mytilus californianus*, los ensayos con cultivos de células y órganos son prácticamente desconocidos. El primer reporte fue el de Ellis y Bishop (1984), quienes lograron aislar células embrionarias y desarrollaron cultivos subsecuentes, pero no trabajaron con adultos.

Es en este contexto en el cual los avances que se tienen con *M. californianus* adquieren su valor. En principio es destacado el hecho de que se puedan mantener vivos los fragmentos de branquias hasta 96 h (Figs. 33 y 34) y aunque se observaron muy pocas mitosis en las preparaciones de los cultivos de 12 h, este dato no significa que se esté induciendo la división *in vitro*, ya que con tiempos mayores no se lograron detectar. Tal vez en experimentos posteriores se mejoren los resultados, probando otros medios y aplicando agentes que estimulen la división celular.

Otra cuestión que llama la atención es que la hemolinfa libre de hemocitos, no es un buen medio para las branquias, a pesar de su riqueza nutricional. Así mismo el agua de mar filtrada, que es tan común que se utilice en ejercicios de plazos breves (minutos y si acaso horas) no es útil como medio de cultivo ya que se aprecia un deterioro rápido después de 12 h (Fig. 33).

La sobrevivencia de las branquias (al igual que la de los hemocitos) depende de que se controlen dos factores claves: (1) la contaminación bacteriana y (2) el cambio diario de medio de cultivo, bajo condiciones de asepsia. El primer aspecto es difícil puesto que los organismos son filtradores y siempre sus branquias están en contacto con el ambiente. El segundo implica un manejo riguroso del ambiente y los medios. Una forma de disminuir la contaminación bacteriana es limpiando cuidadosamente las branquias antes del cultivo, el lavado puede ser primero con agua de mar filtrada y esterilizada y en segundo término se puede pasar a agua de mar adicionada con antibióticos como penicilina, estreptomycinina y colimicina. Estos deberán probarse, porque la contaminación bacteriana quizá sea diferente de un sitio a otro. En cuanto al cambio diario de medio, es posible señalar que permite aumentar el tiempo de sobrevivencia y la calidad de los cultivos; sin embargo, las branquias pueden sobrevivir en un sistema cerrado y sin cambio de medio durante varios días, presentando un comportamiento como el que se describe en la fig. 33. Si no se desea correr riesgos con el cambio diario de medio es recomendable probar el cultivar en diferentes volúmenes y lo que se podrá observar es que el mayor volumen permite cultivos por mas tiempo (Fig. 2).

Es preciso reconocer que hasta el momento los cultivos de hemocitos y branquias de mejillón no pueden ser utilizados para estudios de mutagénesis; sin embargo, es factible su aplicación en estudios de citotoxicidad, por ejemplo en la evaluación del movimiento ciliar y del daño a la membrana plasmática.

LITERATURA CITADA

- Aeschbacher, H.U. 1986. Rates of micronuclei induction in different mouse strains. *Mutat. Res.* 164: 109-115.
- Aguilar-Rosas, L.E., Bertsch, H. y Pacheco-Ruiz, I. 1988. Distribution and abundance of the mussel *Mytilus californianus* along the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Venus* 47: 62-70.
- Ahmed, M. y Sparks, A.K. 1970. Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biol. Bull.* 138: 1-13.
- Alink, G.M., Frederix-Wolters, E.M.H., van der Gaag, M.A., van de Kerkhoff, J.F.J. y Poels, C.L.M. 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutat. Res.* 78: 369-374.
- Al-Sabti, K. y Kurelec, B. 1985. Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 660-665.
- Anderson, R.S. 1987. Polykaryon formation by *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biol. Bull.* 172: 236-245.
- Anderson, R.S. y Döös, J.E. 1983. Activation of mammalian carcinogens to bacterial mutagens by microsomal enzymes from a pelecypod mollusk, *Mercenaria mercenaria*. *Mutat. Res.* 116: 247-256.
- Auerbach, C. 1973. History of research on chemical mutagenesis. En: Hollaender, A. (Ed.) *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* Plenum Press, Nueva York, Vol. 1, pp. 1-19.
- Ayala, F.J. y Kiger, J. 1984. *Genética moderna.* Fondo Educativo Interamericano. México, DF.
- Babrakzai, N., Miller, W.B. y Samsam, S. 1976. Procedures and methods in molluscan Cytology and Cytogenetics. *Bull. Amer. Malacol. Union* for 1976: 57-62.
- Bantock, C.R. y Cockayne, W.G. 1975. Chromosomal polymorphism in *Nucella lapillus*. *Heredity* 34: 231-245.
- Barsotti, G. y Meluzzi, C. 1968. Osservazioni su *Mytilus edulis* e

- M. galloprovincialis* Lamarck. Conchiglia 4: 50-58.
- Baumann, P.C. y Harshbarger, J. 1985. Frequencies of liver neoplasia in a feral fish population and associated carcinogens. Mar. Environ. Res. 17: 324-327.
- Bayne, B. 1976a. Watch on mussels. Mar. Pollut. Bull. 7: 217-218.
- Bayne, B. L. (Ed.) 1976b. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 506 p.
- Bayne, B.L. 1978. Mussel watching. Nature 275: 87-88.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Harrison, F. y Yevich, P.D. 1980. Mussel health. En: National Academy of Sciences. The International Mussel Watch. The National Research Council. Washington, DC, pp. 163-235.
- Bernáldez, A.C. 1987. La posquería del mejillón en Baja California. Acuavisión II: 30-31.
- Biggs, D.C., Powers, C.D., Rowland, R.G., O'Connors, H.B., Wurster, G.F. 1980. Uptake of polychlorinated biphenyls by natural phytoplankton assemblages: field and laboratory determination of ¹⁴C-PCB particle-water index of sorption. Environ. Pollut. 22: 101-110.
- Black, J.J., Maccubbin, A.E. y Johnston, C.J. 1988. Carcinogenicity of benzo(a)pyrene in rainbow trout resulting from embryo microinjection. Aquat. Toxicol. 13: 297-308.
- Britvic, S. y Kurelec, B. 1986. Selective activation of carcinogenic aromatic amines to bacterial mutagens in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol. 85C: 111-114.
- Brown, R.S., Wolke, R.E., Salla, S.B. y Brown, C.W. 1977. Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft shell clam (*Mya arenaria*). Ann. N.Y. Acad. Sci. 298: 522-534.
- Brunetti, R., Gola, I. y Majone, F. 1986. Sister chromatid exchange in developing eggs of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Bivalvia). Mutat. Res. 174: 207-211.
- Brunetti, R., Majone, F., Gola, I. y Beltrame, C. 1988. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44: 65-68.
- Bryan, G.W. y Langston, W.J. 1992. Bioavailability, accumulation

- and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76: 89-131.
- Buikema, A.L., Niederlehner, B.R. y Cairns, J. 1982. Biological monitoring. Part IV-Toxicity testing. *Water Res.* 16: 239-262.
- Chaklin, V. A. 1979. La lucha contra el cáncer continúa. Ed. Mir, Moscú, 111 p.
- Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E., Staiano, N., Giordano, G.G. y Pagano, G. 1986. Sublethal pH decrease may cause genetic damage to eukaryotic cell: a study on sea urchins and *Salmonella typhimurium*. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 6: 275-287.
- Cornet, M. 1992. Description d'une technique de culture de tissu de moule (*Mytilus edulis*) destinée a la préparation de chromosomes. *C.R.Acad.Sci.Paris* 315: 7-12.
- Courtney, L.E. y Couch, J.A. 1984. Usefulness of *Cyprinodon variegatus* and *Fundulus grandis* in carcinogenicity testing: advantages and special problems. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 65: 83-96.
- Dixon, D.R. 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originated from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.* 3: 155-163.
- Dixon, D.R. 1983. Sister chromatid exchange and mutagens in the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.* 14: 282-284.
- Dixon, D.R. y Clarke, K.R. 1982. Sister chromatid exchanges: a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Lett.* 3: 163-172.
- Dixon, D.R. y Flavell, N. 1986. A comparative study of the chromosomes of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 66: 219-228.
- Dixon, D.R., Jones, I.M. y Harrison, F.L. 1985. Cytogenetic evidence of inducible processes linked with metabolism of a xenobiotic chemical in adult and larval *Mytilus edulis*. *Sci. Total Environ.* 46: 1-8.
- Dixon, D.R., McFadzen, I.R.B. y Sisley, K. 1986. Heterochromatin marker regions (nucleolar organizers) in the chromosomes of the common mussel, *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda).

- J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 97: 205-212.
- Dixon, D.R., Moore, M.N. y Pipe, R.K. 1985. Environmentally induced embryonic abnormalities in the brood pouches of *Littorina saxatilis* from the region of Sullom Voe, Shetland; frequency, DNA levels and adult detoxication / toxication system. Mar. Environ. Res. 17: 284-293.
- Dixon, D.R. y Pollard, D. 1985. Embryo abnormalities in the periwinkle, *Littorina 'saxatilis'*, as indicators of stress in polluted marine environments. Mar. Pollut. Bull. 16: 29-33.
- Dolara, P., Caderni, G., Bianchini, F. y Tanganelli, E. 1986. Nuclear damage of colon epithelial cells by the food carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ) is modulated by dietary lipids. Mutat. Res. 175: 255-258.
- Egorov, V.N. y Kulebakina, L.G. 1988. Pattern of absorption of Mn, Zn, Co, and Hg by marine algae and suspended material. SJMBDN (The Soviet Journal of Marine Biology) 13: 183-236.
- Ellingham, T.J., Christensen, E.A. y Maddock, M.B. 1986. In vitro induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of the oyster toadfish and american eel. Environ. Mutagen. 8: 555-569.
- Ellis, L.L. y Bishop, S.H. 1984. Isolation of cell-lines from the California mussel *Mytilus californianus* Conrad. J. Shellfish. Res. 4: 87.
- Ellis, V.E. y Pattisina, L.A. 1990. Widespread neogastropod imposex: a biological indicator of global TBT contamination? Mar. Pollut. Bull. 21: 248-253.
- Elston, R.A., Kent, M.L. y Drum, A.S. 1988. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis* using whole cells and cell homogenate. Develop. Comp. Immunol. 12: 719-727.
- Evans, H.J., Neary, G.J. y Williamson, F.S. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. Int. J. Rad. Biol. 3: 216-229.
- Evtushenko, Z.S., Lukyanova, O.N. y Belcheva, N.N. 1990. Cadmium bioaccumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. Mar. Biol. 104: 247-250.

- Eyster, L.S. y Morse, M.P. 1984. Development of surf clam (*Spisula solidissima*) following exposure of gametes, embryos, and larvae to silver. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13:641-646.
- Farley, A.C. 1976. Proliferative disorders in bivalve mollusks. Mar. Fish. Rev. 38: 30-33.
- Flandre, O. 1971. Cell culture of mollusk. En: Vago, C. (Ed.) Invertebrate tissue culture. Academic Press, Nueva York, Vol. I, pp. 361-383.
- Flores-Báez, B.P. y Galindo-Bect, M.S. 1989. DDT in *Mytilus edulis*: Statistical considerations and inherent variability. Mar. Pollut. Bull. 20: 496-499.
- Foley, D.A. y Cheng, T.C. 1975. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. J. Inv. Phatol. 25: 189-197.
- Frierman, E.M. 1976. Occurrence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters (*Crassostrea virginica*). Mar. Fish. Rev. 38: 34-36.
- Fujiwara, A. y Yasumasu, I. 1974. Some observations of abnormal embryos induced by short-period treatment with chloramphenicol during early development of sea urchin. Develop. Growth Different. 16: 83-92.
- Galindo-Bect, M.S. y Flores-Báez, B.P. 1991. DDT in *Mytilus edulis*: Spatio-temporal variations in the Punta Banda Estuary, Baja California, México. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46: 179-184.
- García-Pámanes, L. 1990. El cultivo de mejillón en México y la problemática asociada a la actividad. Revista de Investigación Científica (UABCS) No. Especial I: 19-24.
- García-Pámanes, F. y García-Pámanes, L. 1987. Cultivo comercial del mejillón en Baja California (*Mytilus edulis*). Acuavisión II: 27-29.
- García-Pámanes, L. y Parés-Sierra, G. 1990. Experimentos con el cultivo de larvas del mejillón *Mytilus galloprovincialis* en altas densidades. En: Resúmenes del VIII Symposium Internacional de Biología Marina, Ensenada, B.C. p 49.
- Gardner, J.P.A. y Skibinski, D.O.F. 1990. Genotype-dependent

- fecundity and temporal variation of spawning in hybrid mussel (*Mytilus*) populations. *Mar. Biol.* 105: 153-162.
- Gartner-Kepkay, K.E., Dickie, L.M., Freeman, K.R. y Zouros, E, 1980. Genetic differences and environments of mussel populations in the maritime provinces. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 775-782.
- Gnezdilova, S.M., Lipina, I.G., Durkina, V.B., Burovina, I.V. y Ukhanov, K.Y. 1989. Content of cadmium in the gonad of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and its effect on gametes and offspring. *SJMBDN (The Soviet Journal of Marine Biology)* 14: 103-109.
- Goldberg, M.T. y Chidiac, P. 1986. An *in vivo* assay for small intestine genotoxicity. *Mutat. Res.* 164: 209-215.
- Goldberg, A.M. y Frazier, J.M. 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. *Sci. Am.* 261: 24-30.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Barvey, G., J.H. Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., y Gamble, E. 1978. The mussel watch. *Environ. Conserv.* 5: 101-125.
- Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1983. Chromosomal alterations induced by some chromium salts. *Cytologia* 48: 185-193.
- Gomot, L. 1977. Invertebrate organ culture media (other than insects). En: Rechcigi, M. Jr. (Ed.) *C.R.C. Handbook series in nutrition and food*. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 121-170.
- Gosling, E.M. y McGrath, D.M. 1990. Genetic variability in exposed shore mussels, *Mytilus* spp., along an environmental gradient. *Mar. Biol.* 104: 413-418.
- Grant, W.S. y Cherry, M.I. 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 90: 179-191.
- Guobaitis, R.J., Ellingham, T.J. y Maddock, M.B. 1986. The effects of pretreatment with cytochrome P-450 inducers and preincubation with a cytochrome P-450 effector on the mutagenicity of genotoxic carcinogens mediated by hepatic and renal S9 from two species of marine fish. *Mutat. Res.* 164: 59-70.

- Gutiérrez-Galindo, E.A. y Cajal-Medrano, R. 1981. PCB in mussels *Mytilus californianus* from the northern Baja California coast. *Ciencias Marinas* 7: 77-84.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., Flores-Báez, B.P., Sañudo-Wilhelmy, S.A. 1983a. Variación espacial y temporal de bifenilos policlorados (Aroclor 1254) en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad) de Baja California. Parte II. *Ciencias Marinas* 9: 19-25.
- Gutiérrez-Galindo, E.A. y Flores-Muñoz, G. 1986. Disponibilidad biológica de mercurio en las aguas de la costa norte de Baja California. *Ciencias Marinas* 12: 85-98.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., Flores-Muñoz, G. y López-Mendoza, J.A. 1984. DDT en el ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultivado en Bahía San Quintín, Baja California. *Ciencias Marinas* 10: 17-30.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., Sañudo-Wilhelmy, S.A. y Flores-Báez, B.P. 1983b. Variación espacial y temporal de pesticidas organoclorados en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad) de Baja California. Parte I. *Ciencias Marinas* 9: 7-18.
- Haderlie, E.C. y Abbott, D.P. 1980. Bivalvia: the clams and allies. En: Morris, R.H., D.P. Abbott y E.C. Haderlie (Eds.) *Intertidal invertebrates of California*. Stanford Univ. Press. Stanford, pp. 360-363.
- Harrison, F.L. y Jones, I.M. 1982. An *in vivo* sister chromatid exchange assay in the larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Response to 3 mutagens. *Mutat. Res.* 105: 235-242.
- Harshbarger, J.C. 1969. The registry of tumors in lower animals. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31: xi-xvi.
- Harshbarger, J.C. 1976. Descriptions of polyps and epidermal papillomas in three bivalve mollusk species. *Mar. Fish. Rev.* 38: 25-29.
- Harshbarger, J.C. 1977. Role of the registry of tumors in lower animals in the study of environmental carcinogenesis in aquatic animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 298: 280-289.
- Hartwick, E.B. 1976. Foraging strategy of the black oyster catcher (*Haematopus bachmani* Audubon). *Canad. J. Zool.* 54: 142-145.
- Heddle, J.A. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage.

- Mutat. Res. 18: 187-190.
- Hinegardner, R. 1974. Cellular DNA content of the Mollusca. Comp. Biochem. Physiol. 47A: 447-460.
- Högstedt, B. y Karlsson, A. 1985. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. Mutat. Res. 156: 229-232.
- Hooftman, R.N. 1981. The induction of chromosome aberrations in *Notobranchius rachowi* (Pisces: Cyprinodontidae) after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo(a)pyrene. Mutat. Res. 91: 347-352.
- Hooftman, R.N. y de Raat, W.K. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. Mutat. Res. 104: 147-152.
- Hose, J.E., Cross, J.N., Smith, S.G. y Diehl, D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. Mar. Environ. Res. 22: 167-176.
- Hughes, J.B. y Herbert, A.T. 1991. Erythrocyte micronuclei on winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and Long Island Sound. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 474-479.
- Ieyama, H. e Inaba, A. 1974. Chromosome numbers of ten species in four families of Pteriomorphia (Bivalvia). Venus 33: 129-137.
- Ishikawa, T., Masahito, P. y Takayama, S. 1984. Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair process in medaka exposed to carcinogens. Nat. Cancer Inst. Monogr. 65: 35-44.
- Jenssen, D. 1982. The induction of micronuclei. En: Sandberg, A.A. (Ed.) Sister chromatid exchange. Liss, New York, pp. 47-63.
- Jones, I.M. y Harrison, F.L. 1987. Variability in the frequency of sister-chromatid exchange in larvae of *Mytilus edulis*: implications for field monitoring. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 113: 283-288.
- Keen, M. 1971. Sea shells of tropical West America marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press,

Stanford.

- Kelly, J.J. y Maddock, M.B. 1985. *In vitro* induction of unscheduled DNA synthesis by genotoxic carcinogens in the hepatocytes of the oyster toadfish (*Opsanus tau*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14: 558-563.
- Kligerman, A.D. 1979. Induction of sister chromatid exchanges in the central mudminnow following *in vivo* exposure to mutagenic agents. Mutat. Res. 64: 205-217.
- Kligerman, A.D., Bishop, W.E. y Valentine, L.C. 1984. Use of the mudminnow, *Umbra* sp., in a *in vivo* sister chromatid exchange test. Nat. Cancer Inst. Monogr. 65: 111-118.
- Kligerman, A.D. y Bloom, S.E. 1976. Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbra limi*) after *in vivo* exposure to 5-Bromodeoxyuridine. Chromosoma (Berl.) 56: 101-109.
- Kligerman, A.D., Bloom, S.E. y Howell, W.M. 1975. *Umbra limi*: a model for the study of chromosome aberrations in fishes. Mutat. Res. 31: 225-233.
- Koehn, R.K. 1983. Biochemical Genetics and adaptation in molluscs. En: Wilbur, K.M. (Ed.) The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology. Academic Press, Nueva York, Vol. 2, pp. 305-330.
- Krishnaja, A.P. y Rege, M.S. 1982. Induction of chromosomal aberrations in fish *Boleophthalmus dussumieri* after exposure *in vivo* to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium. Mutat. Res. 102: 71-82.
- Kumazawa, N.H., Tanigawa, T., Tanaka, Y., Osatake, H. y Tanaka, K. 1990. Preliminary study on culture and morphology of hemocytes of two gastropod molluscs, *Clithon retropictus* and *Nerita albicilla*. Venus 49: 233-239.
- Kurelec, B., Chacko, M. y Gupta, R.C. 1988. Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Mar. Environ. Res. 24: 317-320.
- Kurelec, B., Matijasevic, Z., Rijavec, M., Alacevic, M., Britvic, S., Müller, W.E.G. y Zahn, R.K. 1979. Induction of benzo(a)pyrene monooxygenase in fish and *Salmonella* test as a tool for detecting mutagenic/carcinogenic xenobiotics in the

- aquatic environment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21: 799-807.
- Le Douarin, N. 1971. Organ culture technique in liquid medium. En: Vago, C. (Ed.) Invertebrate tissue culture. Academic Press, Nueva York, pp. 80-109.
- Legator, M.S. y Ward, J.B. 1984. Genetic toxicology-relevant studies with animals and humans. Progr. Clin. Biol. Res. 160: 491-525.
- Lobel, P.B., Belkhode, S.P., Jackson, S.E. y Longerich, H.P. 1990. Recent taxonomic discoveries concerning the mussel *Mytilus*: Implications for biomonitoring. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 508-512.
- Longwell, A.C. 1974. Genetics of the american oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. NOAA Technical Report 388: 75-87.
- Longwell, A.C., Stiles, S.S. y Smith, D.G. 1967. Chromosome complement of the American oyster *Crassostrea virginica*, as seen in meiotic and cleaving eggs. Can. J. Genet. Cytol. 9: 845-856.
- Lowe, D.M. y Moore, M.N. 1979. The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. Mar. Pollut. Bull. 10: 137-141.
- Lubet, P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gametes chez les Mytilidae et les Pectinidae. Revue Trav. Inst. (scient. tech.) Pêch. Marit. 23: 384-548.
- Lubet, P., Mannevy, M.A. y Mathieu, M. 1978. Analyse expérimentale en cultures d'organes, de l'action du DDT sur la gamétogenèse de la moule (*Mytilus edulis* L.), (Mollusque Lamellibranche). Bull. Soc. Zool. France 103: 283-288.
- Ma, T.H., Fang, T., Ho, J., Chen, D., Zhou, R., Lin, G., Dai, J. y Li, J. 1982. Extraordinary high micronucleus frequency induced by X-rays in a special clone of *Tradescantia reflexa*. Mutat. Res. 104: 101-103.
- Maddock, M.B., Northrup, H. y Ellingham, T.J. 1986. Induction of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in hematopoietic tissue of a marine fish following *in vivo* exposure to genotoxic carcinogens. Mutat. Res. 172:165-175.
- Madhyastha, M.S., Novacek, I., Ablett, R.F., Johnson, G., Nijjar, M.S. y Sims, D.E. 1991. *In vitro* study of domoic acid uptake

- by digestive gland tissue of blue mussel (*Mytilus edulis* L.).
Aquat. Toxicol. 20: 73-81.
- Majone, F., Beltrome, R. y Brunetti, R. 1988. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different stain techniques after treatment with zinc chloride. Mutat. Res. 209: 131-134.
- Majone, F., Brunetti, R., Gola, I. y Levis, A.G. 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* after treatment with mitomicin C. Mutat. Res. 191: 157-161.
- Márquez, B.C. y Licea, G. 1991. León 1: Un programa para la enseñanza y la investigación en Citogenética. En: Resúmenes del II Congreso Nacional de Genética, Saltillo, Coah., p 54.
- Martin, M., Crane, D., Lew, T. y Seto, W. 1980. Synthetic organic compounds in mussels *Mytilus californianus* and *Mytilus edulis*, along the California coast and selected harbours and bays. California Mussel Watch 1979-1980 Part II. Water Quality Monitoring Report 80: 1-49.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P. y Glickstein, N. 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar. Pollut. Bull. 12: 305-308.
- Martin, M., Stephenson, M.D., Smith, D.R., Gutiérrez-Galindo, E.A. y Flores-Muñoz, G. 1988. Use of silver in mussels as a tracer of domestic wastewater discharge. Mar. Pollut. Bull. 19: 512-520.
- Mason, J. 1976. Cultivation. En: Bayne, B.L. (Ed.) Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 386-410.
- Matter, B.E. y Schmid, W. 1971. Trenimon-induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammalian species, evaluated by micronucleus test. Mutat. Res. 12: 417-425.
- Maugh, T.H. 1978. Chemicals: how many are there? Science 199: 162.
- McDonald, J.H. y Koehn, R.K. 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific Coast of North America. Mar. Biol. 99: 111-118.
- McDonald, J.H., Seed, R. y Koehn, R.K. 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the

- northern and southern hemispheres. *Mar. Biol.* 111: 323-333.
- McMahon, G., Huber, L.J., Stegeman, J.J. y Wogan, G.N. 1988. Identification of a c-Ki-ras oncogene in a neoplasm isolated from winter flounder. *Mar. Environ. Res.* 24: 345-350.
- Means, J.C., Daniels, C.B. y Baski, S.M. 1988. Development of *in vivo* genotoxicity tests in estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Mar. Environ. Res.* 24: 327-331.
- Méndez, J., Pasantes, J.J. y Martínez-Expósito, M.J. 1990. Banding pattern of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) chromosomes induced by 2 X SSC/Giemsa-stain treatment. *Mar. Biol.* 106: 375-377.
- Menzel, R.W. 1968. Chromosome number in nine families of marine pelecypod mollusks. *Nautilus* 82: 45-50.
- Metcalf, C.D., Cairns, V.W. y Fitzsimons, J.D. 1988. Microinjection of rainbow trout at the sac-fry stage: a modified trout carcinogenesis assay. *Aquat. Toxicol.* 13: 347-355.
- Miller, R.W. 1978. The discovery of humans teratogens, carcinogens, and mutagens: Lessons for the future. En: Hollaender, A. y de Serres, F.J. (Eds.) *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection.* Plenum Press, New York, Vol. 5, pp. 101-126.
- Mix, M.C., Pribble, H.J., Riley, R.T. y Tomasovic, S.P. 1977. Neoplastic disease in bivalve mollusks from Oregon estuaries with emphasis on research on proliferative disorders in Yaquina Bay oysters. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 298: 356-373.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Livingstone, D.R. y Dixon, D.R. 1986. Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Wat. Sci. Technol.* 18: 223-232.
- Morse, M.P., Meyhefer, E. y Robinson, W.E. 1985. Accumulation of 109 Cadmium in extracellular granules in the kidney of the bivalve mollusk *Mercenaria mercenaria* (L.). *Mar. Environ. Res.* 17: 172-175.
- Moynihan, E.P. y Mahon, G.A.T. 1983. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture* 33:

- Müllerschön, H. y Miltenburger, H.G. 1986. Mutagenicity testing of waters of different origin. *Mutat. Res.* 164: 295.
- Neff, J.M., Boehm, P.D. y Haensly, W.E. 1985. Petroleum contamination and biochemical alteration in oyster (*Crassostrea gigas*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) from bays impacted by Amoco Cadiz crude oil spill. *Mar. Environ. Res.* 17: 281-283.
- Nestmann, E.R. 1986. A mutagen is a mutagen, no necessarily a carcinogen. En: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanism*. Basic Life Sciences, Plenum Press, Nueva York, Vol. 39, pp. 423-424.
- Nicolini, G. 1983. Chromatin structure: from nuclei to genes (review). *Anticancer Res.* 3: 63-86.
- Odense, R., Kamra, O.P., y Vandermeulen, J. 1984. Measurement of mutagenic potential in extracts of *Mytilus edulis* collected from polluted harbours using Ames test. *Genetics (Supplement)* 107: s79.
- Ostrander, G.K., Landolt, M.L. y Kocan, R.M. 1988. The ontogeny of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) behavior following embryonic exposure to benzofalpyrene. *Aquat. Toxicol.* 13: 325-346.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E. y Giordano, G.G. 1985a. pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. I. Exposure embryos. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 5: 101-112.
- Pagano, G., Cipollaro, M., Corsale, G., Esposito, A., Ragucci, E. y Giordano, G.G. 1985b. pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. II. Exposure of sperm. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 5:113-121.
- Paine, R.T. 1974. Intertidal community structure. Experimental studies on the relationships between a dominant competitor and its principal predator. *Oecologia* 15: 93-120.
- Paine, R.T. 1976. Size-limited predation: an observational and experimental approach with the *Mytilus -Pisaster* interaction. *Ecology* 57: 858-873.
- Parés, S.G. 1987. Biología del mejillón azul *Mytilus edulis*.

- Acuavisión II: 25-26.
- Parry, J.M., Tweats, D.J. y Al-Mossawi, M.A.J. 1976. Monitoring the marine environment for mutagens. *Nature* 264: 538-540.
- Parry, J.M., Parry, E.M., Kadhim, M., Somers, A. y Pour, M. 1985. The metabolism and genotoxicity of chemicals in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 17: 313-316.
- Pasantes, J., Martínez-Expósito M.J., Martínez-Lage, A. y Méndez J 1990. Chromosomes of Galician mussels. *J. Moll. Stud.* 56: 123-126.
- Pauley, G.S. 1969. A critical review of neoplasia and tumor-like lesions in mollusks. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31: 509-539.
- Pesch, G.G. y Pesch, C.E. 1980. *Neanthes arenaceodentata* (Polychaeta: Annelida), a proposed cytogenetic model for marine genetic toxicology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1225-1228.
- Perry, D.M., Weis, J.S. y Weis, P. 1988. Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 569-574.
- Phelps, H.L., Pearson, W.H. y Hardy, J.T. 1985. Clam burrowing behavior and mortality related to sediment copper. *Mar. Pollut. Bull.* 16: 309-313.
- Prein, A.E., Thie, G.M., Alink, G.M., Koeman, J.H. y Poels, C.L.M. 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Tot. Environ.* 9: 287-291.
- Reinisch, C.L., Miosky, D.L. y Smolowitz, R. 1988. The use of monoclonal antibodies in molluscan pathobiology. *Mar. Environ. Res.* 24: 354-355.
- Rodríguez-Romero, F., Laguarda-Figueras, A., Uribe-Alcocer, M. y Rojas-Lara. 1979. Distribution of "G" bands in the karyotype of *Crassostrea virginica*. *Venus* 38: 180-184.
- Saavedra-Alvarez, M.M. y Ellis, D.V. 1990. Widespread neogastropod imposex in the Northeast Pacific: implications for TBT. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 244-247.
- Samoiloff, M.R., Schulz, S., Jordan, Y., Denich, K. y Arnott, E. 1980. A rapid simple long-term toxicity assay for aquatic contaminants using the nematode *Panagrellus redivivus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1167-1174.

- Santos-Galindo, E. 1977. Index and register of seashells (with cross references). Porrúa Hermanos, México.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A. y Flegall, A.R. 1991. Trace elemental distributions in coastal waters along the US-Mexican boundary: relative contributions of natural processes vs. anthropogenic inputs. *Mar. Chem.* 33: 371-392.
- Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti, G. y Barale, R. 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 74-80.
- SEDUE/EPA 1991. Documento "Plan integral ambiental fronterizo México-EUA (primera etapa 1992-1994). Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, México.
- Seed, R. 1974. Morphological variations in *Mytilus* from Irish coasts in relation to the occurrence and distribution of *M. galloprovincialis* Lmk. *Cahier de Biologie Marine, Roscoff* 15: 1-25.
- Seed, R. 1976. Ecología. En: Bayne, B.L. (Ed.) *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 13-65.
- Shepard-Oldroyd, I. 1978. The marine shells of the West Coast of North America, I. Stanford University Press, Stanford, pp. 65-81.
- Shugart, L. 1988. An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.* 24: 321-325.
- Sinnhuber, R.O., Hendricks, J.D., Wales, J.H. y Putnam, G.B. 1977. Neoplasms in rainbow trout, a sensitive animal model for environmental carcinogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 298: 389-408.
- Skei, J.M., Saunders, M. y Price, N.B. 1976. Mercury in plankton from a polluted norwegian Fjord. *Mar. Pollut. Bull.* 7: 34-36.
- Skibinski, D.O.F. 1983. Natural selection in hybrid mussel populations. En: Oxford, G.S. y Rollison, D. (Eds.) *Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance*. Academic Press, Londres, pp. 283-298.
- Smolowitz, R. y Reinisch, C.L. 1988. Immunochemical detection of

- the origin of hematopoietic neoplasia in the soft shell clam.
Mar. Environ. Res. 24: 355.
- Soot-Ryen, T. 1955. A report on the family Mytilidae (Pelecypoda)
Allan Hancock Pacific Expeditions 20: 1-174.
- Stich, H.F., Acton, A.B., Oishi, K., Yamazaki, F., Harada, T.,
Hibino, T. y Mosser, H.G. 1977. Systematic collaborative
studies on neoplasms in marine animals as related to the
environment. Ann. N.Y. Acad. Sci. 298: 374-388.
- Stiles, S.S. y Choromanski, J. 1984. Rapid cytological examination
of bivalve larvae of commercial marine mollusks: potential
for genetic toxicology and aquatic bioassays. Genetics
(Supplement) 107: s103.
- Stiles, S. y Choromanski, J. 1987. A method for cytogenetic and
cytological examination of small shelled larvae of bivalves
and other zooplankton. Stain Technol. 62: 113-117.
- Suárez-Vidal, C.E. y Acosta-Ruiz, M.J. 1976a. Distribución de las
concentraciones de DDT en el mejillón *Mytilus californianus*
en la parte noroccidental de la Baja California. Ciencias
Marinas 3: 1-7.
- Suárez-Vidal, C.E. y Acosta-Ruiz, M.J. 1976b. Distribución de
cobre y zinc en el mejillón californiano *Mytilus*
californianus en la parte noroccidental de la Baja
California. Ciencias Marinas 3: 18-23.
- Swanson, A.B. 1981. Congenital limb defects. Classification and
treatment. Clin. Symp. Ciba 33: 3-32.
- Thiriot-Quevren, C. 1984a. Chromosome analysis of three species
of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). Mar. Biol. Lett. 5: 265-273
- Thiriot-Quevren, C. 1984b. Les caryotypes de quelques Ostreidae
et Mytilidae. Malacologia 25: 465-476.
- Thiriot-Quevren, C. y Ayraud, N. 1982. Les caryotypes de
quelques espèces de Bivalves et de Gasteropodes marins.
Mar. Biol. 70: 165-172.
- Therman, E. 1986. Human Chromosomes. Structure, behavior, effects.
Springer-Verlag, Nueva York, 313 p.
- Tice, R.R. 1984. An overview of occupational studies directed at
assessing genetic damage. Progr. Clin. Biol. Res. 160: 439-474.
- Tracey, M.L., Bellet, N.F. y Gravem, G.D. 1975. Excess allozyme

- homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.* 32: 303-311.
- Tripp, M.R., Bisignani, L.A. y Kenny, M.T. 1966. Oyster amoebocytes *in vitro*. *J. Invert. Pathol.* 6: 137-140.
- Turbiana, M. 1985. El cáncer. Fondo de Cultura Económica, México, 155 pp.
- Van Beneden, R.J., Watson, D.K., Chen, T.T., Lautenberger, J.A. y Papas, T.S. 1988. Teleost oncogenes: evolutionary comparison to other vertebrate oncogenes and possible roles in teleost neoplasms. *Mar. Environ. Res.* 24: 339-343.
- Van der Kerkhoff, J.F.J. y Van der Gaag, M.A. 1985. Some factors affecting optimal differential staining of sister-chromatids *in vivo* in the fish *Nothobranchius rachowi*. *Mutat. Res.* 143: 39-43.
- Varvio, S.-L., Koehn, R.K. y Väinölä, R. 1988. Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region. *Mar. Biol.* 98: 51-60.
- Verduzco, S.C., López, C. M. y Vandale, T.S. 1986. Principales características epidemiológicas de la mortalidad por cáncer en México. *Salud Pública Méx.* 28: 543-550.
- Vermeij, G.J. 1980. Biogeography and Adaptation. Patterns of marine life. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Vermeij, G.J. y Dudley, E.C. 1985. Distribution of adaptations: a comparison between the functional shell morphology of freshwater and marine pelecypods. En: Wilbur, K.M. (Ed.) *The Mollusca*. Vol. 10, Academic Press, Orlando, pp. 461-478.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S. y Orunesu, M. 1982. Effects of Cu^{2+} on nuclear RNA polymerase activities in the mussel digestive gland. *Mar. Biol. Lett.* 3: 345-352.
- Vigfusson, N.V., Vyse, E.R., Pernsteiner, C.A. y Dawson, R.J. 1983. *In vivo* induction of sister-chromatid exchange in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, diazinon and guthion. *Mutat. Res.* 118: 61-68.
- Villalobos-Pietrini, R., Flores-Márquez, A.R., Sánchez, M. y Gómez-Arroyo, S. 1990. Micronuclei induced in *Tradescantia* by arsenic. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 6: 75-78.
- Villalobos-Pietrini, R. y Gómez-Arroyo, S. 1983. Efectos

- cromosómicos inducidos por algunos compuestos de cromo. En: Memoria del octavo Congreso Nacional de Fitogenética (Uruapan, Mich. 1980), pp. 92-106.
- Wargovich, M.J., Goldberg, M.T., Newmark, H.L. y Bruce, W.R. 1983. Nuclear aberrations as a short-term test for genotoxicity to the colon: evaluation of nineteen agents in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 71: 133-137.
- Wasley, G.D. y May, J.W. 1970. *Animal cell culture methods.* Blackwell Sci. Pub., Oxford, 194 p.
- Weintraub, H. 1985. Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. *Cell* 42: 705-711.
- Weis, J.S. y Kim, K. 1988. Tributyltin is a teratogen in producing deformities in limbs of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 583-587.
- Yevich, P.P. y Barszcz, G.A. 1976. Gonadal and hematopoietic neoplasms in *Mya arenaria*. *Mar. Fish. Res.* 38: 42-43.
- Yonge, C.M. 1976. The mussel form and habitat. En: Bayne, B.L. (Ed.) *Marine mussels: their ecology and physiology.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-12.
- Zimmerer, E.J. 1984. Usefulness of the guppy, *Poecilia reticulata*, in carcinogenicity testing: special advantages and problems. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 65: 59-64.