



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Efecto del arsénico y el mercurio en el gusano de fuego *Eurythoe*
(Annelida: Amphinomidae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

Biól. Araceli Jaquelin Mercado Santiago

TUTORES PRINCIPALES:

DRA. MARÍA NURIA MÉNDEZ UBACH†
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

DR. CARLOS RENÉ GREEN RUIZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

DRA. BEATRIZ YÁÑEZ RIVERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE RICARDO RUELAS INZUNZA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MAZATLÁN
DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUETA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA, MAZATLÁN
DRA. MARÍA ANA VICTORIA TOVAR HERNÁNDEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MAZATLÁN, SINALOA, OCTUBRE 2023



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 esta 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.



**Efecto del arsénico y el mercurio en el gusano de fuego *Eurythoe*
(Annelida: Amphinomidae)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:

Biól. Araceli Jaquelin Mercado Santiago

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:

DRA. MARÍA NURIA MÉNDEZ UBACH†
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM
DR. CARLOS RENÉ GREEN RUIZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM
DRA. BEATRIZ YÁÑEZ RIVERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNIDAD ACADÉMICA
MAZATLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE RICARDO RUELAS INZUNZA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MAZATLÁN
DR. MARTÍN GABRIEL FRÍAS ESPERICUETA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA, MAZATLÁN
DRA. MARÍA ANA VICTORIA TOVAR HERNÁNDEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MAZATLÁN, SINALOA, 2023

In Memoriam

La Dra. Nuria Méndez, codirectora de esta tesis, me acompañó durante prácticamente todo el desarrollo de ésta, y me entristece que no alcanzó a ver su conclusión. Su acompañamiento fue constante, siempre estuvo disponible para aclarar dudas, discutir resultados y su emoción por lo que estábamos haciendo era tal que lograba transmitirla hasta en los momentos de frustración. Además, ayudó a que mi primer año en Mazatlán fuera grato, gracias a que era un placer convivir con ella, escuchar sus historias y compartir las risas. Durante el tiempo que convivimos pude darme cuenta de las virtudes que Nuri tenía como científica, mentora y amiga, por ello se llevó toda mi admiración y cariño. Aprecio todo el conocimiento y las experiencias que compartió durante este tiempo, también la confianza que depositó en mí, recordando su entusiasmo por la vida, por los *policuates*, y extrañando las porras que siempre me echaba para seguir adelante.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología y a al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de maestría y por el apoyo económico para participar en el VI Simposio Latinoamericano de Polychaeta en Puerto Varas, Chile.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Green Ruiz por las facilidades y la confianza otorgadas para realizar este proyecto. También por su guía y acompañamiento durante este tiempo.

A la Dra. Beatriz Yáñez Rivera por su apoyo y enseñanzas durante los experimentos, así como sus consejos para la redacción de esta tesis.

A los miembros del comité tutor: el Dr. Jorge Ruelas, la Dra. María Ana Tovar y el Dr. Martín Frías, cuyas observaciones y comentarios favorecieron el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Sergio Rendón y al Dr. José Salgado Barragán por su apoyo durante el muestreo realizado para los experimentos.

Al M. en C. Aarón García Bernal por su apoyo y paciencia para tomar las fotografías que se usaron en esta tesis.

Al Dr. Roberto Rivera por sus enseñanzas y apoyo en la preparación de las soluciones de arsénico y mercurio, así como en la medición de arsénico en solución en el Laboratorio de Geomicrobiología y Sedimentología del ICML-UAM, UNAM.

Al Dr. Jorge Ruelas Inzunza por prestar el equipo y las instalaciones en el Instituto Tecnológico de Mazatlán para la medición de mercurio y sus enseñanzas para el procesamiento de muestras. Al M. en C. Mauricio Ramos por su apoyo y enseñanzas durante la medición de mercurio en tejidos y solución.

Al Laboratorio de Investigación y Servicio en Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco por su servicio para la medición de arsénico en tejido.

Dedicatoria

A mis padres, Asunción y Arturo, quienes me han dado todo.

A Ana, quien es ejemplo de fuerza y valentía.

A Valentina, quien constantemente me enseña nuevas formas de disfrutar la vida.

A Aarón, compañero y equipo. Gracias por acompañarme en esta aventura.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	9
3. Justificación	11
4. Objetivos	12
5. Hipótesis	12
6. Metodología	13
6.1. Muestreo y aclimatación	13
6.2. Experimentos de regeneración	14
6.3. Soluciones con As	16
6.4. Soluciones con Hg	16
6.5. EPTs en solución	17
6.6. Determinación de As y Hg en <i>Eurythoe</i> sp. A	18
6.7. Análisis de datos	19
7. Resultados	19
7.1. Experimento con As	20
7.2. Experimento con Hg	36
7.3. As en solución y en tejido de <i>Eurythoe</i> sp. A	46
7.4. Hg en solución y en tejido de <i>Eurythoe</i> sp. A	51
8. Discusión	52
8.1. Alteraciones morfológicas y supervivencia	52
8.2. Fase 1: Formación del blastema, del prostomio y la yema posterior	55
8.3. Fase 2: Formación de segmentos	57
8.4. Fase 3: Crecimiento de los extremos regenerados	59
8.5. Conducta	59
8.6. As en <i>Eurythoe</i> sp. A	60
8.7. Hg en <i>Eurythoe</i> sp. A	62
9. Conclusiones	63
10. Literatura citada	65
Anexos	75

Índice de figuras

Figura 1. Morfología general de <i>Eurythoe</i> ..	7
Figura 2. Mapa de localización del sitio de muestreo.	13
Figura 3. Malformación de segmentos posteriores en <i>Eurythoe</i> sp. A por exposición a As.	20
Figura 4. Malformaciones observadas en <i>Eurythoe</i> sp. A durante el experimento con As.	21
Figura 5. Contracción muscular del fragmento anterior.	20
Figura 6. Fase 1 de la regeneración anterior de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.	24
Figura 7. Fase 1 de la regeneración anterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As.	25
Figura 8. Fase 2 de la regeneración anterior. Número de segmentos anteriores regenerados en <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.	26
Figura 9. Fase 2 de la regeneración anterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As durante el día 20 y el día 38.	26
Figura 10. Volumen en los segmentos anteriores regenerados de <i>Eurythoesp.</i> A durante la tercera fase de la exposición a diferentes concentraciones de As.	28
Figura 11. Fase 3 de la regeneración anterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As.	29
Figura 12. Fase 1 de la regeneración posterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As.	31
Figura 13. Fase 1 de la regeneración posterior. Contracción muscular del fragmento posterior.	31
Figura 14. Fase 2 de la regeneración posterior. Número de segmentos posteriores regenerados de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.	32
Figura 15. Volumen en los segmentos posteriores regenerados de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.	34
Figura 16. Fases 2 y 3 de la regeneración posterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As.	35
Figura 17. Malformaciones observadas en <i>Eurythoe</i> sp. A asociadas a la exposición a Hg.	37

Figura 18. Fase 1 de la regeneración anterior de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.	39
Figura 19. Fase 1 de la regeneración anterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.	39
Figura 20. Fase 2 de la regeneración anterior. Segmentos anteriores regenerados en <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.....	40
Figura 21. Fase 2 de la regeneración anterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.	41
Figura 22. Fase 1 de la regeneración posterior de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.....	40
Figura 23. Fase 2 de la regeneración posterior. Número de segmentos posteriores regenerados de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg. 44	44
Figura 24. Fase 2 de la regeneración posterior. Ejemplares de <i>Eurythoe</i> sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.	45
Figura 25. Concentraciones de As en las distintas soluciones durante 90 días.	47
Figura 26. Concentraciones de As en las soluciones control e intermedia durante 90 días.48	48
Figura 27. Concentración de As total en fragmentos regenerados y pre-existentes de <i>Eurythoe</i> sp. A.	49
Figura 28. Concentración de As en los fragmentos anteriores y posteriores (regenerados y pre- existentes) de <i>Eurythoe</i> sp. A.....	50
Figura 29. Concentración de Hg en los fragmentos anteriores y posteriores preexistentes de <i>Eurythoe</i> sp. A.	52

Índice de tablas

Tabla 1. Tasa de regeneración de segmentos anteriores (número de segmentos regenerados por día), en tres fragmentos de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.	27
Tabla 2. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la formación de segmentos anteriores de <i>Eurythoe</i> sp. A.	27
Tabla 3. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la fase de crecimiento de la región anterior regenerada de <i>Eurythoe</i> sp. A.	29
Tabla 4. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la formación de segmentos de la región posterior de <i>Eurythoe</i> sp. A.	33
Tabla 5. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en el crecimiento de segmentos de la región posterior regenerada de <i>Eurythoe</i> sp. A.	35
Tabla 6. Tasa de regeneración de segmentos anteriores (número de segmentos regenerados por día) en tres fragmentos de <i>Eurythoe</i> sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.	41
Tabla 7. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de Hg en la formación de segmentos anteriores de <i>Eurythoe</i> sp. A.	39
Tabla 8. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de Hg en la formación de segmentos anteriores de <i>Eurythoe</i> sp. A.	45

Resumen

Las especies de *Eurythoe* (Amphinomidae) han sido utilizadas en estudios sobre bioacumulación de elementos potencialmente tóxicos (EPTs). Sin embargo, se conoce poco de los efectos de elementos como el arsénico (As) y el mercurio (Hg) en procesos fisiológicos, como la regeneración en estos gusanos de fuego. Con el objetivo de evaluar el efecto de estos EPTs en la regeneración, se realizaron dos experimentos: uno de exposición a As y otro de exposición a Hg. Para cada uno de los experimentos se realizaron cortes en la parte media del cuerpo de 12 ejemplares de *Eurythoe* sp. A, que posteriormente fueron expuestos a 0, 50, 100 y 250 $\mu\text{g As/L}$ (concentraciones nominales), y a 0, 1, 5 y 10 $\mu\text{g Hg/L}$ (concentraciones nominales). Ambos experimentos se planearon para durar hasta el término del proceso (90 d). Se registró una supervivencia del 100% en los organismos expuestos a As y un 100% de mortalidad en los organismos expuestos a Hg. Se reconocieron tres fases del proceso de regeneración. La primera comprendió desde que se realizó el corte hasta la formación del prostomio (regeneración del extremo anterior) y del lóbulo anal (regeneración del extremo posterior), durante la cual no se observaron diferencias morfológicas en el desarrollo de estructuras de ambos extremos en los dos experimentos. La segunda fase comprendió a partir de la regeneración de un primer segmento hasta que dejaron de formar segmentos nuevos. La regeneración de segmentos anteriores fue más lenta en 100 y 250 $\mu\text{g As/L}$, así como en 1 y 5 $\mu\text{g Hg/L}$. La regeneración de segmentos posteriores tuvo variaciones en el transcurso del tiempo durante la exposición a As, y fue más lenta en el tratamiento de 1 $\mu\text{g Hg/L}$. La tercera fase consistió en el crecimiento de los extremos regenerados y comenzó a partir del día 50 hasta el término de los experimentos, 90 d para As y 77 d para Hg. Todos los organismos expuestos a As tuvieron un aumento de volumen mayor que los controles. En el transcurso de esta fase ocurrió la muerte de todos los organismos del experimento con Hg y no fue posible realizar comparaciones. En ambos experimentos se presentaron alteraciones morfológicas y cambios de conducta atribuibles a los EPTs. Al finalizar los experimentos, se midió la acumulación de As y Hg en los tejidos preexistentes y regenerados y se comprobó que la especie tiene una capacidad alta para acumularlos. Se concluye que la exposición a estos elementos altera el proceso de regeneración.

Abstract

Species of the genus *Eurythoe* (Amphinomidae) have been used in studies on bioaccumulation of potentially toxic elements (PTEs). However, little is known about the effects of elements such as arsenic (As) and mercury (Hg) on physiological processes in these fireworms, such as regeneration. In order to evaluate the effect of these PTEs on regeneration, two experiments were carried out: one focused on the exposure to As and another focused on the exposure to Hg. For each one of both experiments, 12 specimens of *Eurythoe* sp. A were cut in two fragments from the central portion of the body, and subsequently exposed to 0, 50, 100 and 250 $\mu\text{g As/L}$ (nominal concentrations), and 0, 1, 5 and 10 $\mu\text{g Hg/L}$ (nominal concentrations). Both experiments were planned to last until the end of the process (90 d). The survival recorded in organisms exposed to As was 100%, whereas 100% of mortality in organisms exposed to Hg was recorded. Three phases of the regeneration process were recognized. The first phase began from the moment the cut was made until the formation of the prostomium (regeneration of the anterior end) and the anal lobe (regeneration of the posterior end), during which no morphological differences were observed in the development of structures at both ends in the two experiments. The second phase comprised from the regeneration of a first segment until no new segments were formed. The regeneration of anterior segments was slower at 100 and 250 $\mu\text{g As/L}$, as well as at 1 and 5 $\mu\text{g Hg/L}$. The regeneration of posterior segments varied over time during As exposure and was slower in the 1 $\mu\text{g Hg/L}$ treatment. The third phase consisted of the growth of the regenerated ends and began from day 50 until the end of the experiments, 90 days for As and 77 days for Hg. All organisms exposed to As had a larger volume increase than controls. During this phase the death of all the organisms in the Hg experiment occurred and it was not possible to make comparisons. In both experiments, morphological alterations and behavioral changes attributable to PTEs were present. At the end of the experiments, the accumulation of As and Hg in the pre-existing and regenerated tissues was measured and it was proven that the species has a high capacity to accumulate them. It is concluded that the exposure to these elements alter the regeneration process.

1. Introducción

El arsénico (As) y el mercurio (Hg) se consideran elementos potencialmente tóxicos (EPTs), ya que son elementos que pueden causar problemas de salud en concentraciones relativamente bajas (Madrid, 2010; Pourret y Hursthouse, 2019). Estos elementos se encuentran normalmente en la naturaleza, pero se vuelven contaminantes cuando sus concentraciones sobrepasan las concentraciones naturales debido, principalmente, a las actividades humanas (Páez-Osuna, 2014). Los elementos químicos pueden clasificarse en esenciales y no esenciales. Los primeros son aquellos que son necesarios para diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos en un organismo. Algunos elementos esenciales son magnesio (Mn), estroncio (Sr), hierro (Fe), cobalto (Co), cobre (Cu) y zinc (Zn). Aunque son necesarios, también son potencialmente tóxicos si sus concentraciones son excesivas para el organismo (Chiarelli y Roccheri, 2014). Contrario a lo anterior, los elementos no esenciales son aquellos que no poseen alguna función conocida en el organismo. Entre los elementos no esenciales que son más peligrosos para el ambiente destacan el cadmio (Cd), plomo (Pb), Hg y As (Ali y Khan, 2019).

El origen primario de estos elementos es natural y son aportados al ambiente por procesos naturales como la meteorización de rocas que contienen dichos elementos o por actividad volcánica. Sin embargo, la movilización no natural y la consiguiente contaminación por EPTs en ambientes marinos es un problema que ha ido en aumento por actividades humanas como la industria petrolera, la producción de cemento, la agricultura y la minería (Chiarelli y Roccheri, 2014; Ali y Khan, 2019).

El As es un metaloide tóxico que es poco común encontrar como elemento libre en el ambiente, pero sus compuestos pueden ser encontrados en el aire, agua, suelo y tejidos vivos (Chiarelli y Roccheri, 2014). Es uno de los contaminantes más importantes a nivel mundial ya que es un cancerígeno bioacumulativo persistente (Kaur *et al.*, 2011). Las fuentes antropogénicas más importantes de este elemento son la fundición de minerales que contienen Cu, níquel (Ni), Pb y Zn y la quema de combustibles fósiles en hogares y centrales eléctricas (Páez-Osuna, 2014). Otras fuentes de contaminación por As son el uso de fungicidas, insecticidas, herbicidas, alguicidas, conservantes de madera y estimulantes de crecimiento de plantas y animales (Chiarelli y Roccheri, 2014). La contribución de las

actividades humanas en el aumento de As en mar abierto es baja, pero en zonas costeras es importante debido a que reciben el drenaje contaminado con este elemento desde el continente (Kalia y Khambholja, 2015).

El As ingresa al océano principalmente en formas inorgánicas, que son más tóxicas que las orgánicas, especialmente en el caso del As (III); sin embargo, la forma metilada, que es menos tóxica para los organismos, se encuentra en concentraciones bajas (Kalia y Khambholja, 2015). Las especies de arseniato, o As (V), son predominantes en condiciones aireadas y oxigenadas, como las aguas superficiales de la zona eufótica, mientras que el arsenito, o As (III), predomina en condiciones anóxicas (Chatterjee *et al.*, 2017). La metilación del arsénico por bacterias, fitoplancton y algas ocurre debido a que existen similitudes químicas entre el As (V) y el fosfato. Una baja concentración de fosfato en el ambiente facilita la absorción de As (V) por los organismos, que lo desechan en la columna de agua en su forma reducida: el As (III). También puede ser transferido a la red trófica, principalmente como arsenobetaina (Kalia y Khambholja, 2015). Por otro lado, el As que se precipita hacia los sedimentos es adsorbido por óxidos de hierro y/o manganeso, donde puede ser reducido a As (III) y ser liberado hacia la columna de agua (Kalia y Khambholja, 2015).

El Hg se puede encontrar de manera natural en el ambiente por actividad volcánica, aunque aproximadamente el 50% de las emisiones de este elemento son producto de actividades antropogénicas. Entre las principales actividades destacan la minería del oro, la industria plástica y de papel, la quema de combustibles fósiles, plantas termoeléctricas y la incineración de desechos médicos, municipales, y de lodos (Páez-Osuna, 2014). El Hg es liberado en su forma inorgánica como gas o directamente a los cuerpos de agua. Una parte se volatiliza y regresa a la atmósfera, pero la mayoría de este metal introducido en el mar costero se precipita debido a los productos de muy baja solubilidad de sus compuestos. También se acumula en el sedimento donde ocurre el proceso de metilación, derivado de la actividad microbiana (Páez-Osuna, 2014; Chiarelli y Roccheri, 2014). De esta forma, se produce metilmercurio, la especie química del mercurio más tóxica, que puede causar daño permanente al sistema nervioso central de algunos organismos. El metilmercurio se disuelve en la columna de agua y de esta forma se encuentra biodisponible para el fitoplancton y sus depredadores. Este se bioacumula y se biomagnifica a través de las cadenas alimentarias

marinas, lo que provoca concentraciones elevadas de este elemento, particularmente en organismos depredadores. De esta forma, el Hg implica un riesgo para la salud humana debido a que el consumo de productos marinos representa una vía de exposición importante a este tóxico (Chiarelli y Roccheri, 2014).

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), los límites máximos de exposición crónica a As y Hg permitidos para que no representen un riesgo significativo para la mayoría de la biota marina son de 36 $\mu\text{g As/L}$ y 0.9 $\mu\text{g Hg/L}$ (EPA, 2021). La Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021 establece un límite máximo permisible de 200 $\mu\text{g As/L}$ y de 10 $\mu\text{g Hg/L}$, para las descargas de aguas residuales en aguas costeras (Diario Oficial de la Federación, 2022). En aguas costeras del Pacífico mexicano se han detectado hasta 21.9 $\mu\text{g As/L}$ (Jonathan *et al.*, 2011) y valores por debajo de 10 $\mu\text{g Hg/L}$ (Pérez-Moreno *et al.*, 2016), excepto en el norte del Golfo de California, donde se han registrado concentraciones de hasta 10.2 $\mu\text{g Hg/L}$ (Páez-Osuna *et al.*, 2017).

Uno de los objetivos principales del monitoreo de las concentraciones de EPTs en un ecosistema es determinar el riesgo toxicológico que enfrenta la fauna marina, e incluso los humanos, por la ingesta de especies comestibles contaminadas (Chiarelli y Roccheri, 2014). Una forma de conocer el estado de un ecosistema es a través de los invertebrados marinos, ya que se ha comprobado que son buenos bioindicadores (Ahmed y Belal, 2019) y porque son consumidores intermedios en las cadenas tróficas (Chiarelli y Roccheri, 2014).

Entre los invertebrados más utilizados para los estudios ecotoxicológicos se encuentran los moluscos, crustáceos y poliquetos (Simonetti *et al.*, 2013; Komar *et al.*, 2017; Ahmed y Belal, 2019; Sujitha *et al.*, 2020). Particularmente, los poliquetos son un grupo eficiente para cumplir con este propósito debido a que, en términos de abundancia y riqueza específica, son un grupo dominante en los ambientes bentónicos y algunos permanecen casi inmóviles en el sedimento durante la etapa adulta. Esto último implica que es más común que estén sujetos a una exposición crónica a uno o varios EPTs. Otras características importantes para su estudio a este nivel son su tamaño pequeño, ciclos de vida relativamente cortos y es fácil mantenerlos en condiciones de laboratorio (Dean, 2008).

La morfología general de los poliquetos, particularmente la familia Amphinomidae Savigny *in* Lamarck, 1818, se divide en tres regiones (Fig. 1A): (i) la anterior, conformada por el prostomio (anterior a la boca) que contiene estructuras sensoriales como la carúncula, antenas, palpos y ojos (Fig 1B) y peristomio (rodea la boca); (ii) seguida por el tronco o metastomio, conformado por segmentos con parápodos con setas, branquias y cirros, y (iii) el extremo posterior, que contiene el ano y se denomina pigidio (Harris *et al.*, 2021). En la parte externa, la pared del cuerpo está cubierta por una cutícula compuesta por escleroproteínas y mucopolisacáridos. El revestimiento interno de la pared del cuerpo es el peritoneo, que también rodea el espacio celómico y cubre a los órganos internos (Brusca *et al.*, 2016).

Un rasgo característico de los poliquetos es el metamerismo; es decir, la repetición de estructuras corporales internas y externas que tienen el mismo origen genético y de desarrollo durante la ontogenia. Tienen un tubo digestivo completo (intestino) que cruza el cuerpo y se encuentra separado de la pared del cuerpo por un celoma espacioso. Además, cuentan con un vaso sanguíneo ventral y uno dorsal que transportan pigmentos respiratorios. En la parte exterior, la segmentación tiene apariencia de anillos, mientras en el interior existe una disposición en serie de compartimentos celómicos separados entre sí por septos (Fig. 1C) (Brusca *et al.*, 2016).

El poliqueto *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766), perteneciente a la familia Amphinomidae, es conocido como “gusano de fuego”, debido a la sensación de quemadura e inflamación en la piel que puede provocar al entrar en contacto con sus setas (Glasby *et al.*, 2000). La morfología de la especie corresponde a la descrita para el género *Eurythoe*. El cuerpo es alargado (Fig. 1A), deprimido, rectangular en corte transversal. El prostomio es redondeado y presenta cuatro ojos, una antena media corta y un par de antenas laterales (Fig. 1B). Las branquias están presentes desde el segundo setífero. La carúncula es alargada y se extiende hasta el tercer setífero, trilobulada, el borde medio liso cubre los bordes laterales. Los palpos son digitiformes y se encuentran sobre los labios (Yáñez-Rivera, 2015).

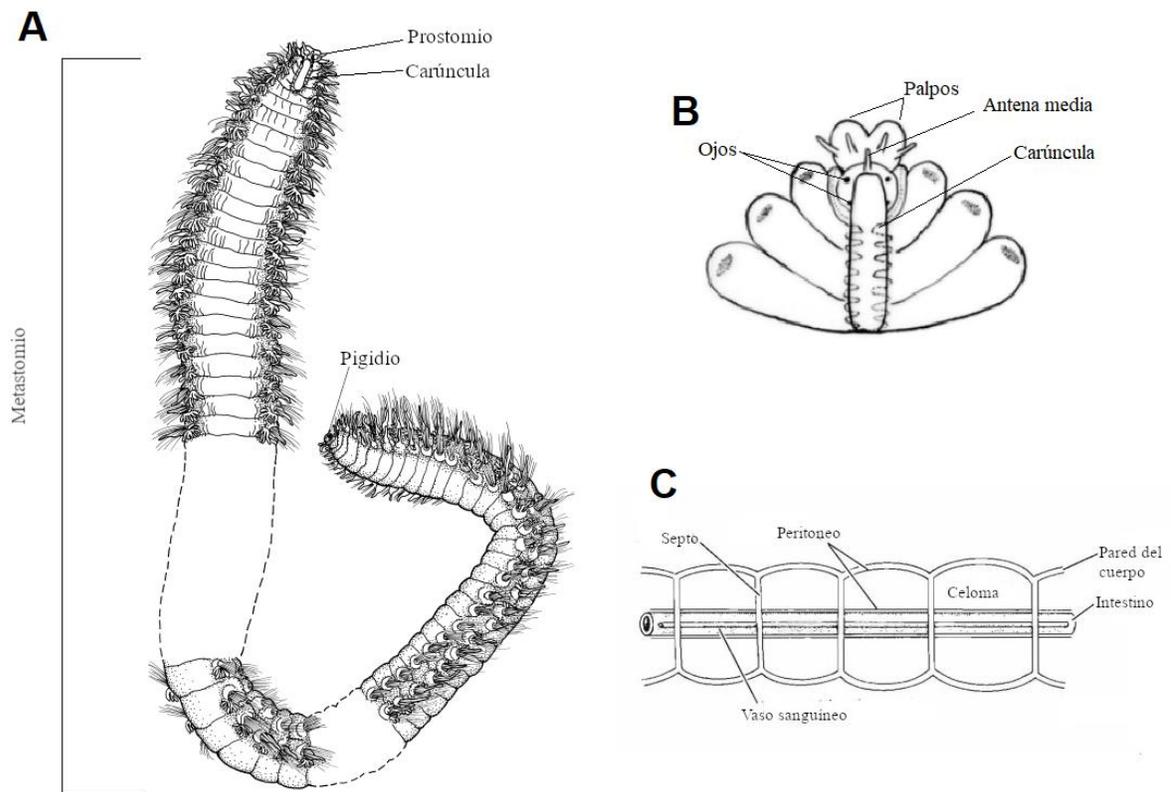


Figura 1. Morfología general de *Eurythoe*. A) Anatomía externa; B) Prostomio; C) Anatomía interna, vista dorsal. Tomado y modificado de: A) Glasby *et al.* (2000); B) Yáñez-Rivera (2009) y C) Brusca *et al.* (2016).

Los registros de esta especie indican una distribución circuntropical, en zonas intermareales rocosas y áreas submareales poco profundas (Fauchald, 1977). Existe poca información sobre la ecología de esta especie. Se sabe que son gregarios y se les encuentra debajo de rocas (Bindra, 1927).

Por medio de análisis moleculares y morfológicos se ha respaldado que *E. complanata* corresponde a un complejo de especies (Barroso *et al.*, 2010; Yáñez-Rivera, 2015). En México se han identificado al menos cuatro especies: *E. mexicana*, *E. complanata sensu stricto*, *Eurythoe* sp. A y *Eurythoe* sp. B. Las especies *E. complanata* y *Eurythoe* sp. A son morfológicamente indistinguibles; sin embargo, la divergencia genética es suficiente para sostener que se trata de especies diferentes. Una forma de distinguir entre ambas especies es por la distribución geográfica de ambas, ya que *E. complanata* se encuentra en el Atlántico

oeste, mientras *Eurythoe* sp. A se encuentra en el Pacífico este, incluso en Mazatlán (Yáñez-Rivera, 2015).

Antes de la caracterización del complejo de especies, se consideraba que la distribución amplia, se relacionaba con la larva pelágica de larga duración y a la combinación de reproducción sexual y asexual durante su ciclo de vida (Kudenov, 1974). Son organismos omnívoros (Engel *et al.*, 2023) de hábitos nocturnos o crepusculares (Fauchald y Jumars, 1979; Vázquez-Núñez *et al.*, 2007), con una percepción quimiosensorial que le permite detectar rápidamente cuando hay alimento disponible y evitar la presencia de luz (Pardo y Amaral, 2006).

La regeneración es la capacidad de los organismos de restaurar partes perdidas o dañadas (Müller *et al.*, 2003). Los anélidos son capaces de regenerar desde una parte del cuerpo hasta el cuerpo entero a partir de un fragmento. La regeneración de la parte posterior es más común que la de la parte anterior. Sin embargo, *E. complanata sensu lato* es capaz de regenerar ambas partes (Müller *et al.*, 2003), con una tasa de regeneración del extremo anterior mayor que la del extremo posterior (Kudenov, 1974), incluso después de un periodo de inanición (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014). La regeneración ocurre durante todo el año como respuesta a un evento de amputación provocado por un estímulo externo. Sin embargo, durante la temporada de otoño, este proceso es parte de la reproducción asexual por fragmentación, la cual se produce como un proceso endógeno (Kudenov, 1974; Bely, 2006; Yáñez-Rivera y Méndez, 2014).

En anélidos la regeneración puede ser epimórfica, que implica la regeneración de tejido nuevo a través de la formación de un blastema; es decir, proliferación celular derivada del cordón nervioso. Otra forma de regeneración común es por morfolaxis, donde no hay formación de blastema, pero las estructuras faltantes se reestablecen mediante la remodelación de los tejidos existentes (Özpolat y Bely, 2016). Durante la regeneración de la parte anterior de *E. complanata sensu lato* ocurre una invaginación (Weidhase *et al.*, 2016), donde posteriormente se forma el blastema y surgen el ganglio cerebral, los órganos sensoriales (Kudenov, 1974; Yáñez-Rivera y Méndez, 2014) y la musculatura (Weidhase *et al.*, 2016). Yáñez-Rivera y Méndez (2014) describieron tres etapas relevantes durante el

proceso de regeneración del extremo anterior: la formación del prostomio, la adición de segmentos nuevos y la etapa de crecimiento de las partes nuevas.

Los gusanos de fuego del género *Eurythoe* que se encuentran en Mazatlán están expuestos a diferentes ETPs. Las principales fuentes antropogénicas de los ETPs de esta zona provienen del procesamiento de pescado y camarón, sistemas de enfriamiento de plantas de energía, astillero de barcos y desechos domésticos (Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 1998). Por tal motivo, conocer los efectos de los ETPs en estos organismos puede aportar información relevante sobre la zona de Mazatlán.

2. Antecedentes

La regeneración en poliquetos se ha estudiado desde lo básico con morfología (Berke *et al.*, 2009; David y Williams, 2012; Pires *et al.*, 2012; Prentiss *et al.*, 2017), así como los mecanismos involucrados a nivel celular (Paulus y Müller, 2006; Planques *et al.*, 2019; Shalaeva y Kozin, 2023) y genético (Pfeifer *et al.*, 2012; Novikova *et al.*, 2013; Kozin y Kostyuchenko, 2015; de Jong y Seaver, 2016; Seaver y de Jong, 2021), principalmente en las familias Nereididae, Onuphidae y Capitellidae. Sin embargo, los trabajos en anfinómidos son escasos. En *Hermodice carunculata* del Golfo de México, se describió la formación del lóbulo anal que forma parte del pigidio (Ahrens *et al.*, 2014).

Particularmente sobre la regeneración de *Eurythoe* existen cuatro estudios. El primero corresponde a Kudenov (1974), quien caracterizó el ciclo de reproducción asexual (regeneración) de la especie. Müller *et al.* (2003) se enfocaron en la regeneración del sistema nervioso; mientras que, Weidhase *et al.* (2016) en el sistema muscular del extremo anterior. Yáñez-Rivera y Méndez (2014) describieron todo el proceso y analizaron la cantidad de lípidos y triglicéridos durante la regeneración de los extremos anterior y posterior de este gusano de fuego, con ejemplares procedentes de Mazatlán, Sinaloa. De acuerdo con sus resultados, los ejemplares fueron capaces de regenerar todos los fragmentos después de 50 días sin alimento, lo que sugiere que sus reservas de lípidos y triglicéridos son suficientes para sobrevivir a la falta de alimento por un periodo largo.

Por otro lado, poliquetos han sido previamente utilizados en estudios de toxicidad de EPTs. Entre las familias más estudiadas están Capitellidae, Dorvilleidae, Nereididae y Onuphidae (Reish y Gerlinger, 1997; Méndez y Green-Ruiz, 2005; Ferreira-Cravo *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2017). Los anfinómidos del género *Eurythoe* también ha sido objeto de estudios de los efectos de diferentes EPTs. Entre los más destacados, se puede nombrar el trabajo realizado por Reish *et al.* (1989), quienes estudiaron el efecto del Cd y dicloro difenil tricloroetano (DDT) en la supervivencia. Marcano *et al.*, (1996) estudiaron los mecanismos de desintoxicación de Cu y Zn. Méndez y Páez-Osuna (1998) analizaron la concentración de Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn en los tejidos de esta especie; de acuerdo con sus resultados, existe una correlación negativa entre la concentración de Cd, Ni, Pb y Zn y el tamaño de los organismos; es decir, en organismos de tamaño mayor, la concentración fue más baja. Posteriormente, Khan *et al.* (2017) encontraron efectos negativos en el crecimiento debido a la acumulación de Zn, Fe, Co y Mn.

También se han realizado estudios sobre la cicatrización y la respuesta inmunológica a la exposición a Cu en *E. complanata sensu lato* en Venezuela (Zapata-Vívenes *et al.*, 2005) y su respuesta inmunológica a diferentes contaminantes como lubricantes de motores de automóviles y Cd (Zapata-Vívenes *et al.*, 2018). Nusseti *et al.* (2001) analizaron los efectos de la exposición a Cu en biomarcadores de estrés oxidativo. Posteriormente se estudió la respuesta enzimática y la regeneración de tejido tras la exposición a aceite de automóviles (Nusseti *et al.*, 2005).

Los estudios de bioacumulación de Hg en *Eurythoe* y sus efectos son escasos. Vázquez-Núñez *et al.* (2007) comprobaron que estos anfinómidos tiene una capacidad alta para acumular Hg en sus tejidos, mientras que el proceso de eliminación es lento. En un trabajo paralelo, Méndez *et al.* (2009) sometieron a individuos de *E. complanata sensu lato* a soluciones con diferentes concentraciones de Hg y observaron diferentes grados de anormalidades morfológicas en los organismos de todos los tratamientos, así como la muerte de la totalidad de los organismos. El efecto del Hg en la regeneración de estos organismos no ha sido descrito.

Se han realizado diferentes estudios sobre bioacumulación de Hg y sus efectos en otras especies de poliquetos como *Hediste diversicolor* (Freitas *et al.*, 2017; Moltedo *et al.* 2019),

Perinereis gualpensis (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2017) y en especímenes recolectados en un sitio contaminado (Sola *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre los efectos del As en *E. complanata sensu lato*; sin embargo, diferentes estudios de bioacumulación de As en otras especies de poliquetos, como *Aphelochaeta marioni* (*Tharyx marioni* en Gibbs *et al.*, 1983), *Sabella spallanzanii* (Fattorini y Regoli, 2004), *Arenicola marina* (Geiszinger *et al.*, 2002a; Casado-Martínez *et al.*, 2012), *Nereis diversicolor* y *Nereis virens* (Geiszinger *et al.*, 2002b; Rainbow *et al.*, 2011), han revelado que estos organismos son capaces de acumular este elemento en sus tejidos sin presentar anormalidades morfológicas ni mortalidad. Ventura-Lima *et al.* (2007) evaluaron la respuesta toxicológica de *Laeonereis acuta* expuesto a dos concentraciones de As. Por otro lado, Coppola *et al.* (2016) describieron los efectos fisiológicos y bioquímicos de As en la regeneración de *Diopatra neapolitana* mediante la cuantificación de proteínas, glucógeno y biomarcadores.

Existe un estudio sobre el comportamiento en *Eurythoe complanata sensu lato* realizado por Pardo y Amaral (2006) en el que evaluaron el movimiento y la velocidad de captura e ingesta de alimento, así como la reacción de los organismos a la luz.

3. Justificación

Debido a su capacidad de regenerar ambos extremos del cuerpo y de bioacumular diferentes EPTs, *Eurythoe* parece ser un modelo excelente para estudios de regeneración y para conocer los efectos que algunos contaminantes pueden tener en este proceso.

El conocimiento del efecto de los EPTs en un proceso fundamental para la supervivencia y mantenimiento de las poblaciones de *Eurythoe* y la descripción de su regeneración brindará información importante, no solo en la zona costera de Sinaloa, sino en cualquier región del mundo donde habite esta especie y esté expuesta a EPTs.

4. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el efecto del arsénico y mercurio por separado sobre el proceso de regeneración y posibles malformaciones de *Eurythoe*, así como cambios en su conducta.

Objetivos específicos:

1. Determinar si es posible la regeneración de la parte anterior y posterior de *Eurythoe* durante de la exposición a diferentes concentraciones cercanas a los límites permisibles de Hg y As.
2. Observar si existe un efecto tóxico del As y el Hg durante la regeneración del extremo anterior y posterior mediante la presencia de alteraciones morfológicas y de conducta.
3. Cuantificar si la exposición al As y Hg en el proceso de regeneración afectan las tasas de incorporación de segmentos y crecimiento.
4. Estimar las variaciones en la absorción de As y Hg en las diferentes etapas del proceso de regeneración.

5. Hipótesis

Dada la toxicidad del As y el Hg, así como la capacidad de *Eurythoe* de acumularlos, se espera que la exposición de los organismos a estos EPTs por separado provoque daños o retrasos en la regeneración, malformaciones, cambios conductuales e incluso mortalidad, relacionados con la concentración.

6. Metodología

6.1. Muestreo y aclimatación

Se realizó un muestreo el 1 de febrero de 2022 en la playa rocosa de Cerritos, Mazatlán, Sinaloa ($23^{\circ} 18' 30''$ N, $106^{\circ} 29' 22''$ W) (Fig. 2). La localidad alberga una población grande de la especie, de donde se obtuvieron más de 50 ejemplares de *Eurythoe*. Los cuales fueron recolectados manualmente entre la arena y rocas cubiertas con macroalgas, principalmente rodofitas del género *Hypnea* y *Gracilaria*. Los gusanos, arena y rocas con algas fueron transportados en cubetas con aireación al Laboratorio de Invertebrados Bentónicos II del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, UNAM.



Figura 2. Mapa de localización del sitio de muestreo.

Para la aclimatación de los organismos recolectados, se siguió la metodología utilizada por Yáñez-Rivera y Méndez (2014). Se instalaron en peceras de 18 x 28.5 x 17 cm, con 20 L

de agua de mar filtrada (36 UPS) con filtros mecánicos de 10, 5 y 1 μm , radiación U.V. ($60000 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$) y un ultrafiltrador de 0.2 μm . En cada acuario se colocó una cama de 5 cm de arena y rocas con algas provenientes de la localidad de muestreo. El agua se mantuvo a una temperatura de 24 °C, para simular las condiciones naturales y se mantuvo una aireación constante mediante el uso de bombas de aire (Elite 799). Adicionalmente, se cubrió la parte superior de las peceras con plástico para evitar la posible evaporación de agua y los cambios de salinidad que esto conlleva.

Los ejemplares recolectados corresponden a lo descrito por Yáñez-Rivera (2015) para la especie caracterizada como *Eurythoe* sp. A con análisis moleculares, por lo que fueron identificados como tal. Ya que la especie de *E. complanata sensu stricto*, se distribuye en el Atlántico y el otro taxón del género que se distribuye en el Golfo de California presenta unas setas modificadas que no se observaron en ninguno de los especímenes utilizados. Por ello, se confirmó que los ejemplares utilizados para los experimentos corresponden a *Eurythoe* sp. A, descrita por Yáñez-Rivera (2015).

Los organismos que fueron sometidos a los EPTs se seleccionaron por tallas similares y se descartaron todos los que presentaron alguna cicatriz o proceso de regeneración. En ambos experimentos (exposición a As y exposición a Hg) se incluyeron, en total, 12 organismos: tres individuos por concentración (un control y tres tratamientos). Una vez instalados los experimentos, los organismos no utilizados fueron regresados a su hábitat natural.

El periodo de aclimatación entre experimentos fue diferente debido a limitaciones operativas del laboratorio. Para los ejemplares del experimento con As duró 14 días (d), mientras los organismos utilizados para el experimento con Hg tuvieron un periodo de aclimatación de 21 d. Durante este tiempo se complementó la alimentación con hojuelas para peces de acuario de la marca Wardley cada tercer día hasta un día antes de iniciar los experimentos. También se hizo un recambio de agua cada siete días.

6.2. Experimentos de regeneración

Previo al periodo de exposición, se realizaron cortes (con tijera común, previamente esterilizada con alcohol al 70%) en la parte media de los ejemplares para la observación de

la regeneración anterior y posterior. Se procuró que el corte fuera en ángulo recto con respecto al cuerpo de los organismos para que el proceso de cicatrización y regeneración fuera lo más homogéneo posible. Los dos fragmentos preexistentes de un mismo individuo (extremos anterior y posterior) se mantuvieron juntos en un recipiente de plástico perforado de 250 ml y cada uno se cubrió con una red de malla de 0.5 mm para permitir la circulación del agua y evitar que se escapara el gusano. Los tres frascos se colocaron en acuarios de 3.68 L de capacidad, con 2 L de solución con las concentraciones experimentales. Por lo tanto, se analizaron 3 individuos fragmentados por tratamiento, así como en una solución control (agua de mar filtrada); desde el corte hasta la regeneración total de ambos extremos del cuerpo, aproximadamente 90d (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014). Con el fin de evitar la evaporación, la parte superior de los acuarios fue cubierta con una capa de plástico. Los acuarios se colocaron en un cuarto con temperatura controlada (24 °C) y aireación constante por medio de bombas de aire.

Los organismos se mantuvieron sin alimento durante 50d para mantener igualdad de condiciones entre ambos extremos del gusano. De acuerdo con el estudio realizado por Yáñez-Rivera y Méndez (2014), estos organismos son capaces de resistir periodos largos de inanición y, debido a que para el día 50 ambos extremos de los fragmentos han sido regenerados completamente, ya son capaces de alimentarse. Por lo tanto, una vez transcurridos los 50d, se les dio aproximadamente 0.150 g de hojuelas de pescado en cada frasco cada siete días.

Se realizaron observaciones periódicas para observar posibles alteraciones en las diferentes etapas de regeneración, así como malformaciones y cambios conductuales, comparándolos con los organismos del grupo control. Se anotaron los días en que las estructuras del prostomio y del pigidio comenzaron a ser visibles bajo el microscopio estereoscópico y el número de segmentos formados, con una periodicidad de dos días. Se consideró un segmento nuevo una vez que ya contaba con las setas formadas. Cada siete días, a partir del día 50 y hasta el final de los experimentos, se tomaron las medidas del ancho y la longitud total de los extremos regenerados para calcular cambios en el volumen de los extremos nuevos del cuerpo. Se realizó un registro fotográfico con una cámara Canon EOS

REBEL XSI, adaptada a un microscopio estereoscópico Leica S6 E desde el inicio hasta el último día de los experimentos.

A partir del día 50 se calculó el volumen cada semana mediante la siguiente fórmula modificada de Méndez *et al.* (2000):

$$V = \frac{\pi r^2 h}{2}$$

Donde, r (el radio) corresponde a la mitad del ancho del segmento, h es lo largo de los segmentos regenerados y la división entre dos se relaciona con la forma de medio cilindro de los organismos.

Para evaluar la conducta se observó si se mantenía la sensibilidad a la luz, la expulsión de setas, cambios en el movimiento (letargo o no) o si ocurrían cambios en los patrones de alimentación. Estos resultados se presentan de manera descriptiva.

6.3. Soluciones con As

Se utilizaron concentraciones de As que coinciden con los límites establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-2021 en las descargas de aguas residuales en zonas marinas que corresponde a un promedio mensual de 200 µg As/L. Se prepararon disoluciones nominales de 50, 100 y 250 µg As/L a partir de una solución de 1×10^7 µg /L de As (III) con agua de mar filtrada. Estas concentraciones son similares a las utilizadas por Coppola *et al.* (2016) para experimentos con *Diopatra neapolitana*, lo cual también permite comparaciones entre las respuestas de ambas especies a las mismas concentraciones.

6.4. Soluciones con Hg

Para la preparación de soluciones de Hg, se escogieron concentraciones previamente conocidas como subletales de acuerdo con Vázquez-Núñez *et al.* (2007). Se prepararon soluciones nominales de 1, 5 y 10 µg Hg/L a partir de una solución de 1×10^6 µg/L de óxido de mercurio con agua de mar filtrada. Estas concentraciones coinciden con los límites

establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-2021 en las descargas de aguas residuales en zonas marinas que corresponde a un promedio mensual de 10 µg Hg/L.

Debido a que los organismos se encontraban en un sistema cerrado en ambos experimentos, se realizaron recambios de agua con las concentraciones establecidas y del grupo control cada 14 días durante la totalidad de ambos experimentos. Esto se realizó con el fin de mantener las concentraciones de ambos EPTs constantes, ya que el Hg en solución puede disminuir por debajo del límite de detección después de este tiempo (Vázquez-Núñez *et al.*, 2007) y para evitar la contaminación del medio por productos de desecho (Nusetti *et al.*, 2005; Zapata-Vívenes *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2022) que pudiera interferir con los experimentos.

6.5. EPTs en solución

Adicionalmente a los acuarios con los fragmentos de los gusanos expuestos a As y Hg, en ambos experimentos se prepararon acuarios exactamente iguales, pero sin organismos. Para este experimento se eligieron las soluciones control (agua de mar filtrada) y las soluciones nominales de 100 µg As/L y 5 µg Hg/L. Esto se realizó con el fin de evaluar la concentración de ambos elementos en solución en presencia y ausencia de organismos y así estimar, de manera indirecta, la posible absorción de As y Hg en los organismos mediante la comparación con los controles.

Se tomaron muestras de 10 ml de cada una de las soluciones, incluidos los grupos control de ambos experimentos, cada siete días a partir del día inicial, hasta el día 28. Posteriormente se tomaron muestras de la misma cantidad cada 14 días para monitorear las concentraciones de los EPTs en solución. Estas muestras se acidificaron con HNO₃ a un pH <2, fueron almacenadas en botellas de polietileno de alta densidad de 50 ml y fueron refrigeradas para posteriormente realizar mediciones analíticas de la concentración de As y Hg. La determinación de As en agua se hizo mediante espectroscopía de fluorescencia atómica (PSA 10.055 Millennium Excalibur) en el Laboratorio de Geomicrobiología y Sedimentología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, UNAM. La

determinación de Hg en solución se hizo con un analizador de mercurio de vapor frío (Buck Scientific 410) en el Instituto Tecnológico de Mazatlán.

6.6. Determinación de As y Hg en *Eurythoe* sp. A.

La determinación de As en los ejemplares de *Eurythoe* sp. A se realizó en el Laboratorio de Investigación y Servicio en Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco (CINVESTAV).

Previo a los análisis, se realizaron cortes a los ejemplares para separar los segmentos regenerados de los preexistentes y determinar las concentraciones de As por separado. Las tres réplicas de cada tratamiento se mezclaron y se hizo doble medición. Las muestras fueron congeladas para los análisis correspondientes.

Las muestras fueron pesadas (~1 g de peso seco), homogenizadas y pre-tratadas con irradiación de microondas en el equipo Ethos One de Milestone previo a la cuantificación de As total. Este procedimiento de digestión es fundamental para la preparación de muestras para el análisis elemental, las cuales deben estar en estado líquido y con un mínimo de materia orgánica. La radiación de microondas produce un calentamiento en la muestra con una mezcla de ácido/oxidante en vasos de teflón cerrados, con una temperatura de 150 °C. Al finalizar el ciclo de digestión, la muestra quedó líquida, transparente, sin sólidos aparentes y con un mínimo de color para asegurar una correcta digestión de la muestra.

La determinación de As en tejido se llevó a cabo por espectrometría de masas acoplado inductivamente (ICP-MS) con el equipo NexION 300D de la marca Perkin Elmer.

La determinación de Hg en los ejemplares de *Eurythoe* sp. A se realizó en el Instituto Tecnológico de Mazatlán. Para este procedimiento no se pudo realizar el mismo corte que los ejemplares del experimento con As debido a que el tamaño del tejido regenerado no era suficiente. Por lo que los resultados obtenidos son del tejido preexistente de todos los tratamientos. Las muestras se pesaron y fueron pre-digeridas con 5ml HNO₃ durante 24 h en recipientes de digestión (Savillex). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en una

parrilla Thermo Scientific a 120 °C durante tres horas. Las muestras fueron aforadas a 25 g y la determinación de Hg se realizó con un analizador de mercurio de vapor frío (Buck Scientific 410). En este caso sólo se pudo realizar duplicado de las muestras del 10 µg Hg/L y no se obtuvieron diferencias.

6.7. Análisis de datos

Para todas las respuestas analizadas estadísticamente (formación de segmentos y crecimiento) se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Debido a que no cumplieron con normalidad, las comparaciones de las medias se realizaron mediante Modelos Lineales Generalizados, conocidos como GLMs (por sus siglas en inglés), debido a que las respuestas fueron heterocedásticas. Con los GLMs se contrastó si los modelos que incorporan la variable del tratamiento con As o Hg son significativamente diferentes del modelo que no lo incorpora o modelo nulo (Zuur *et al.*, 2009). También se realizaron pruebas de la suma de rangos de Wilcoxon con los promedios por día para comparar entre concentraciones. Los análisis se realizaron con el programa RStudio 4.2.1.

7. Resultados

La exposición al As y Hg durante el proceso de regeneración de *Eurythoe* sp. A mantiene las tres fases características:

- Fase 1: Cicatrización en ambos extremos: la formación del prostomio, en el caso de la regeneración anterior; y de la yema posterior en el caso de la regeneración posterior.
- Fase 2: Formación de segmentos nuevos: inicia a partir de la formación del primer segmento en ambos extremos y hasta que dejaron de formar segmentos nuevos.

- Fase 3: Crecimiento: en la que se observa el aumento de volumen de los organismos y comprendió desde que los organismos comenzaron a recibir alimento (día 50) hasta el final del experimento (día 90) o; hasta que los organismos murieron.

Debido a que cada fase y EPT tienen aspectos característicos, la información obtenida se presentará por separado; es decir, por experimento y por fase.

7.1. Experimento con As

7.1.1. Alteraciones morfológicas y supervivencia

Se presentó una posible alteración generalizada por la exposición al As, ya que el 66.6% de los ejemplares con regeneración posterior expuestos a 50 μg As/L mostraron una interrupción en la segmentación externa en la parte media de siete segmentos que podría estar asociada a un crecimiento anormal en el centro de los músculos longitudinal y transversal dorsal (Fig. 3A). Esto fue más notorio al ocurrir una pigmentación en la zona provocada por el flujo sanguíneo que se veía ramificado, en lugar de ser continuo (Fig. 3B y C).

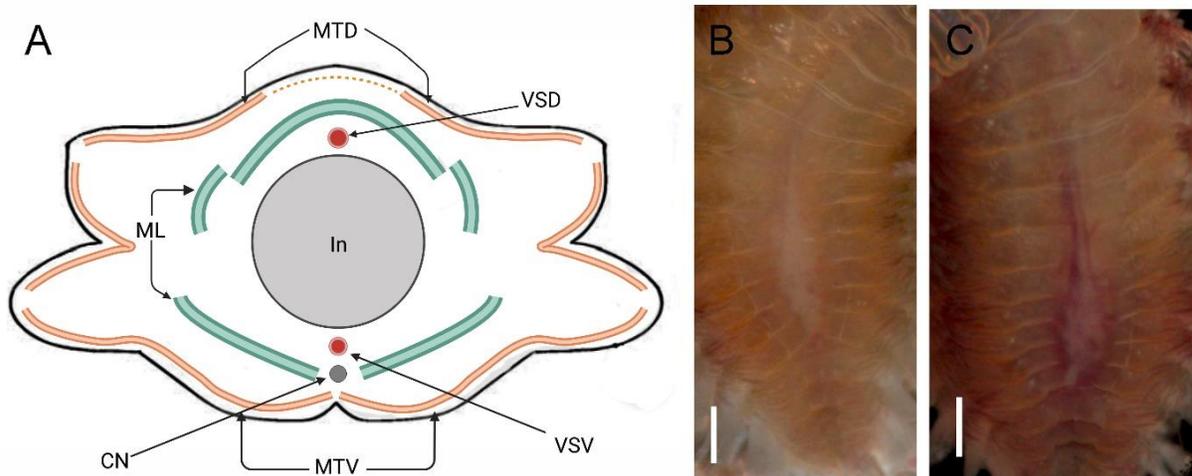


Figura 3. Malformación de segmentos posteriores en *Eurythoe* sp. A) Esquema de la musculatura en *Eurythoe*, B) Extremo posterior regenerado expuesto a 50 μg As/L sin pigmentación, C) Mismo ejemplar con pigmentación debido a la presencia de flujo sanguíneo. CN = cordón neural, In = intestino, ML = músculo longitudinal, MTD = músculo transversal dorsal, MTV = músculo transversal ventral, VSD = vaso sanguíneo dorsal, VSV = vaso sanguíneo ventral. Las barras de escala en B y C equivalen a 1 mm A) Modificado de Weidhase *et al.* (2016).

Además, se presentaron alteraciones que no fueron asociadas a la exposición al As. Únicamente un fragmento con regeneración anterior expuesto a 50 $\mu\text{g As/L}$ presentó un desarrollo de los parápodos totalmente asimétrico (sin parápodos del lado derecho) que no permitió las observaciones necesarias durante las tres fases (Fig. 4B), por lo que no fue considerado en los análisis estadísticos. Esta observación no puede asociarse exclusivamente a la exposición al As, ya que un fragmento del grupo control presentó una carúncula con desarrollo anormal (dos veces más ancha de lo normal) (Fig. 4A), tuvo una fragmentación espontánea a partir del tercer segmento preexistente el día 57 y sobrevivió sólo hasta el día 69.

No se registraron cambios en la supervivencia de los organismos en todos los tratamientos antes del día 54, debido a la mortalidad de los dos fragmentos de un gusano del grupo control. Cabe destacar que la regeneración de este gusano fue completa, ya contaba con el pigidio y prostomio completamente formados (fase 1 y fase 2), pero no fue posible registrar cambios en el volumen de éstos, por lo que tampoco se incluyeron en los análisis estadísticos de acuerdo con los criterios para validar bioensayos de exposición con anélidos ($\geq 20\%$ mortalidad en control) (ASTM, 2022).

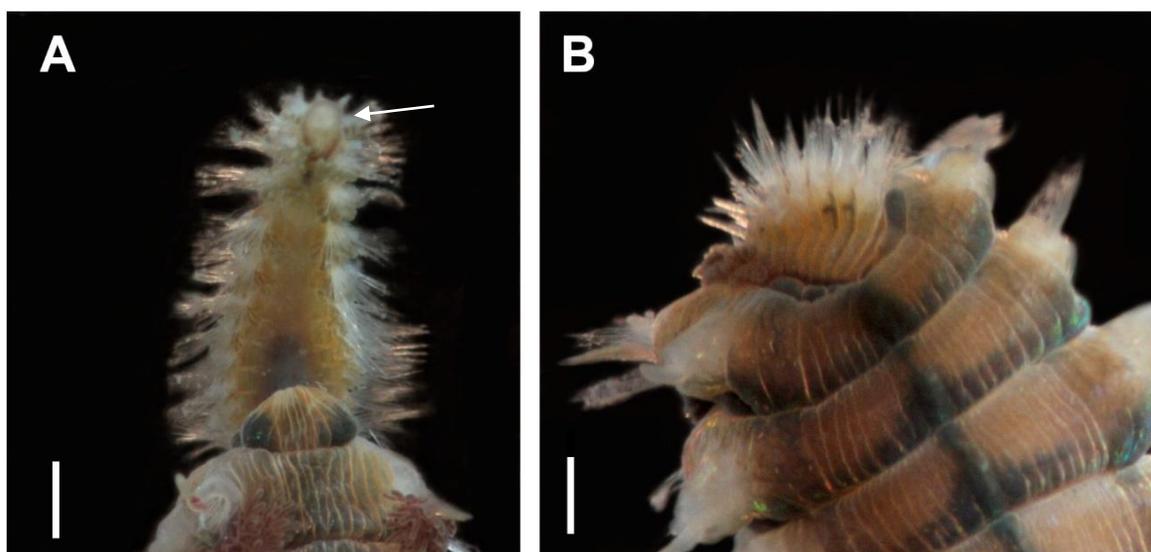


Figura 4. Malformaciones observadas en *Eurythoe* sp. A durante el experimento. A) Ejemplar del grupo control con la carúncula más grande. B) Vista ventral del ejemplar expuesto a 50 $\mu\text{g As/L}$ con regeneración asimétrica en la que únicamente se desarrollaron parados de un solo lado. Escala 1 mm.

7.1.2. Extremo posterior preexistente con regeneración anterior

7.1.2.1. Fase 1: Cicatrización y formación del prostomio

Durante el experimento con As, inmediatamente después de realizar el corte, el 75% de los fragmentos posteriores contrajeron la musculatura de los segmentos adyacentes a la herida para evitar la pérdida de contenido celómico (Fig. 5A). Debido a esta reacción, los parápodos más cercanos al corte cambiaron su posición de lateral a antero-dorsal. Un fragmento del grupo control presentó una evaginación del tejido que mantiene el celoma dentro (peritoneo) (Fig. 5B) que fue capaz de retraer por completo hasta el sexto día, por lo que el inicio del proceso de regeneración se retrasó. Un fragmento expuesto a 50 μg As/L y otro expuesto a 100 μg As/L tuvieron una evaginación del tubo digestivo (Fig. 5C). En el primer caso, no fue posible observar la primera fase ni el comienzo de la segunda debido a que la proyección del intestino que se encontraba expuesto impidió realizar observaciones hasta que el ejemplar contó con cinco segmentos formados. El fragmento expuesto a 100 μg As/L logró retraer el intestino hasta el día 13, tras el cual comenzó con la formación de las estructuras de la primera fase.

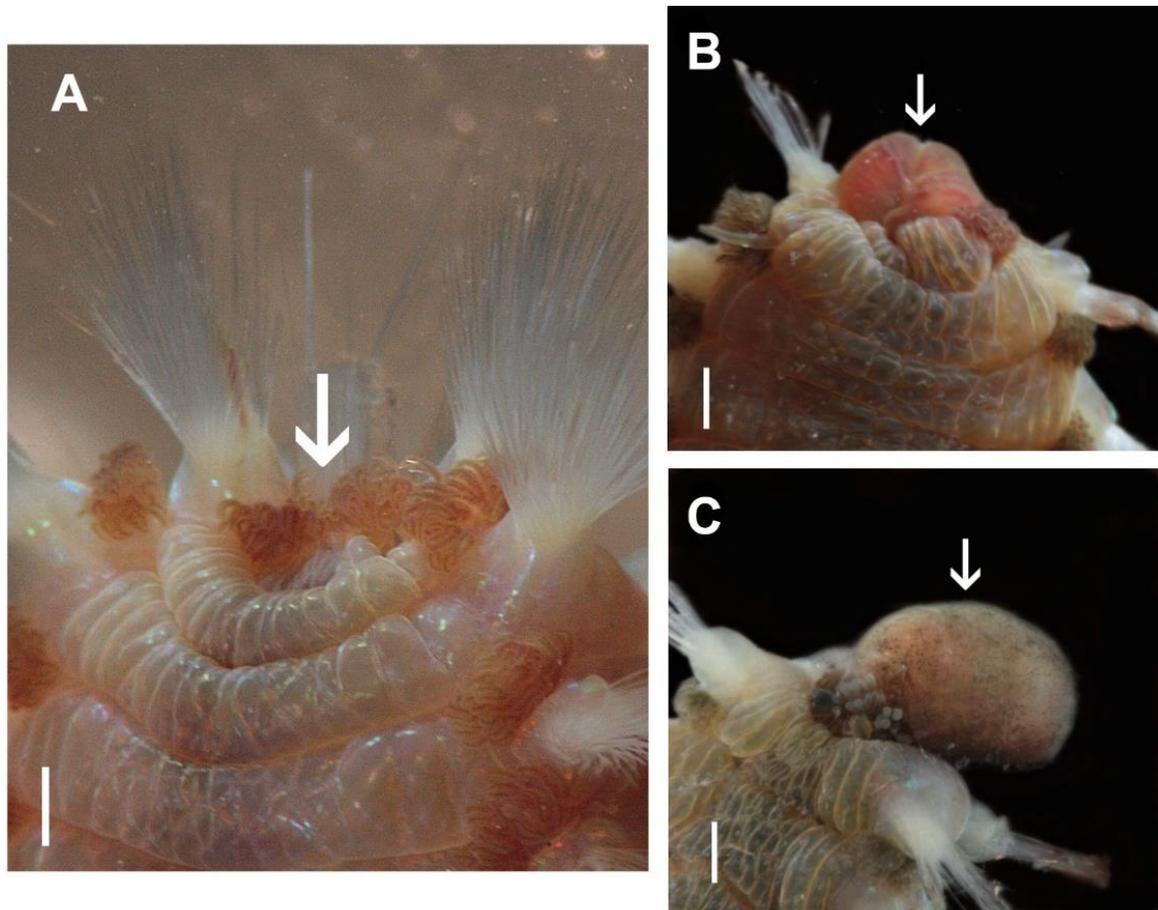


Figura 5. Contracción muscular del fragmento anterior. A) Contracción normal inmediatamente después del corte. B) Ejemplar con el peritoneo expuesto. C) Ejemplar con el intestino expuesto después de 45 días. Escala 1 mm.

El periodo de cicatrización fue visible durante las primeras 24 h, hasta la formación de un blastema color blanco durante las primeras 48 h en un fragmento expuesto a 50 $\mu\text{g As/L}$ y a las 72 h en todos los fragmentos del grupo control y en los expuestos a las demás concentraciones de As. Un fragmento de cada tratamiento contaba con un blastema de color rojo el sexto día y para el octavo día ya estaba presente en todos los fragmentos. La formación de antenas y palpos del prostomio comenzó a ser evidente el día 11 en los tres fragmentos del grupo control y en el 66.66% de fragmentos del tratamiento de 100 $\mu\text{g As/L}$. En los fragmentos de los tratamientos de 50 y 250 $\mu\text{g As/L}$, estas estructuras comenzaron a ser visibles a partir del día 13. La carúncula fue visible a partir del día 15 en los fragmentos del grupo control y en la solución de 100 $\mu\text{g As/L}$. En los fragmentos de los tratamientos de 50 y 250 $\mu\text{g As/L}$, la carúncula comenzó a ser visible a partir del día 16 (Anexo 1, Figs. 6 y 7).

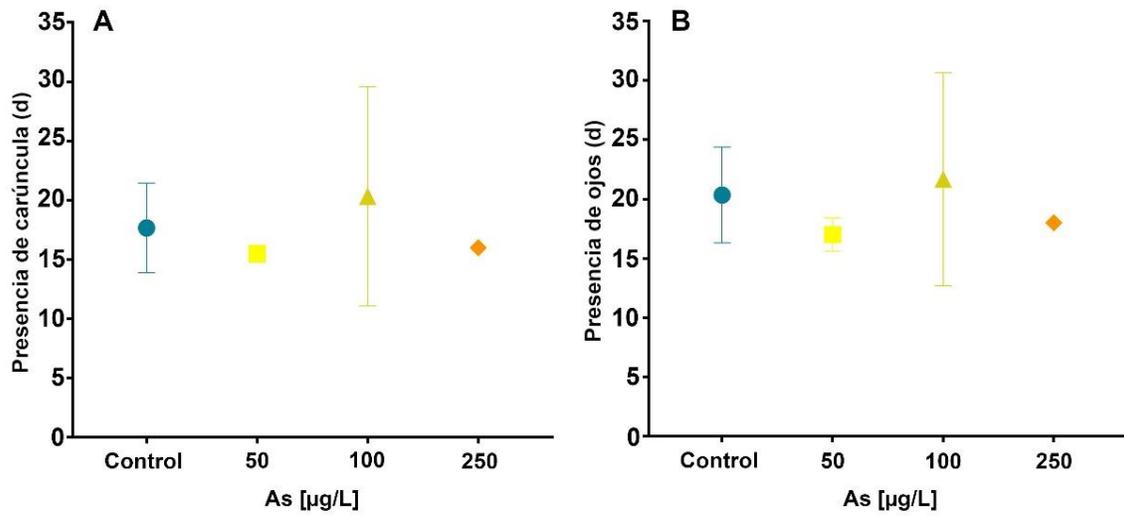


Figura 6. Fase 1 de la regeneración anterior de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As. A) Promedios de los días en los que la carácúcula fue visible. B) Promedios de los días en los que los ojos fueron visibles.

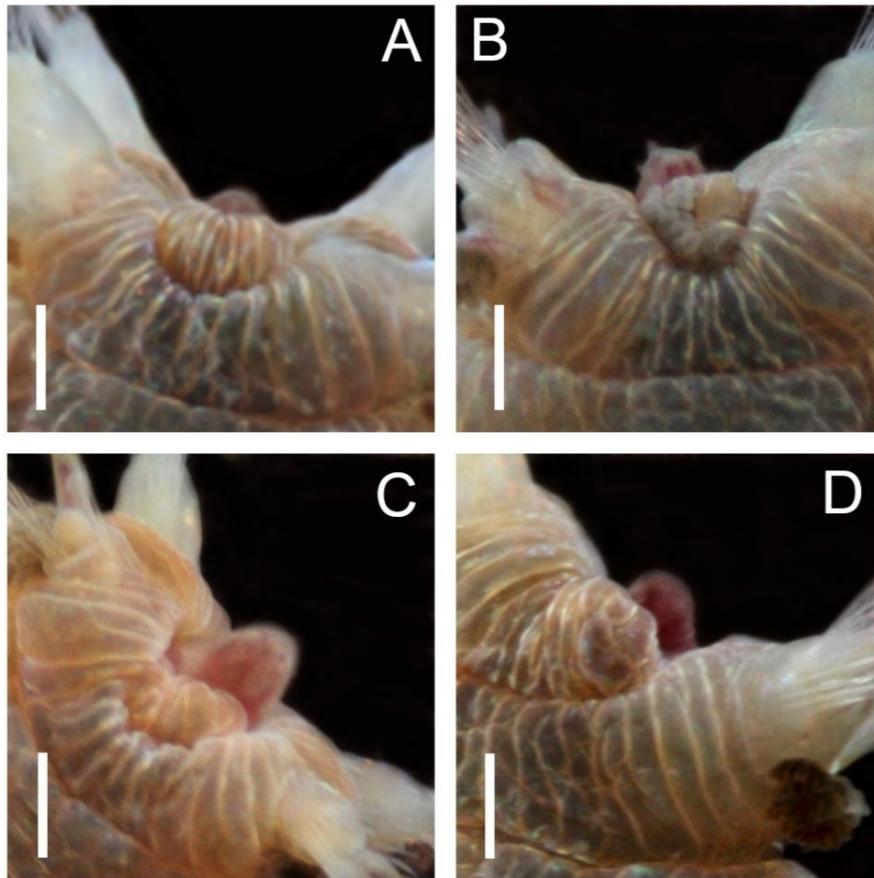


Figura 7. Fase 1 de la regeneración anterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A después de 16 días de exposición a diferentes concentraciones de As. A) control, b) 50 µg/L, c) 100 µg/L, d) 250 µg/L. Escala 1 mm.

7.1.2.2. Fase 2: Formación de segmentos anteriores

La formación de 12 segmentos anteriores fue posible en todos los organismos expuestos y no expuestos a As, pero existió un retraso asociado a la concentración a lo largo de esta fase. Los primeros segmentos comenzaron a ser visibles a partir del día 18 en los controles y en el tratamiento de 50 µg As/L. En el tratamiento de 100 µg As/L, el primer segmento fue visible el día 21, mientras que en 250 µg As/L fue visible a partir del día 22. El grupo control finalizó con esta fase del proceso después de 18 ± 7.23 días; los expuestos a 50 µg As/L finalizaron en 19 ± 1.41 días; los de 100 µg As/L en 29 ± 5.56 días, y los de 250 µg As/L en 30 ± 4.04 días (Fig. 8 y 9).

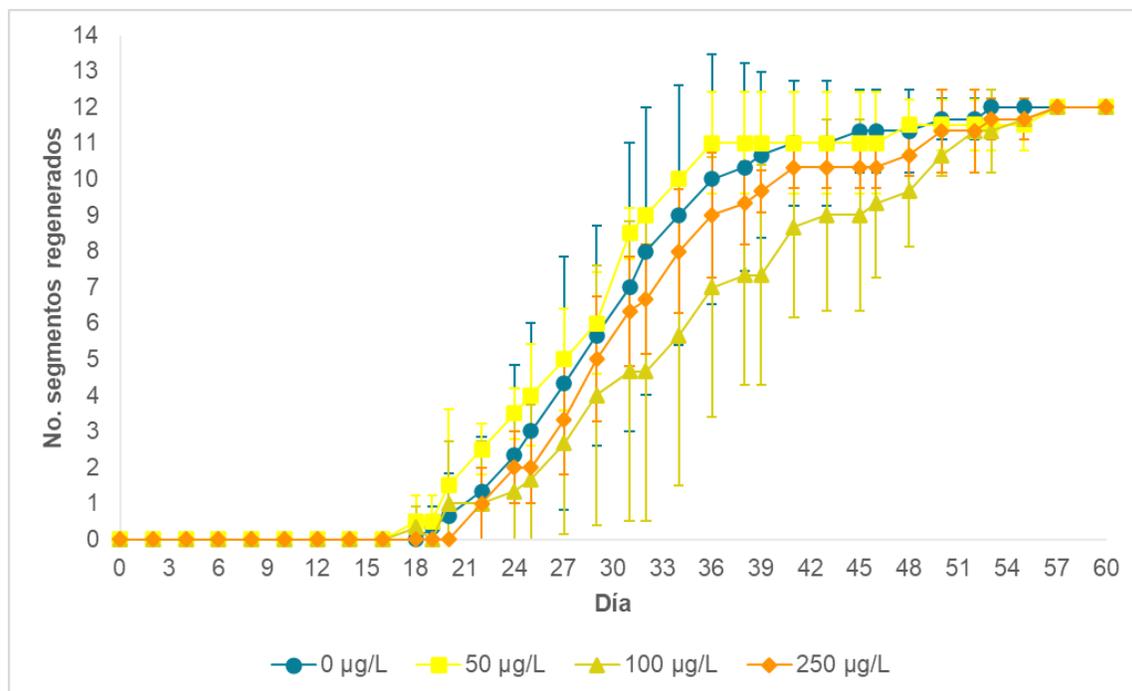


Figura 8. Fase 2 de la regeneración anterior. Número de segmentos anteriores regenerados en *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.

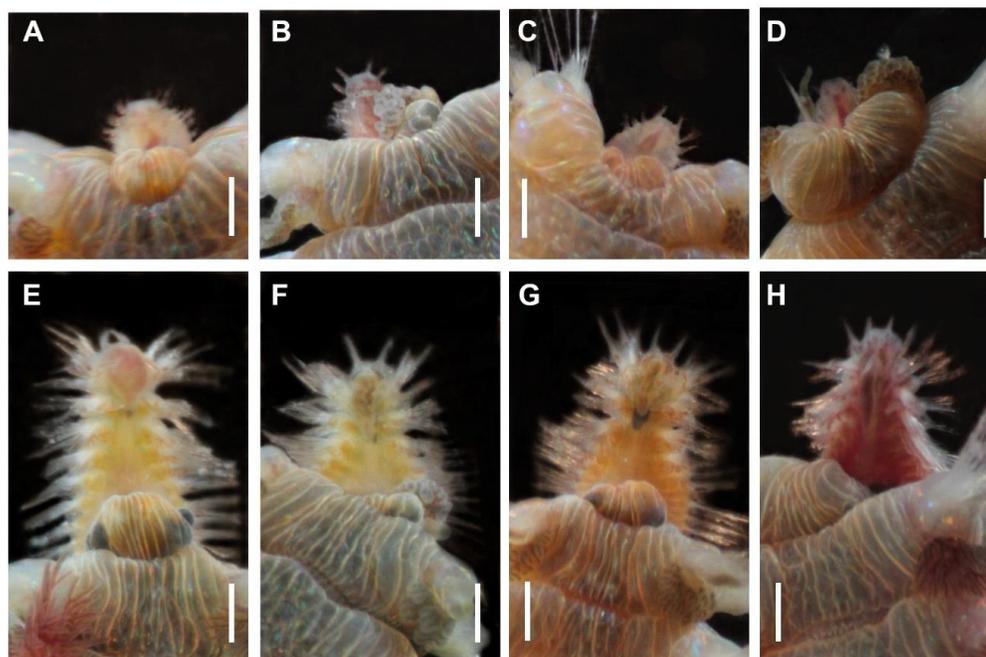


Figura 9. Fase 2 de la regeneración anterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As durante el día 20 (A-D) y el día 38 (E-H). A) Control con cuatro segmentos, B) 50 µg As/L con dos segmentos, C) 100 µg As/L con tres segmentos, D) 250 µg As/L sin segmentos, E) Control con 12 segmentos, F) 50 µg As/L con 11 segmentos, G) 100 µg As/L con 10 segmentos, H) 250 µg As/L con 10 segmentos. Escala 1 mm.

Finalmente, las diferencias de tiempo entre tratamientos se pueden observar al calcular los segmentos formados por día. Los ejemplares del grupo control tuvieron la tasa más alta (0.70 ± 0.22 segmentos por día); que disminuyó en los organismos expuestos. Los organismos expuestos a $50 \mu\text{g As/L}$ tuvieron una tasa de 0.63 ± 0.04 ; en $100 \mu\text{g As/L}$ fue de 0.42 ± 0.07 y en $250 \mu\text{g As/L}$ de 0.39 ± 0.05 (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de regeneración de segmentos anteriores (número de segmentos regenerados por día), en tres fragmentos de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As. D.E. = Desviación estándar.

Tratamiento	0 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	250 $\mu\text{g/L}$
Fragmento 1	0.85		0.50	0.34
Fragmento 2	0.44	0.66	0.34	0.40
Fragmento 3	0.80	0.60	0.42	0.44
MEDIA	0.70	0.63	0.42	0.39
D.E.	0.22	0.04	0.07	0.05

No hubo interacción entre el tiempo y las concentraciones de As, lo cual se confirmó al no encontrar diferencias significativas con el modelo nulo ($\text{AIC} = 1860$, $D^2 = 930.88$, $p = 0.1131$). Sin embargo, el efecto del As se confirmó con la prueba de Wilcoxon, ya que hubo un efecto significativo de la concentración entre todos los tratamientos, excepto entre la solución de $50 \mu\text{g/L}$ y el grupo control (Tabla 2). Esto indica que el retraso en la formación de segmentos anteriores fue consecuencia de la concentración de As.

Tabla 2. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la formación de segmentos anteriores de *Eurythoe* sp. A. * $p < 0.05$.

Tratamiento	Control		50 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$	
	<i>W</i>	<i>p</i>	<i>W</i>	<i>p</i>	<i>W</i>	<i>p</i>
50 $\mu\text{g/L}$	193	0.6347				
100 $\mu\text{g/L}$	1887	0.0088*	1764	<0.001*		
250 $\mu\text{g/L}$	1800	0.012*	1530	<0.001*	1427	0.0229*

7.1.2.3. Fase 3: Crecimiento de la región anterior regenerada

Durante la etapa de crecimiento se observó un aumento de volumen y cambio de color constante en todos los organismos. Inicialmente, al día 50, los fragmentos expuestos a

diferentes concentraciones de As tenían un volumen similar ($4.18 - 8.63 \text{ mm}^3$) y el tejido de los segmentos regenerados mantuvo un tono anaranjado, más claro que el tono marrón de los segmentos preexistentes. Sin embargo, una semana después de comenzar a recibir alimento, el aumento de volumen fue mayor en los ejemplares expuestos a As que los del grupo control. Esta tendencia se mantuvo durante toda la tercera fase del experimento. Al finalizar, los ejemplares expuestos a As alcanzaron tallas mayores, de $46.92 \pm 31.37 \text{ mm}^3$ ($n = 2$; en $50 \mu\text{g As/L}$), $37.69 \pm 5.39 \text{ mm}^3$ ($n = 3$; en $100 \mu\text{g As/L}$) y $36.91 \pm 25.16 \text{ mm}^3$ ($n = 3$; en $250 \mu\text{g As/L}$) (Fig. 9). Este incremento de tamaño resultó en que los segmentos regenerados ya no se diferenciaban de los segmentos preexistentes debido a que adquirieron tallas y colores similares (Fig. 10). Contrario a esto, los ejemplares del grupo control sólo incrementaron $21.20 \pm 4.99 \text{ mm}^3$ ($n = 2$), y la diferencia de tamaño entre los segmentos regenerados y preexistentes fue claro, a pesar de haber adquirido un color similar (Fig. 11).

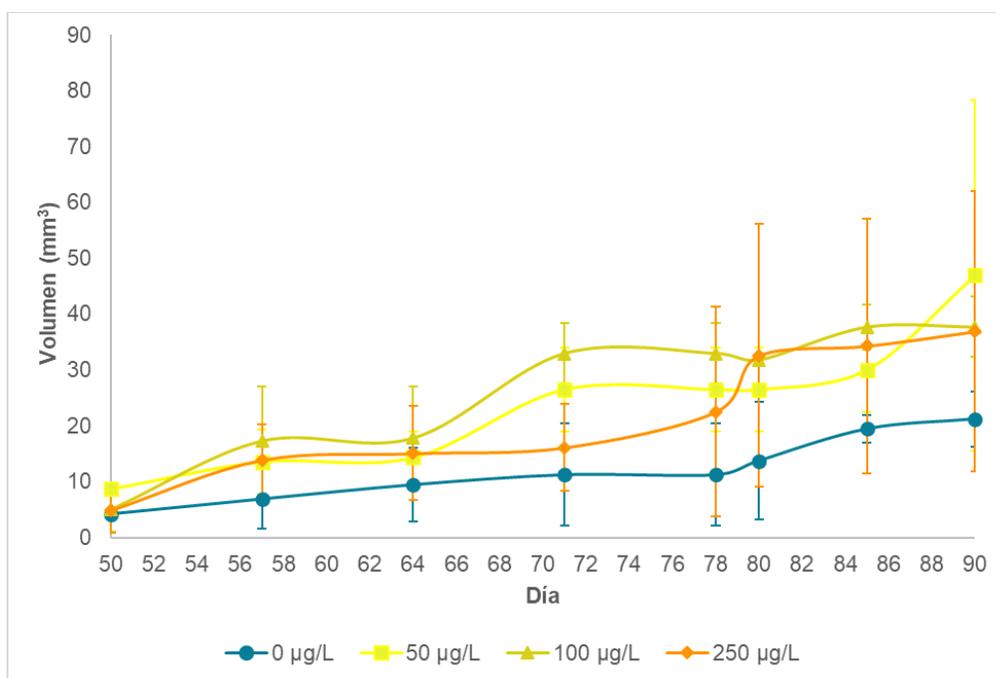


Figura 10. Volumen en los segmentos anteriores regenerados de *Eurythoe* sp. A durante la tercera fase de la exposición a diferentes concentraciones de As.

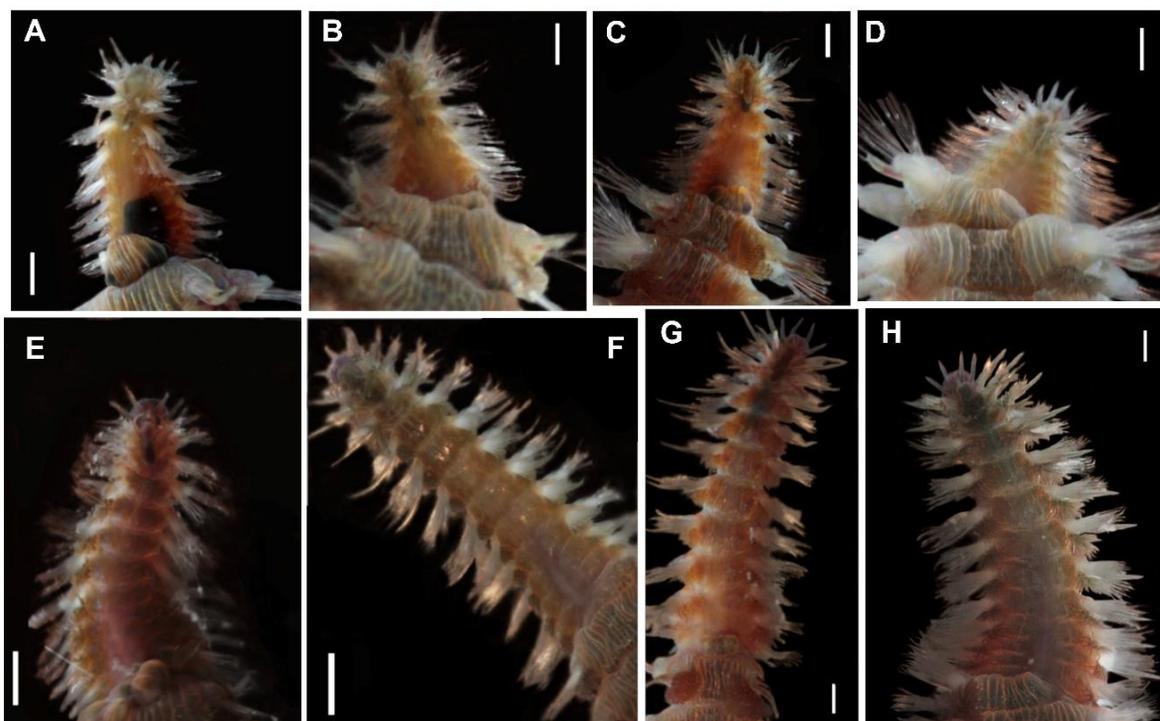


Figura 11. Fase 3 de la regeneración anterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As durante el día 50 (A-D) y el día 90 (E-H). A y E) Control, B y F) 50 µg As/L, C y G) 100 µg As/L, D y H) 250 µg As/L. Escala 1 mm.

Se realizaron comparaciones parciales con el control debido a la mortalidad presentada. No se encontró interacción entre el tiempo y la concentración (AIC = 605.93, $D^2 = 1.6415$, $p = 0.9084$), pero se confirmaron las diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto entre los expuestos a 100 µg As/L con los de 50 µg As/L y el grupo control (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la fase de crecimiento de la región anterior regenerada de *Eurythoe* sp. A. * $p < 0.05$.

Tratamiento	Control		50 µg/L		100 µg/L	
	W	p	W	p	W	p
50 µg/L	93	0.0132*				
100 µg/L	5	0.9102	49	0.2156		
250 µg/L	130	0.0001*	131	0.0001*	182	0.0063*

7.1.2.4. Conducta

Durante el transcurso del experimento, todos los fragmentos posteriores de *Eurythoe* sp. A expuestos y no expuestos a As mantuvieron la sensibilidad a la luz y realizaron su alimentación de manera normal.

Una vez transcurridos 41 días, cuando el 66.66% de los fragmentos del grupo control habían concluido con la fase de formación de segmentos nuevos, comenzaron a notarse algunas diferencias entre tratamientos. Los ejemplares del grupo control y los expuestos a 50 µg As/L presentaban poca movilidad dentro del frasco, pero una vez colocados en una caja Petri, bajo la luz del microscopio, comenzaron a moverse en dirección contraria a la fuente de luz de manera normal. En cambio, los ejemplares expuestos a 100 y 250 µg As/L estuvieron muy activos dentro y fuera del frasco, incluso lograban salir del frasco a los pocos minutos de regresarlos después de realizar las observaciones bajo el microscopio. En todos los casos se presentó una liberación de setas al ser manipulados dentro del frasco, así como al momento de ser colocados bajo el microscopio.

No se notaron alteraciones en la alimentación de los organismos. Todos los organismos reaccionaron de manera inmediata cuando se colocó alimento dentro del frasco. El 91.75% de los organismos (expuestos y no expuestos) fueron capaces de evertir la faringe de manera normal. La única excepción fue el ejemplar expuesto a 50 µg As/L con regeneración asimétrica, ya que mantuvo el prostomio inmerso hacia un lado, lo que limitó su capacidad de capturar alimento, pero aparentemente no la inhibió por completo, ya que los segmentos nuevos aumentaron de tamaño.

7.1.3. *Extremo anterior preexistente con regeneración posterior*

7.1.3.1. Fase 1: Cicatrización y formación del lóbulo posterior

Durante la primera fase de la regeneración posterior se observó el tejido indiferenciado sobre la herida durante los primeros 12 días. Este tejido conservó un color rosado durante cinco días, tras los cuales se vio un cambio a color rojo en el grupo control y en ejemplares expuestos a 50 µg As/L. En los ejemplares de los tratamientos de 100 y 250 µg As/L, el cambio de color ocurrió a partir del octavo día. A partir del día 13, un ejemplar del grupo

control contaba con una proyección de ese mismo tejido que era retráctil y para el día 15, esta proyección o lóbulo fue visible en todos los ejemplares del grupo control, igual que en el 66.6 y 33.33% de los ejemplares de las soluciones de 50 y 100 $\mu\text{g As/L}$, respectivamente. Los ejemplares restantes, incluidos el 100% de los ejemplares de la solución de 250 $\mu\text{g As/L}$, contaban con la presencia de dicho lóbulo a partir del día 20 (Anexo 2, Figs. 12 y 13).

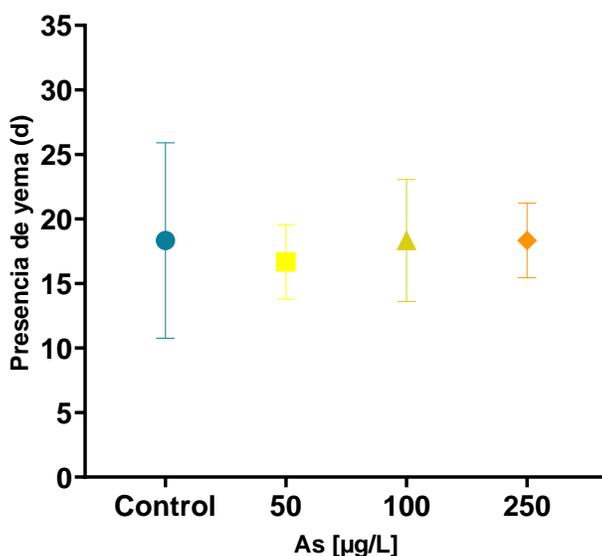


Figura 12. Fase 1 de la regeneración posterior. Promedios de los días en los que fue visible el lóbulo posterior en ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As.



Figura 13. Fase 1 de la regeneración posterior. A) Contracción muscular del fragmento posterior el día 3. B) Presencia del tejido rosado el día 3. C) Presencia de tejido rojo el día 11. Todas las fotos son del grupo control. Escalas 1 mm.

7.1.3.2.Fase 2: Formación de segmentos posteriores

Durante esta fase de la regeneración de segmentos posteriores, hubo diferencias entre tratamientos que fueron visibles en el transcurso del tiempo, con un retraso inicial en los organismos expuestos, y un incremento posterior en la concentración de 100 µg As/L. En el grupo control y en el tratamiento de 50 µg As/L, los primeros segmentos fueron visibles alrededor del día 22; en el tratamiento 100 µg As/L el día 24 y 250 µg As/L alrededor del día 30 (Fig. 14).

La incorporación de segmentos fue mayor durante los primeros 60 días en el grupo control, cuando ya contaban con 12.5 ± 2.12 segmentos, mientras los del tratamiento de 50 µg As/L tenían 10.33 ± 2.08 ; los de 100 µg As/L 10.66 ± 2.51 y los de 250 µg As/L contaban con 8.66 ± 0.58 segmentos. Sin embargo, a partir de ese momento, la tasa de los organismos expuestos a 100 µg As/L superó la de todos los tratamientos y se mantuvieron así hasta el término del experimento (90 d), cuando lograron incorporar 20.33 ± 4.72 segmentos. Seguido de éstos, el tratamiento de 250 µg As/L contaba con 18.33 ± 3.05 segmentos y el de 50 µg As/L con 18 ± 2 segmentos. Los organismos control alcanzaron a formar alrededor de 16.5 ± 3.5 segmentos al finalizar los 90 días.

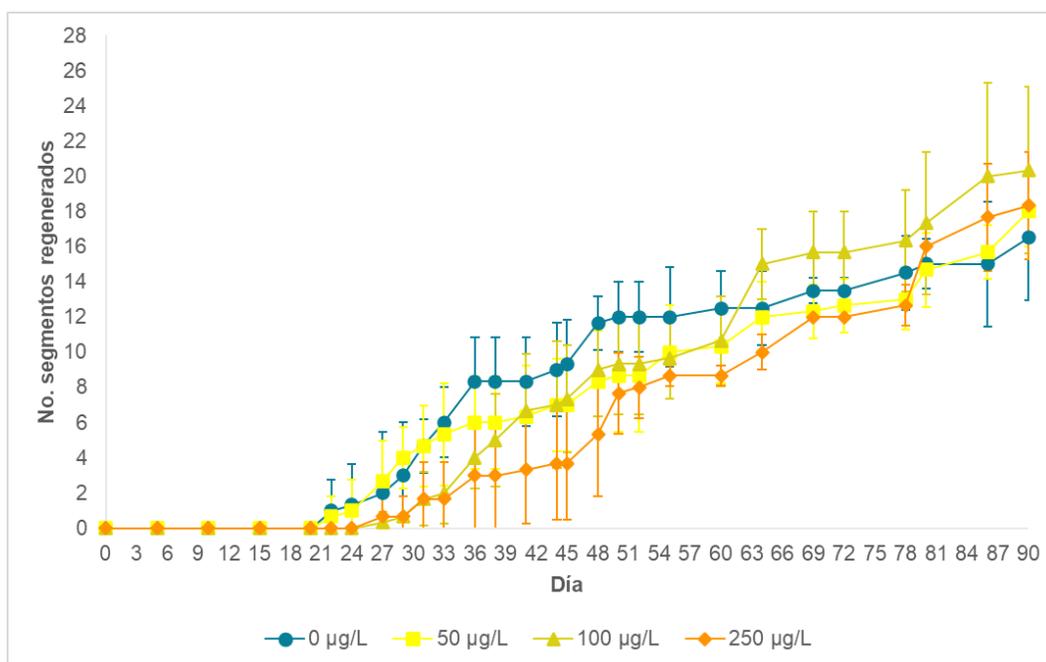


Figura 14. Fase 2 de la regeneración posterior. Número de segmentos posteriores regenerados de *Eurythoe* sp. A en 90 días durante la exposición a diferentes concentraciones de As.

Se comprobó la interacción del tiempo y la concentración ($AIC = 1058.6$, $D^2 = 495.33$, $p = 0.00316$) en todos los tratamientos. Estas diferencias se observaron entre casi todos los tratamientos, excepto el control contra el tratamiento de $50 \mu\text{g As/L}$, y entre 100 y $250 \mu\text{g As/L}$ (Tabla 4).

Tabla 4. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en la formación de segmentos de la región posterior de *Eurythoe* sp. A. * $p < 0.05$.

Tratamiento	Control		50 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$	
	W	p	W	p	W	p
50 $\mu\text{g/L}$	836	0.1338				
100 $\mu\text{g/L}$	1909	0.0003*	1317	0.0103*		
250 $\mu\text{g/L}$	2770	< 0.0001*	2392	< 0.0001*	756	0.1511

7.1.3.3.Fase 3: Crecimiento de la región posterior regenerada

En los fragmentos anteriores con regeneración posterior no hubo una diferencia marcada entre el término de la incorporación de segmentos (fase 2) y entre la fase de crecimiento (fase 3). Esto se debe a que el número de segmentos posteriores que *Eurythoe* sp. A puede formar no es fijo como en el caso de la regeneración anterior, por lo que es común que los ejemplares continúen con la incorporación de segmentos, aunque algunos ya tengan tallas similares a los segmentos preexistentes.

El aumento de volumen de la región regenerada fue claro en todos los tratamientos una vez que los organismos comenzaron a recibir alimento. En el día 50, los segmentos nuevos de los ejemplares expuestos a diferentes concentraciones de As tuvieron tamaños de $0.78 \pm 0 \text{ mm}^3$ ($250 \mu\text{g As/L}$), 1.96 ± 1.66 (control), $3.40 \pm 2.26 \text{ mm}^3$ ($50 \mu\text{g As/L}$), y $5.49 \pm 4.76 \text{ mm}^3$ ($100 \mu\text{g As/L}$) y el tejido de los segmentos regenerados mantuvo un tono anaranjado claro durante casi toda esta fase del experimento. A partir del día 71, las diferencias entre los organismos expuestos y los controles comenzaron a ser más notorias, ya que los controles tenían un volumen de $13.74 \pm 10.55 \text{ cm}^3$, mientras los expuestos contaban con $30.89 \pm 23.52 \text{ cm}^3$ en $50 \mu\text{g As/L}$, $29.32 \pm 9.59 \text{ cm}^3$ en $100 \mu\text{g As/L}$ y $24.74 \pm 6.88 \text{ cm}^3$ en $250 \mu\text{g As/L}$. Para el día 90 las diferencias entre tratamientos fueron aún más notorias. En el grupo control, las partes regeneradas alcanzaron un volumen final de $62.83 \pm 63.86 \text{ mm}^3$; en el tratamiento

de 50 $\mu\text{g As/L}$ alcanzaron tallas de $117.95 \pm 57.16 \text{ mm}^3$; los ejemplares de la solución de 100 $\mu\text{g As/L}$ alcanzaron el volumen más alto con $134.17 \pm 46.39 \text{ mm}^3$; y los expuestos a 250 $\mu\text{g As/L}$ midieron hasta $117.80 \pm 9.81 \text{ mm}^3$ (Fig. 15). En los fragmentos expuestos, los segmentos regenerados alcanzaron las mismas dimensiones que los segmentos preexistentes, la única diferencia fue el tono más claro en la parte regenerada (Fig. 16).

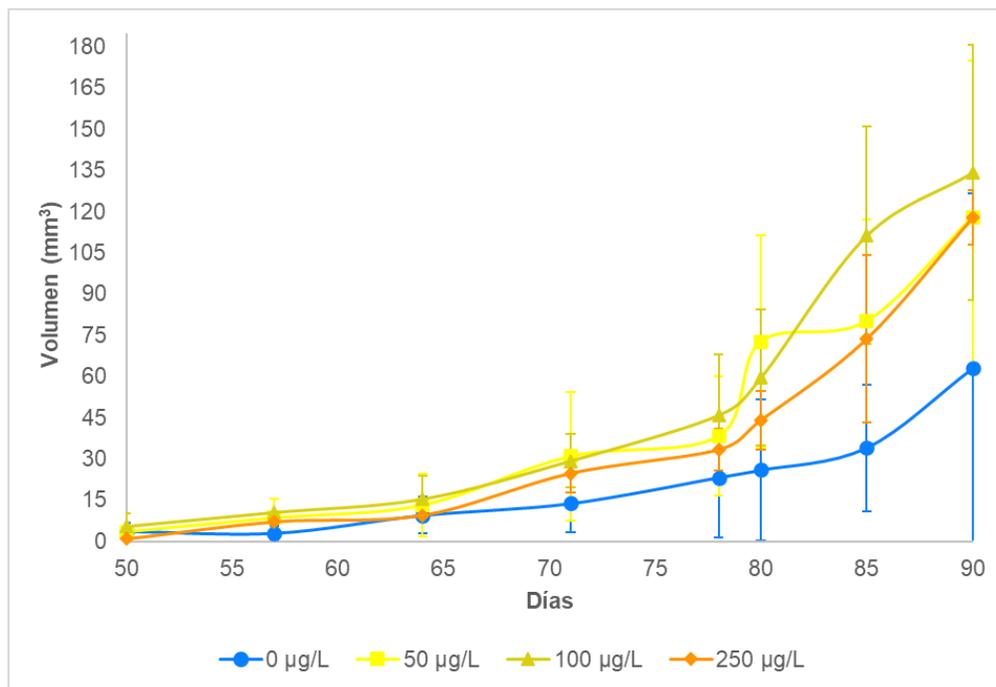


Figura 15. Volumen en los segmentos posteriores regenerados de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de As.

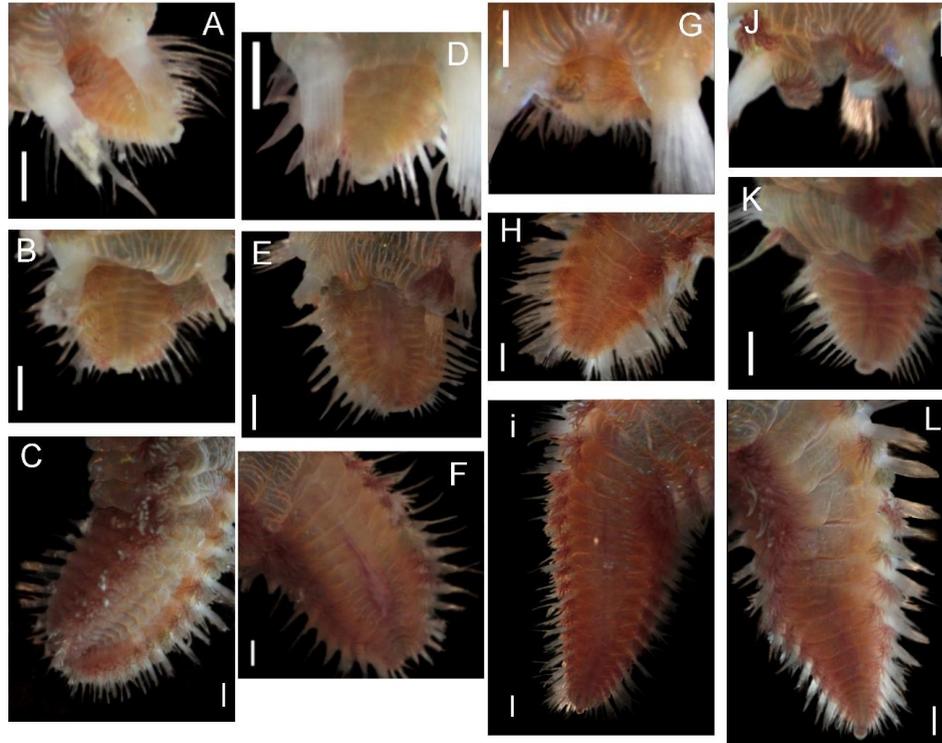


Figura 16. Fases 2 y 3 de la regeneración posterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de As durante los días 38 (A, D, G, J), el día 60 (B, E, H, K) y día 90 (C, F, I, L). A-C) Control, D-F) 50 µg As/L, G-I) 100 µg As/L, J-L) 250 µg As/L. Escala 1 mm.

Se realizaron comparaciones parciales con el control debido a la mortalidad presentada en este tratamiento. Se comprobó el efecto combinado del tiempo y la concentración (AIC = 929.34, $D^2 = 2.7350$, $p < 0.001$). Estas diferencias se atribuyen a las diferencias encontradas entre todos los tratamientos, excepto los del tratamiento de 50 µg As/L con los de 100 y 250 µg As/L (Tabla 5).

Tabla 5. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de As en el crecimiento de segmentos de la región posterior regenerada de *Eurythoe* sp. A. * $p < 0.05$.

Tratamiento	Control		50 µg/L		100 µg/L	
	W	p	W	p	W	p
50 µg/L	140	0.0002*				
100 µg/L	143	0.0002*	85	0.2313		
250 µg/L	102	0.0136*	133	0.0573	251	< 0.0001*

7.1.3.4. Conducta

Durante el transcurso del experimento, todos los fragmentos anteriores con regeneración posterior, expuestos y no expuestos a As, mantuvieron la sensibilidad a la luz debido a que las estructuras fotosensibles (ojos) se encuentran en el prostomio. Estos fragmentos no mostraron un comportamiento aletargado durante el transcurso del experimento y su reacción hacia la presencia de alimento fue inmediata. Durante la fase de crecimiento se observó que los organismos expuestos a 100 y 250 $\mu\text{g As/L}$ defecaron con más frecuencia que los controles y los expuestos a 50 $\mu\text{g As/L}$. Todos los ejemplares soltaron las setas al ser manipulados dentro del frasco, así como al momento de ser colocados bajo el microscopio.

7.2. Experimento con Hg

7.2.1. Alteraciones morfológicas y supervivencia

Se presentaron alteraciones morfológicas provocadas por la exposición a Hg. Los extremos anteriores y posteriores regenerados en la exposición a 1 $\mu\text{g Hg/L}$ tuvieron una pérdida de pigmentación a partir del día 35. En este mismo tratamiento, un fragmento con regeneración anterior tuvo una expulsión del tubo digestivo después de realizar el corte y durante los primeros ocho días presentó una segunda expulsión de éste (Fig. 17A), lo que provocó un retraso en el inicio del proceso de regeneración. Los fragmentos expuestos a 5 $\mu\text{g Hg/L}$ presentaron un cambio de color a gris en el tejido preexistente el día 67, mientras el tejido regenerado se mantuvo rojo. Un fragmento con regeneración anterior al morir tenía la faringe evertida en el día 74 (Fig. 17B y C). El tejido preexistente de los ejemplares con regeneración anterior de la solución de 10 $\mu\text{g Hg/L}$ se tornó gris a partir del día 55; mientras que, para el día 58, las branquias recién regeneradas carecían completamente de pigmentación. Para el día 71, fue visible el desprendimiento de la cutícula del tejido preexistente que adquirió una textura rugosa y un color blanco, así como la eversión de la faringe y el ano posterior a la muerte. En cambio, los fragmentos anteriores con regeneración posterior perdieron su coloración en la parte regenerada alrededor del día 63. Posterior a su muerte, fue visible un desprendimiento de la cutícula tanto en la región preexistente como en la recién regenerada y una eversión de la faringe preexistente y el ano regenerado (Fig. 17D).

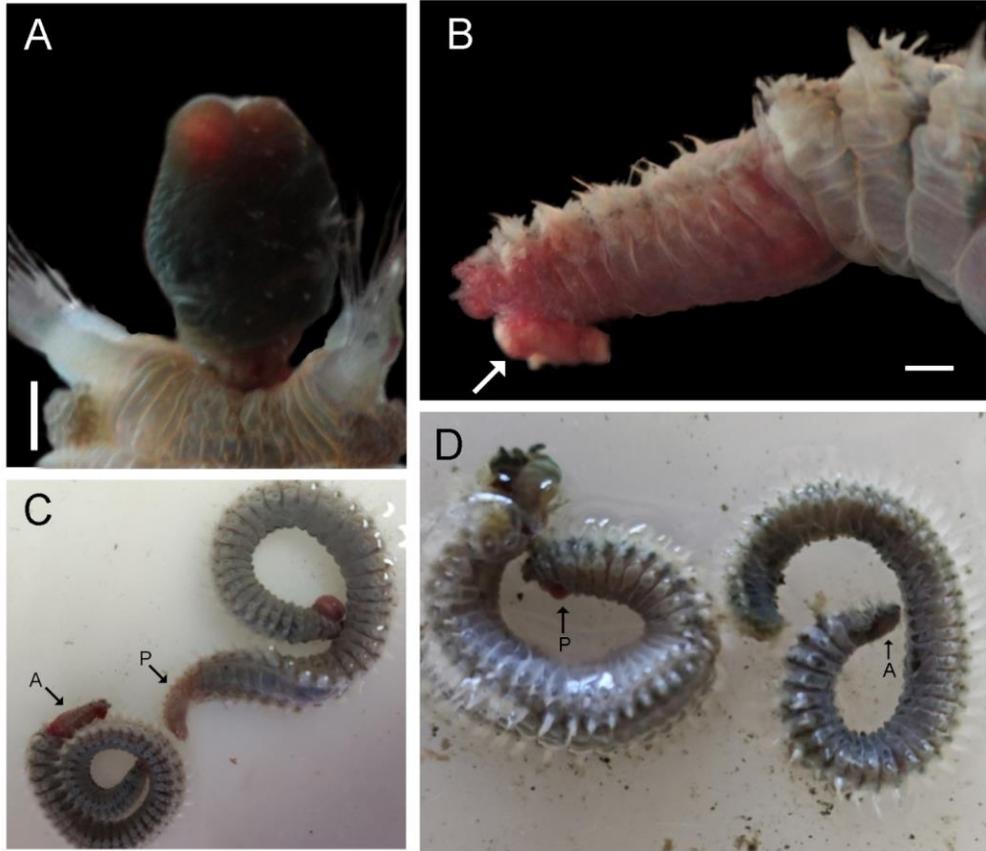


Figura 17. Malformaciones observadas en *Eurythoe* sp. A asociadas a la exposición a Hg. A) Ejemplar con segunda expulsión de tubo digestivo después de ocho días de exposición a 1 µg Hg/L, B y C) Ejemplares expuestos a 5 µg Hg/L con las faringes evertidas, D) Ejemplares expuestos a 10 µg Hg/L con la cutícula desprendida. Las flechas en C y D señalan los extremos regenerados, donde A apunta a la zona anterior y P a la zona posterior. Escalas 1 mm.

También se presentaron alteraciones sin una relación directa con la exposición a Hg. Un fragmento posterior con regeneración anterior expuesto 1 µg Hg/L mantuvo el tubo digestivo expuesto durante todo el experimento, aunque esto no impidió que se llevara a cabo la regeneración. Un fragmento con regeneración anterior expuesto a 5 µg Hg/L tuvo una expulsión del peritoneo que cubre al celoma que retrasó el inicio del proceso de regeneración.

Se presentó una mortalidad del 100% en todos los tratamientos. En los días 52 y 55 se registró la muerte de todos los fragmentos posteriores y anteriores, respectivamente, de la solución de 1 µg Hg/L. Los ejemplares de la solución de 10 µg Hg/L sobrevivieron hasta el día 71. Los fragmentos posteriores expuestos a 5 µg Hg/L sobrevivieron hasta el día 74, mientras los fragmentos anteriores sobrevivieron hasta el día 77.

El proceso de regeneración bajo exposición al Hg se presentará de manera descriptiva a partir del día 42, ya que por alguna razón los organismos del tratamiento control perecieron el día 43 (con la fase 2 del proceso finalizada) y, conforme a los estándares en experimentos de exposición en poliquetos ($\geq 20\%$ mortalidad en control) deben descartarse (ASTM, 2022).

7.2.2. Extremo posterior preexistente con regeneración anterior

7.2.2.1. Fase 1: Cicatrización y formación del prostomio

La fase de cicatrización y formación del prostomio no presentó afectaciones por la exposición al Hg. El 75% de los ejemplares tuvieron una contracción muscular normal, que provocó que los parápodos adyacentes al corte se movieran de una posición lateral hacia una posición antero-dorsal. Todos los fragmentos tuvieron una fase de cicatrización durante las primeras 24 h, seguido de la formación de un blastema blanco durante las primeras 48 h. Dicho blastema cambió de color hasta el día 10 en el 75% de los ejemplares de todas las soluciones; incluido el 100% del grupo control. Las excepciones fueron el ejemplar de la solución de 1 μg Hg/L que expulsó el tubo digestivo y el ejemplar de la solución de 5 μg Hg/L que presentó una expulsión del peritoneo que fue retraído hasta el día 29 y el blastema rojo fue visible el día 31. A pesar de que el proceso inició hasta completar la recuperación de la eversión, prácticamente el proceso de la formación de blastema y cambio de coloración se realizó en tan sólo 48 h. En la solución de 10 μg Hg/L se presentó un ejemplar que tuvo una expulsión del peritoneo el sexto día y logró contraerlo el día 10; así que la formación del blastema fue evidente el día siguiente y su cambio de color se dio el día 16; es decir, el cambio de color del blastema llevó cinco días.

La formación de los apéndices del prostomio (palpos y antenas) comenzó a ser perceptible el día 16, excepto en el 66.6% de los fragmentos posteriores expuestos a 10 μg Hg/L, en los que este proceso se retrasó hasta el día 20. Se presentaron otras dos excepciones durante esta parte del proceso: en el fragmento expuesto a 1 μg Hg/L que expulsó parte del tubo digestivo, no fue posible observar la formación del blastema ni del prostomio, hasta que el prostomio estuvo completo el día 24. La otra excepción fue el fragmento expuesto a 5 μg Hg/L que

contaba con un blastema rojo el día 31 y la formación de los apéndices del prostomio comenzaron a observarse tres días después (Anexo 3, Figs. 18 y 19).

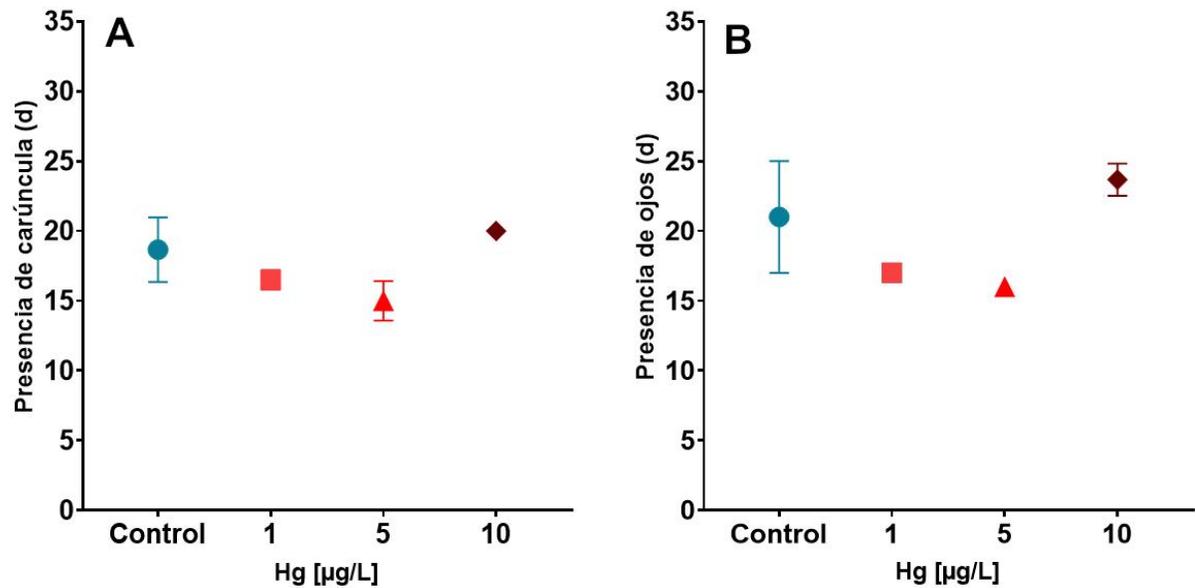


Figura 18. Fase 1 de la regeneración anterior de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg. Promedios de los días en los que la carúncula y B) los ojos fueron visibles en ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.

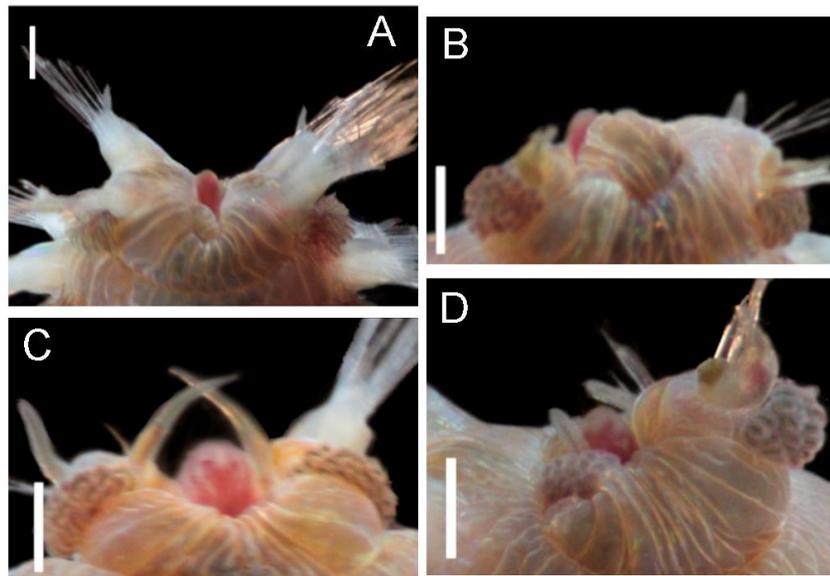


Figura 19. Fase 1 de la regeneración anterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A después de 16 días de exposición a diferentes concentraciones de Hg. A) Control, B) 1 µg Hg/L, C) 5 µg Hg/L, D) 10 µg Hg/L. Escala 1mm.

7.2.2.2. Fase 2: Formación de segmentos anteriores

Los resultados de esta fase del proceso se compararon hasta el día 42, un día antes de que los controles murieran, por lo que también se presenta únicamente el 90% de la formación de segmentos. El primer segmento fue visible cerca del día 23 ± 3.79 en los controles; en la solución de $1 \mu\text{g Hg/L}$ a partir del día 22 ± 1.73 ; en $5 \mu\text{g Hg/L}$ cerca del día 20 ± 2.12 ; y en la solución $10 \mu\text{g Hg/L}$ el día 25 ± 0.57 . Para el término de esta fase, el grupo control logró regenerar entre ocho y 10 segmentos durante 12 ± 2.64 d y los ejemplares expuestos a $1 \mu\text{g Hg/L}$ lograron regenerar hasta 11 segmentos durante 20 ± 2.64 d.

Por otro lado, los ejemplares de la solución de $5 \mu\text{g Hg/L}$ regeneraron 12 segmentos en el transcurso de 23 ± 2.82 d. De manera similar, el 33.33% de los ejemplares de la solución de $10 \mu\text{g Hg/L}$ regeneraron 12 segmentos durante 17 ± 0.57 d, mientras que el resto alcanzó a formar 11 segmentos durante este tiempo (Fig. 20 y 21).

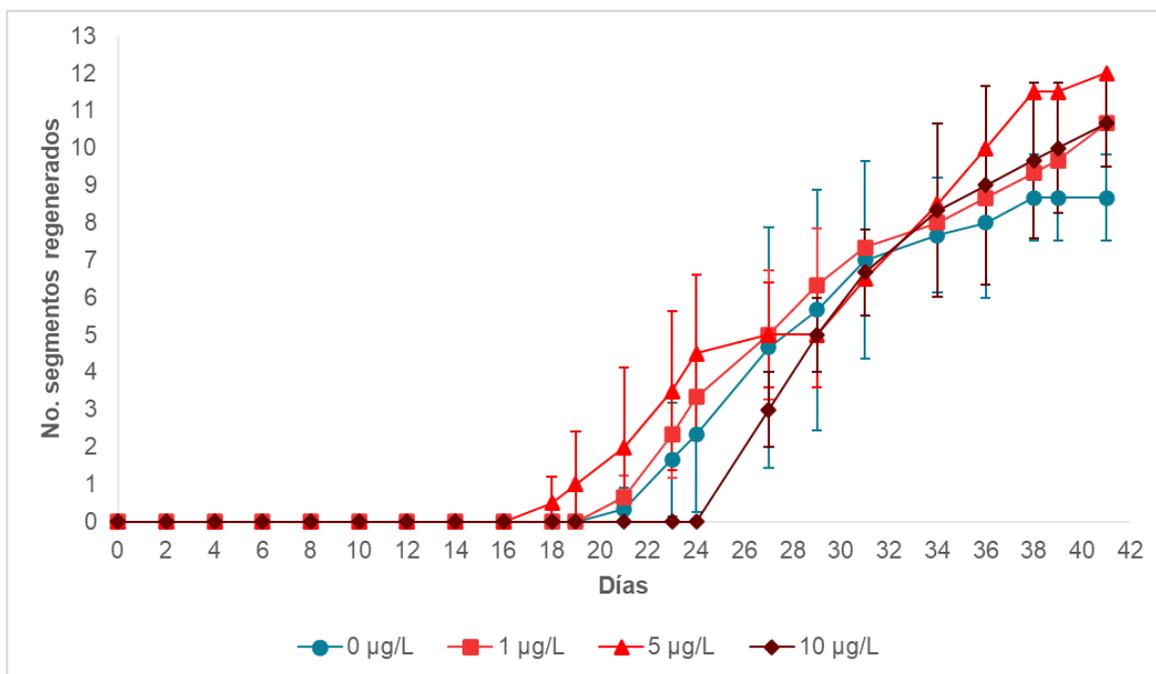


Figura 20. Fase 2 de la regeneración anterior. Segmentos anteriores regenerados en *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.

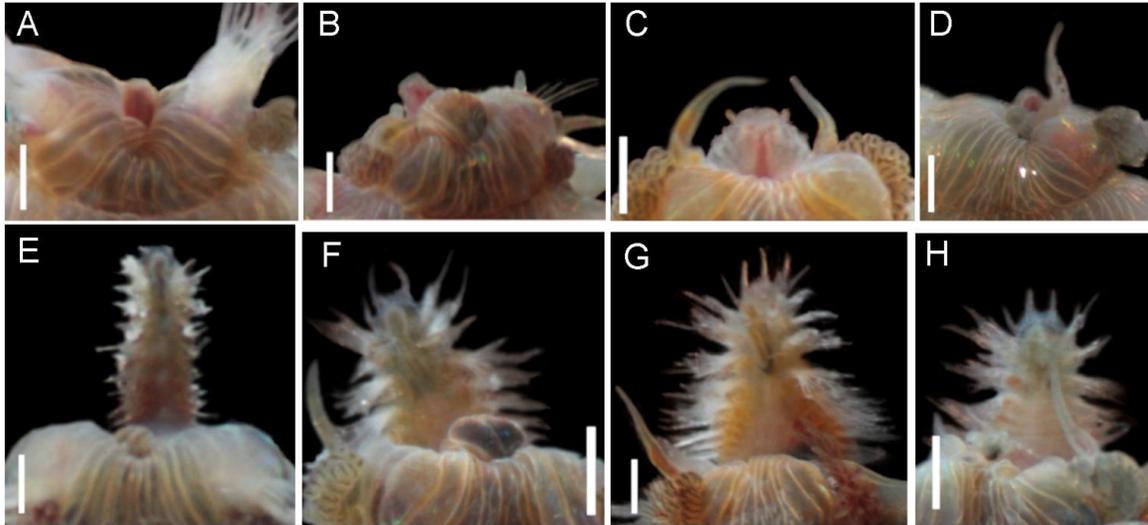


Figura 21. Fase 2 de la regeneración anterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg durante el día 20 (A-D) y el día 35 (E-H). A) Control sin segmentos, B) 1 µg Hg/L con el prostomio completo, pero aún sin segmentos, C) 5 µg Hg/L con tres segmentos formados, D) 10 µg Hg/L sin segmentos formados, E) Control con 9 segmentos formados, F) 1 µg Hg/L con ocho segmentos formados, G) 5 µg Hg/L con 10 segmentos formados, H) 10 µg Hg/L con ocho segmentos formados. Escala 1 mm.

La tasa de incorporación de segmentos presentó una reducción en los tratamientos de 1 µg Hg/L (0.54 ± 0.06 segmentos por día) y 5 µg Hg/L (0.53 ± 0.06 segmentos por día); respecto al grupo control (0.73 ± 0.07); y un incremento en la concentración de 10 µg Hg/L (0.764 ± 0.03) (Tabla 6).

Tabla 6. Tasa de regeneración de segmentos anteriores (número de segmentos regenerados por día) en tres fragmentos de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg. D.E. = Desviación estándar.

Tratamiento	0 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L
Fragmento 1	0.67	0.56		0.67
Fragmento 2	0.80	0.50	0.48	0.67
Fragmento 3	0.73	0.50	0.57	0.71
MEDIA	0.73	0.52	0.53	0.68
D.E.	0.07	0.03	0.06	0.02

Se observó una interacción entre el tiempo y la concentración de Hg (AIC = 976.83, $D^2 = 401.17$, $p = 0.02727$) durante esta fase. Además, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto el tratamiento de 10 µg Hg/L con el grupo control y 1 µg Hg/L (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de Hg en la formación de segmentos anteriores regenerados de *Eurythoe* sp. A. *p < 0.05.

Tratamiento	Control		1 µg/L		5 µg/L	
	W	p	W	p	W	p
1 µg/L	989	0.0496*				
5 µg/L	1352	<0.0001*	561	0.0458*		
10 µg/L	368	0.4591	734	0.1189	774	0.0027*

7.2.2.3. Fase 3: Crecimiento de la región anterior regenerada

Debido a que el grupo control y los fragmentos expuestos a 1 µg Hg/L no sobrevivieron lo suficiente para hacer las mediciones pertinentes del extremo en regeneración, sólo se tiene información de esta fase de los fragmentos en 5 y 10 µg Hg/L.

Durante esta fase, se observó un incremento en el volumen de los fragmentos de 5 y 10 µg Hg/L determinado semanalmente. El día 50, la región anterior regenerada tenía un volumen entre 4.71 y 10.60 mm³ (5 µg Hg/L) y entre 0.78 y 21.20 mm³ (10 µg Hg/L) y el tejido regenerado mantuvo un color anaranjado.

Al finalizar el experimento, los extremos anteriores regenerados expuestos a 5 µg Hg/L alcanzaron tallas de 21.20 ± 4.99 mm³ (n = 2), mientras que en los ejemplares de 10 µg Hg/L alcanzaron una talla de 23.16 mm³ ± 21.64 (n = 3). Aunque fue evidente el incremento de tamaño de los segmentos regenerados, no fue lo suficiente para alcanzar el mismo volumen y color que los segmentos preexistentes.

7.2.2.4. Conducta

Todos los ejemplares tuvieron un comportamiento normal al iniciar el experimento (sensibilidad a la luz y expulsión de setas al ser manipulados), pero mostraron cambios de conducta conforme transcurrió el tiempo. Los ejemplares de la solución de 1 µg Hg/L comenzaron a tener movimientos aletargados y poca reacción a la luz a partir del día 48 y continuaron así hasta el día 55, a pesar de que ya recibían alimento. Los ejemplares de la solución de 10 µg Hg/L se encontraban enroscados dentro del frasco y dejaron de reaccionar a la luz y de expulsar setas desde el día 63. Cabe destacar que, a pesar de que no presentaron

anomalías conductuales, un día antes de morir los gusanos del grupo control se observaron aletargados y dejaron de liberar las setas al ser manipulados.

7.2.3. Extremo anterior preexistente con regeneración posterior

7.2.3.1. Fase1: Cicatrización y formación del lóbulo posterior

Durante la fase de regeneración posterior, se pudo apreciar la presencia de tejido indiferenciado color rosado que cubría la herida durante los primeros 15 días. Se presentó un cambio de color a rojo el día 16 en casi todos los fragmentos, excepto en uno del grupo control y en uno expuesto a 10 $\mu\text{g Hg/L}$ que ya contaban con la presencia de una proyección del lóbulo posterior. Los ejemplares del grupo control y el 33.33% de los fragmentos del tratamiento de 1 $\mu\text{g Hg/L}$ presentaron el lóbulo posterior hasta el día 23. En tanto que, para el día 25 dicho lóbulo ya se encontraba presente en el 100% de los ejemplares correspondientes a la concentración más baja (1 $\mu\text{g Hg/L}$). Al día 20 el lóbulo posterior comenzó a ser visible en los fragmentos expuestos a 5 $\mu\text{g Hg/L}$ y en el 33.33% del tratamiento de 10 $\mu\text{g Hg/L}$. Un fragmento de los tratamientos de 5 y 10 $\mu\text{g Hg/L}$ desarrollaron el lóbulo hasta los días 41 y 31, respectivamente (Anexo 4, Fig. 22).

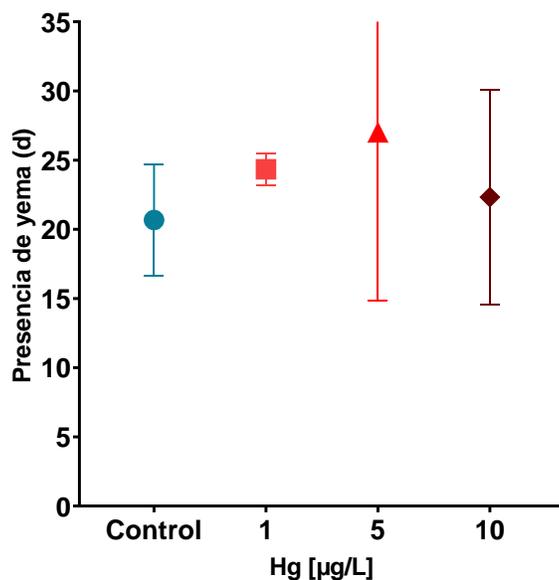


Figura 22. Regeneración posterior. Promedios de los días en los que fue visible el lóbulo posterior en ejemplares de *Eurythoe* sp. A expuestos a diferentes concentraciones de Hg.

7.2.3.2. Fase 2: Formación de segmentos posteriores

Los resultados de esta fase del proceso se compararon hasta el día 42, un día antes de que los controles murieran, igual que con la regeneración anterior. Durante esta fase de la regeneración posterior, las diferencias entre tratamientos comenzaron a ser perceptibles en el transcurso del tiempo y el número de segmentos incorporados. La formación de los primeros segmentos posteriores se dio a los 27 ± 2 d en el grupo control; a los 28 ± 1.41 d en el tratamiento de $1 \mu\text{g Hg/L}$; a los 26 ± 1.41 d en el tratamiento de $5 \mu\text{g Hg/L}$; y en el tratamiento de $10 \mu\text{g Hg/L}$ después de 28 ± 4.72 d (Fig. 23). Durante los primeros 29 d no se presentaron diferencias evidentes entre tratamientos. Los controles contaban con 3 ± 1.73 segmentos ($n = 3$); los de $1 \mu\text{g Hg/L}$ tenían 1.66 ± 1.52 segmentos ($n = 2$); los de $5 \mu\text{g Hg/L}$ tenían 3 ± 2.64 segmentos ($n = 3$) y los de $10 \mu\text{g Hg/L}$ tenían 2.66 ± 2.51 segmentos ($n = 3$). Sin embargo, a partir del día 34 hubo un incremento en el número de segmentos incorporados de los fragmentos expuestos a $10 \mu\text{g Hg/L}$, pues ya contaban con 6.33 ± 3.78 segmentos, mientras los controles tenían 4.33 ± 1.52 segmentos; los de $1 \mu\text{g Hg/L}$ tenían 3 ± 2.64 segmentos y los de $5 \mu\text{g Hg/L}$ tenían 4.66 ± 4.04 segmentos (Fig. 23).

Al finalizar los 42 días, los fragmentos del grupo control lograron formar 6 ± 2.64 segmentos, los expuestos a $1 \mu\text{g Hg/L}$ regeneraron 7.5 ± 0.70 , los de $5 \mu\text{g Hg/L}$ 8.66 ± 6.80 y los de la concentración de $10 \mu\text{g Hg/L}$ regeneraron 8 ± 5.19 segmentos.

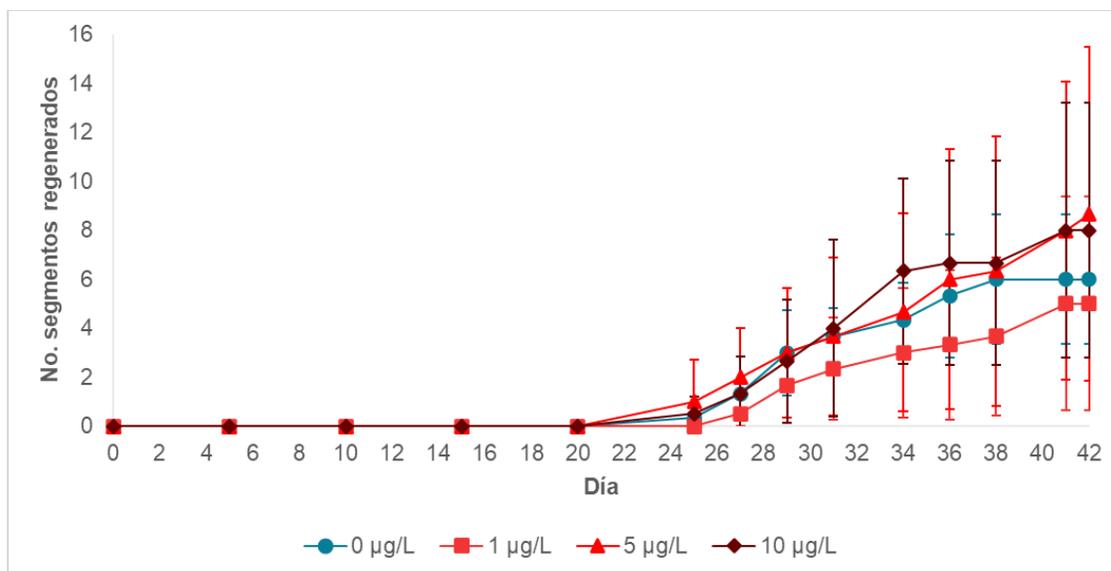


Figura 23. Tasa de regeneración de los segmentos posteriores nuevos de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.

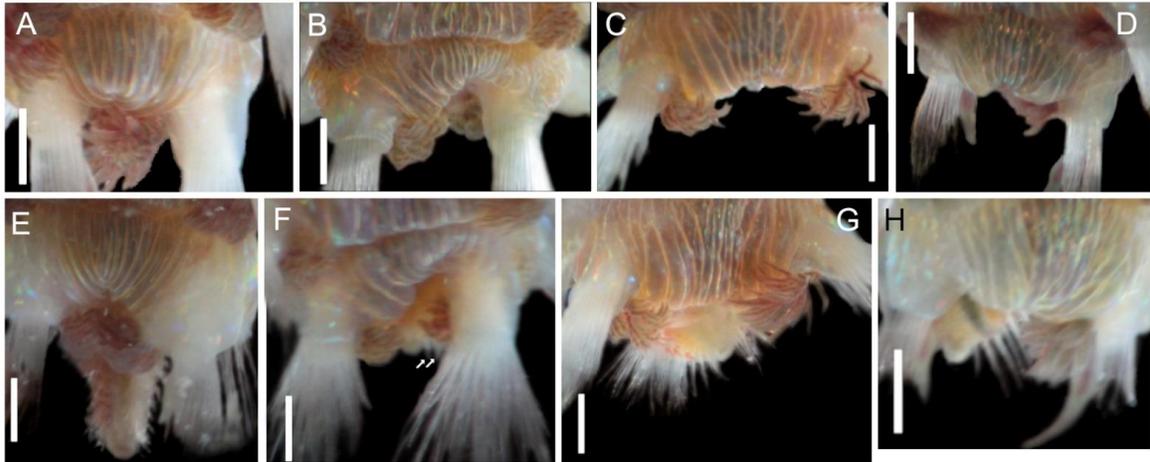


Figura 24. Fase 2 de la regeneración posterior. Ejemplares de *Eurythoe* sp. A con regeneración posterior expuestos a diferentes concentraciones de Hg durante el día 20 (A-D) y el día 35 (E-H). A) Control, B) 1 µg Hg/L, C) 5 µg Hg/L, D) 10 µg Hg/L, E) Control con siete segmentos, F) 1 µg Hg/L con tres segmentos, G) 5 µg Hg/L con seis segmentos, H) 10 µg Hg/L con seis segmentos. Escala 1 mm.

No hubo una interacción del tiempo y la concentración de Hg durante esta fase (AIC = 856.02, $D^2 = 482.02$, $p = 0.6537$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre la solución de 1 µg Hg/L con todos los demás (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba pareada de Wilcoxon de los efectos de las concentraciones de Hg en la formación de segmentos anteriores regenerados de *Eurythoe* sp. A. * $p < 0.05$.

Tratamiento	Control		1 µg/L		5 µg/L	
	W	p	W	p	W	p
1 µg/L	1054	0.0181*				
5 µg/L	885	0.0626	2098	<0.0001*		
10 µg/L	697	0.1243	2322	< 0.0001*	107	0.7585

7.2.3.3. Fase 3: Crecimiento de la región posterior regenerada

Los fragmentos anteriores con regeneración posterior de 5 y 10 µg Hg/L presentaron un ligero aumento de volumen una vez que comenzaron a recibir alimento. A partir del día 50, los ejemplares de la solución de 5 µg Hg/L tenían un volumen de $9.42 (\pm 6.66 \text{ mm}^3, n = 2)$ y contaban con 14 ± 1.41 segmentos regenerados; mientras los ejemplares de la solución de 10 µg Hg/L contaban con 12 ± 1.11 segmentos y un volumen de $10.21 \text{ mm}^3 (n = 2)$. Una semana después de comenzar a recibir alimento, se observó una diferencia entre las concentraciones.

Las regiones posteriores regeneradas de los ejemplares del tratamiento de 5 $\mu\text{g Hg/L}$ aumentaron $4.71 \pm 4.99 \text{ mm}^3$ sin incorporar segmentos nuevos, mientras los fragmentos de la concentración de 10 $\mu\text{g Hg/L}$ aumentaron $16.29 \pm 7.49 \text{ mm}^3$, aunque un fragmento formó dos segmentos. Las diferencias entre las concentraciones disminuyeron conforme transcurrió el tiempo.

Por otra parte, un fragmento expuesto a 5 $\mu\text{g Hg/L}$ contaba con tres segmentos regenerados el día 50, mismos que mantuvieron un volumen de 0.04 mm^3 hasta el término del experimento sin incorporar más. Lo mismo ocurrió con un fragmento expuesto a 10 $\mu\text{g Hg/L}$, que no logró formar más de tres segmentos y que mantuvo un volumen de 0.78 mm^3 .

7.2.3.4. Conducta

Los fragmentos anteriores con regeneración posterior mostraron un comportamiento similar a sus contrapartes en la misma solución. Los ejemplares del grupo control fueron los primeros en mostrar signos de aletargamiento (día 41), seguidos de los ejemplares de la solución de 1 $\mu\text{g Hg/L}$ a partir del día 48. Los fragmentos de la solución de 10 $\mu\text{g Hg/L}$ dejaron de mostrar reacción a la luz el día 64 y se mantuvieron enroscados dentro y fuera del frasco sin expulsar las setas.

7.3. As en solución y en tejido de *Eurythoe* sp. A

7.3.1. As en solución

Se tomaron muestras de agua durante el experimento de As para monitorear las concentraciones del elemento. El grupo control presentó valores cercanos a cero (máx. = 1.81 $\mu\text{g/L}$, 56 d). Los valores reales de las soluciones con As fueron más bajos que los valores nominales. En la solución de 50 $\mu\text{g/L}$ no se registraron valores por arriba de 40.53 $\mu\text{g/L}$ (día 70, después del recambio de agua), mientras que en el día 42 se determinó una concentración de 10.42 $\mu\text{g/L}$, antes de realizar el cambio de agua. En la solución de 100 $\mu\text{g/L}$, el valor más bajo fue 0.9 $\mu\text{g/L}$ en el día 21, y el más elevado fue 53.21 $\mu\text{g/L}$ en el día 90. La solución de 250 $\mu\text{g/L}$ presentó valores de 75.55 $\mu\text{g/L}$ (día 28, antes del cambio de agua) a 166.53 en el día 83, previo al recambio de agua (Fig. 25).

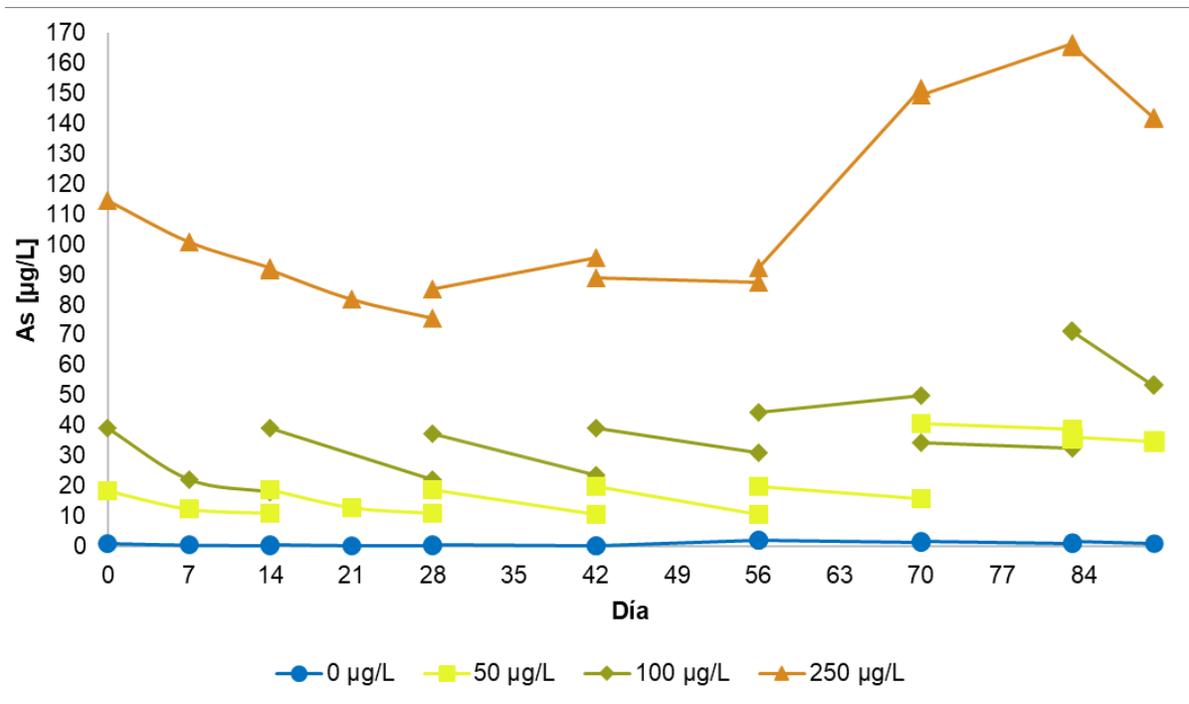


Figura 25. Concentraciones de As en las distintas soluciones durante 90 días. Se realizaron recambios de agua cada 14 días.

A pesar de estas lecturas, se puede apreciar una disminución en la concentración de As en las distintas soluciones entre los días que se realizaron los cambios de agua. Estas diferencias son más notorias en la solución de 100 µg/L, atribuidas, en parte, a la posible absorción del elemento por parte de los gusanos.

También se vieron fluctuaciones en la solución de 100 µg/L del acuario sin organismos; mientras que la solución control sin organismos también mantuvo valores cercanos a cero.

De manera general, se puede observar que las soluciones de 100 µg/L con organismos y sin organismos mostraron diferencias entre sí a lo largo del experimento. La solución del acuario sin organismos mantuvo valores más elevados que la solución donde se encontraban los organismos, lo que indica la absorción del elemento en los organismos (Fig. 26).

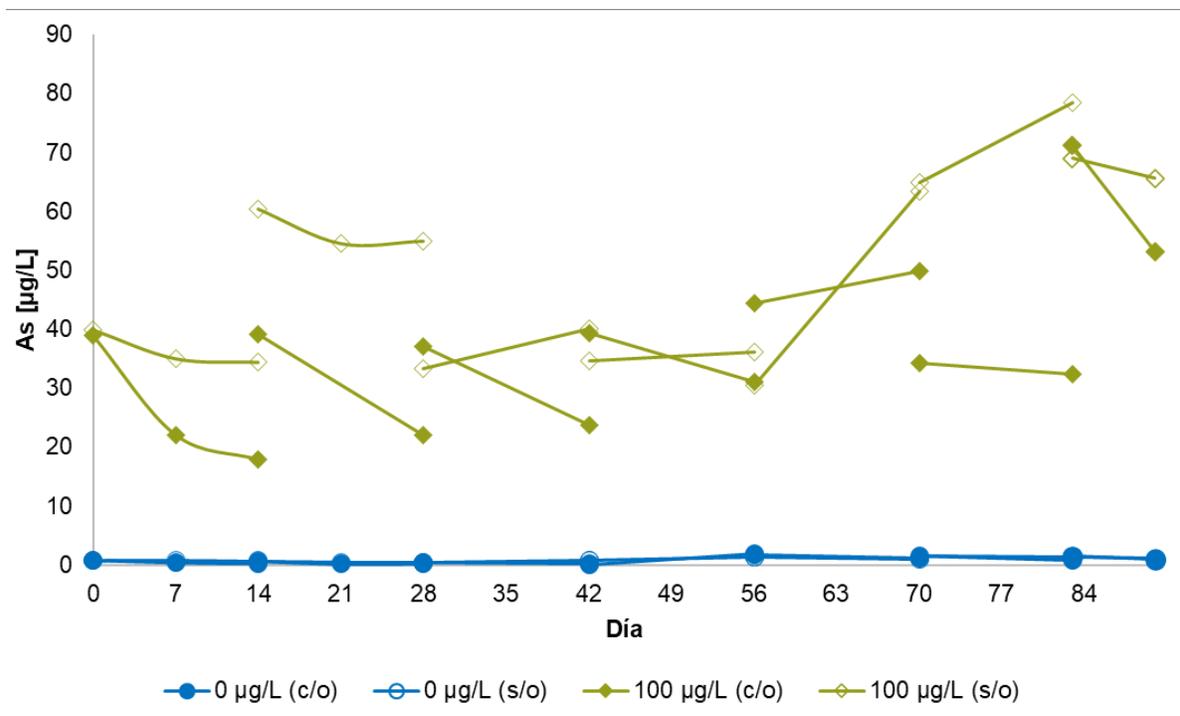


Figura 26. Concentraciones de As en las soluciones control e intermedia durante 90 días en acuarios con (c/o) y sin organismos (s/o). Se realizaron recambios de agua cada 14 días.

Al observar las diferencias entre las concentraciones de As en los acuarios, se puede suponer que la absorción de As por parte de los organismos aumentó conforme transcurrió el tiempo, lo que resulta más evidente en el día 83, donde se registró la diferencia más grande entre acuarios (46.12 µg As/L). Se puede observar una tendencia a una menor absorción de As a partir del intervalo entre los días 42 y 56, cuando los organismos ya habían finalizado con la segunda fase y comenzaron a recibir alimento (inicio de la fase 3). A partir de este intervalo de tiempo comenzaron a registrarse valores entre 5.16 µg As/L (día 56) y 13.46 µg As/L (día 70 antes del cambio de agua).

Los resultados de los días 70 (con la solución recién preparada) y el día 83 en el acuario sin organismos, tuvieron valores más altos que en días anteriores y posteriores. Esto puede atribuirse a un error al momento de realizar la lectura, o bien, al momento de preparar la solución para el recambio de agua.

7.3.2. As en tejido de *Eurythoe* sp. A

Se observó que los ejemplares de *Eurythoe* sp. A acumularon una concentración total de As mayor en los tratamientos con las concentraciones más elevadas. Destaca que el grupo control también presentó valores bajos (4.81 $\mu\text{g As/g}$), y que los tratamientos de 50 y 100 $\mu\text{g As/L}$, acumularon una cantidad similar (9.91 y 9.85 $\mu\text{g As/g}$, respectivamente). Por otro lado, los organismos del tratamiento de 250 $\mu\text{g As/L}$ acumularon cuatro veces más As que el grupo control (21.92 $\mu\text{g As/g}$) (Fig. 27).

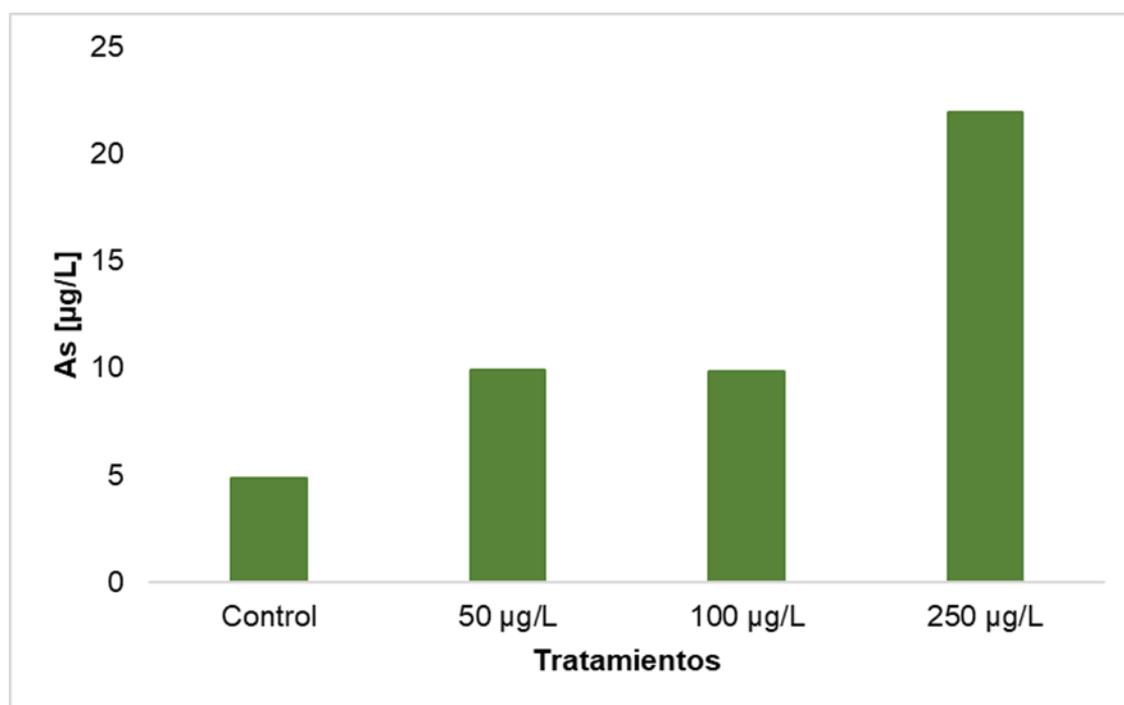


Figura 27. Concentración de As total en fragmentos regenerados y preexistentes de *Eurythoe* sp. A después de 90d de exposición.

Al comparar el As en los extremos regenerados contra los extremos preexistentes, se observaron patrones opuestos entre la regeneración anterior y posterior. Las concentraciones de As fueron mayores en el tejido anterior regenerado que en el tejido anterior preexistente en todos los tratamientos (Fig. 21). En los extremos anteriores regenerados de los controles, se registró un valor de 1.92 $\mu\text{g As/g}$, mientras en los extremos anteriores preexistentes el valor fue más bajo (0.75 $\mu\text{g As/g}$). En comparación, los ejemplares del tratamiento de 50 $\mu\text{g As/L}$ tuvieron valores ligeramente más elevados: 4.62 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos anteriores regenerados y 1.15 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos preexistentes. Los ejemplares del tratamiento de

100 $\mu\text{g As/L}$ tuvieron una concentración en el extremo anterior regenerado, más alta (3.17 $\mu\text{g As/g}$) que en el extremo anterior preexistente (1.70 $\mu\text{g As/g}$). En el tratamiento de 250 $\mu\text{g As/L}$ se registraron los valores más altos: 7.00 $\mu\text{g As/g}$ en el extremo anterior regenerado, mientras que en el extremo anterior original tuvieron una concentración más baja (2.48 $\mu\text{g As/g}$).

En cambio, en los extremos posteriores la concentración más alta se encontró en el tejido preexistente (Fig. 28). En los controles los valores fueron de 0.75 $\mu\text{g As/g}$ en la parte regenerada, y de 1.31 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos preexistentes. En el tratamiento 50 $\mu\text{g As/L}$ se encontraron valores de 1.94 $\mu\text{g As/g}$ en el tejido posterior regenerado y 2.18 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos preexistentes. En 100 $\mu\text{g As/L}$, la concentración de As en los extremos regenerados fue de 2.00 $\mu\text{g As/g}$, mientras en los extremos preexistentes se determinaron 2.97 $\mu\text{g As/g}$. En el tratamiento de 250 $\mu\text{g As/L}$ los valores fueron 4.09 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos regenerados, y 8.34 $\mu\text{g As/g}$ en los extremos preexistentes.

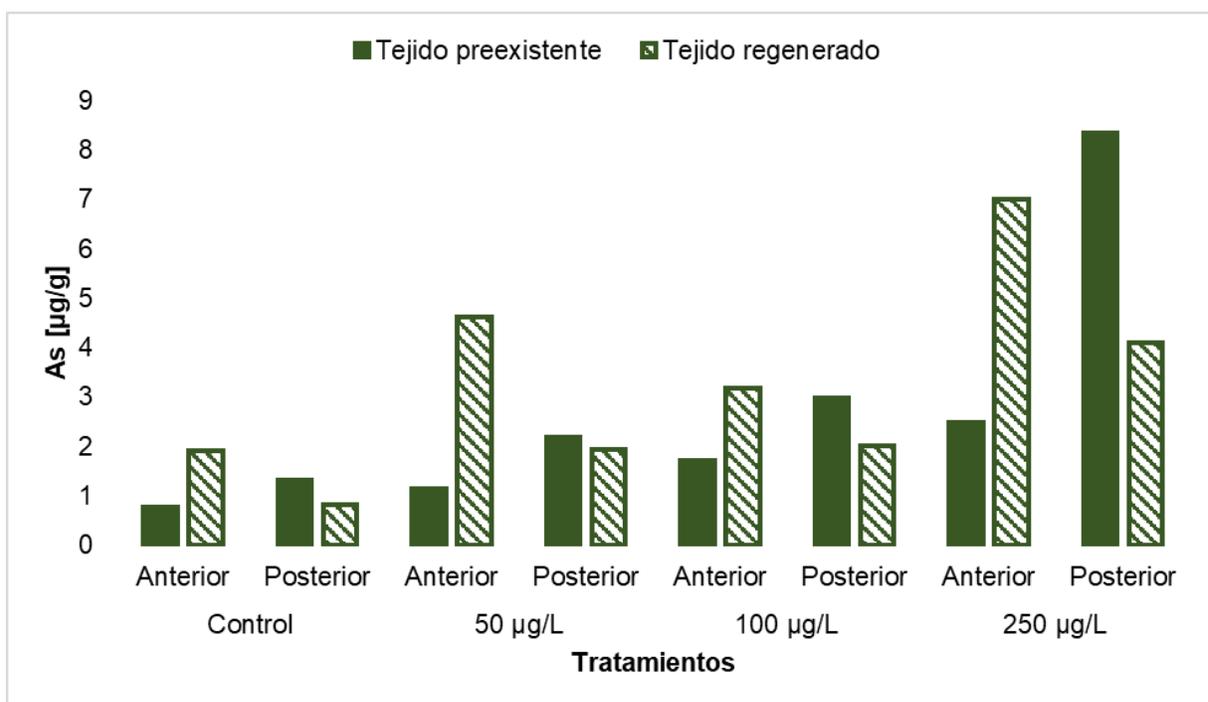


Figura 28. Concentración de As en los fragmentos anteriores y posteriores (regenerados y preexistentes) de *Eurythoe* sp. A después de 90d de exposición.

7.4.Hg en solución y en tejido de *Eurythoe* sp. A

7.4.1. Hg en solución

Se tomaron muestras de agua durante el experimento de Hg para monitorear las concentraciones del elemento en las soluciones. Sin embargo, las concentraciones de Hg fueron menores a los valores mínimos de detección, en prácticamente todas las muestras.

7.4.2. Hg en tejido de *Eurythoe* sp. A

Se observó un aumento en la acumulación de Hg en los tratamientos donde la concentración en solución era más alta, particularmente en los extremos posteriores. En el grupo control, se registraron valores similares para ambos extremos (anterior = 0.42 $\mu\text{g Hg/g}$, posterior = 0.41 $\mu\text{g Hg/g}$).

En el tratamiento de 1 $\mu\text{g Hg/L}$, el extremo anterior acumuló 0.90 $\mu\text{g Hg/g}$, mientras el Hg en el extremo posterior fue ligeramente más alto, con una acumulación de 1.29 $\mu\text{g Hg/g}$.

En el tratamiento de 5 $\mu\text{g Hg/L}$, se observó el valor más alto de acumulación de Hg, ya que en el extremo anterior se obtuvo un 427.07 $\mu\text{g Hg/g}$. En el extremo posterior también hubo un incremento en la concentración de Hg; sin embargo, fue más bajo que en los extremos anteriores (84.26 $\mu\text{g Hg/g}$).

Finalmente, en el tratamiento de 10 $\mu\text{g Hg/L}$ se registró un valor de 213.52 $\mu\text{g Hg/g}$ en los extremos anteriores, y un valor más alto en los extremos posteriores (228.35 $\mu\text{g Hg/g}$).

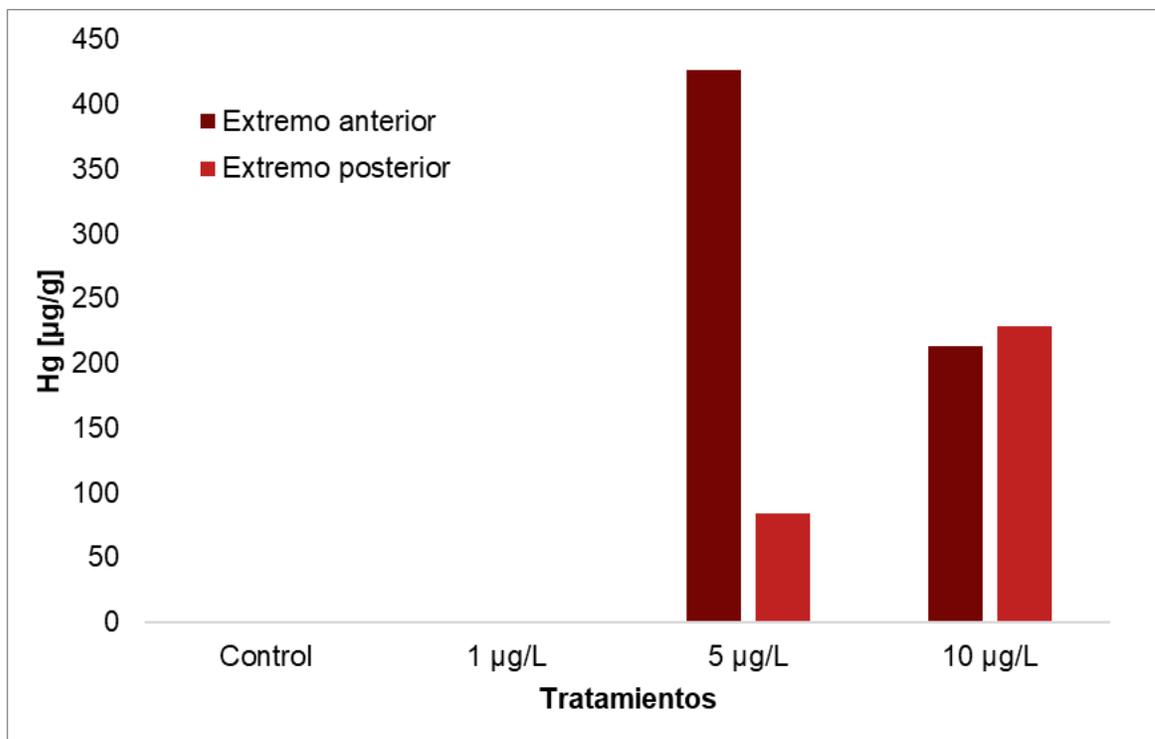


Figura 29. Concentración de Hg en los fragmentos anteriores y posteriores preexistentes de *Eurythoe* sp. A. Control después de 42 d, 1 µg Hg/L después de 52 (posterior) y 55 d (anterior); 5 µg Hg/L después de 74 (posterior) y 77 d (anterior); 10 µg Hg/L después de 71 d de exposición.

Debido a la baja supervivencia durante el experimento, los ejemplares de *Eurythoe* sp. A. expuestos a Hg y los controles no contaban con tejido regenerado suficiente para realizar los análisis de la misma forma que con los ejemplares del experimento de As. Sin embargo, se pudo hacer lecturas de los extremos anteriores y posteriores preexistentes.

8. Discusión

8.1. Alteraciones morfológicas y supervivencia

Las concentraciones de As utilizadas en este experimento permitieron la supervivencia de todos los organismos expuestos de *Eurythoe* sp. A. También existen registros del 100% de supervivencia de *Arenicola marina* durante una exposición de 12 d a concentraciones de 50 y 100 µg As/L (Geiszinger *et al.*, 2002a). Por otro lado, se ha visto que *Diopatra neapolitana* tiene una tolerancia más baja a concentraciones nominales de 50 y 100 µg As/L, después de

un evento de amputación, ya que el 33.3% de los organismos del experimento de Coppola *et al.* (2016) no sobrevivieron a estas condiciones. Las diferencias observadas entre ambas especies, y el hecho de que los organismos de *Eurythoe* sp. A tuvieron una supervivencia del 100% en todos los tratamientos con As, a pesar de estar en proceso de regeneración de ambos extremos del cuerpo, sugieren que es una especie con una tolerancia alta a la exposición a As.

La aparente falta de segmentación en el centro de algunos segmentos posteriores regenerados podría atribuirse a una alteración de la regeneración muscular. Los músculos principales en *Eurythoe* son el longitudinal, que está formado por fibras que suelen encontrarse en manojos, y uno transversal que se encuentra por debajo de la epidermis y es continuo, por lo que normalmente cubre de parápodo a parápodo (Weidhase *et al.*, 2016). Además de la proliferación celular característica del proceso de regeneración (Özpolat y Bely, 2016), podría existir un estímulo provocado por el As (Chowdhury *et al.*, 2010). Por tal motivo, es posible que en una etapa inicial del proceso de regeneración haya ocurrido una alteración en el crecimiento del músculo longitudinal, lo que provocaría alteraciones morfológicas como el ensanchamiento de los segmentos, en el sistema circulatorio y en la dermis de *Eurythoe* sp. A.

El cambio de color en los extremos regenerados y preexistentes de los organismos expuestos a Hg fue diferente en comparación con los expuestos a As. Mientras los del experimento con As adquirieron colores iguales tanto en el tejido regenerado como en el tejido original, los organismos expuestos a Hg mantuvieron un tono más claro en la parte recién regenerada y un color gris en el tejido original antes de morir.

Los cambios de coloración y textura, así como la eversión de la faringe en *Eurythoe* por exposición a Hg ya se han observado después de seis días de exposición a concentraciones mayores que 100 µg Hg/L en organismos completos (Méndez *et al.*, 2009). Parece que, durante la regeneración, este proceso se acelera ya que en ejemplares expuestos a 10 µg Hg/L la piel adquirió las mismas características, a pesar de estar en una concentración previamente establecida como subletal para la especie (Vázquez-Núñez, 2007). Este proceso se ha observado en otras especies de espiónidos y ofélidos con concentraciones menores en sedimento (1.67 ± 0.07 a 6.38 ± 0.15 µg Hg/kg) (Sola *et al.*, 2022). Por lo tanto, se puede

asumir que las malformaciones observadas en *Eurythoe* sp. A durante el experimento de exposición a Hg son consecuencia de la exposición al elemento.

Las concentraciones utilizadas por Méndez *et al.* (2009) están por encima de las utilizadas en este trabajo; además, aquellos experimentos tuvieron una duración menor (10 d) y no evaluaron regeneración, por lo que los efectos observados son consecuencia de una toxicidad aguda por Hg. En cambio, en este estudio, el tiempo de exposición al elemento fue siete veces mayor, por lo que los efectos observados se acercan más a una exposición crónica. Sumado a esto, el estrés provocado por la amputación y el gasto energético que implica llevar a cabo el proceso de regeneración (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014), y estimular los mecanismos de defensa, como se ha registrado previamente en *Hediste diversicolor* (Freitas *et al.*, 2017), podrían hacer más susceptible a *Eurythoe* sp. A a presentar mayores efectos en concentraciones más bajas de Hg.

Durante ambos experimentos, se utilizó la misma agua marina para preparar las soluciones en todos los recambios para reducir las variaciones entre estos. También se mantuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura, suministro de aire e iluminación. La única diferencia entre ambos grupos control de cada experimento fue el tiempo de aclimatación de los ejemplares. Mientras los ejemplares que fueron expuestos a As estuvieron 14 días en periodo de aclimatación, los ejemplares que se utilizaron para el experimento con Hg tuvieron un periodo de 21 días. Esta diferencia en los periodos de aclimatación provocó un cambio en la dieta de los organismos, ya que conforme transcurrieron los días, la cantidad de algas disponibles fue menor, y a pesar de que la dieta de *Eurythoe* es omnívora, puede tener una preferencia por algas (Engel *et al.*, 2023). Los cambios en la disponibilidad de algas también implicaron que los ejemplares del experimento con Hg tuvieran una dieta menos variada que los ejemplares utilizados en el experimento de As. De acuerdo con los resultados obtenidos por Pesch y Schauer (1988), una dieta basada en macroalgas contribuye a que juveniles de *Neanthes arenaceodentata* tengan una supervivencia mayor que aquellos con una dieta basada en hojuelas de camarón. Sin embargo, la combinación de ambos alimentos contribuye a que exista un crecimiento mayor que cuando los ejemplares se alimentan exclusivamente de un solo alimento. Es posible que la reducción en nutrientes disponibles para los ejemplares de *Eurythoe* sp. A utilizados en el experimento de Hg, intervino en la supervivencia de los

ejemplares del grupo control. Tampoco hay que descartar la posibilidad de que este mismo factor haya influido en la poca supervivencia de los ejemplares expuestos a diferentes concentraciones de Hg (especialmente los expuestos a 1µg Hg/L), además de los efectos provocados por dicho elemento.

8.2. Fase 1: Formación del blastema, del prostomio y la yema posterior

La exposición a los EPTs no parece tener un efecto en la aparición del blastema, ya que se observó el patrón similar a lo descrito en condiciones naturales de regeneración, tanto para la misma especie (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014), como para otras, como *Capitella teleta* y el oligoqueto *Pristina leidy* (de Jong y Seaver, 2016; del Olmo *et al.*, 2022). Del mismo modo, la formación de apéndices cefálicos tampoco se vio perjudicada por la exposición a los EPTs ya que el desarrollo de estas estructuras fue del mismo orden de magnitud que los registrados por Yáñez-Rivera y Méndez (2014), por lo que no hay evidencia suficiente para asumir que existió un efecto del As ni del Hg durante estas etapas del proceso de regeneración.

Así mismo, tampoco se presentaron afectaciones durante la primera fase de la regeneración posterior por la exposición a los EPTs, ya que el inicio en ambos experimentos fue igual a lo descrito por Yáñez-Rivera y Méndez (2014). El tejido indiferenciado de color rosado que cubría la herida estuvo presente en todos los fragmentos y no hubo variaciones de tiempo importantes entre tratamientos. A partir del día 16 al 20, este tejido se tornó rojo y se mantuvo así por varios días y entre los días 20 y 31 se comenzaron a observar las yemas en prácticamente todos los fragmentos. Según Yáñez-Rivera y Méndez (2014) estos cambios fueron evidentes entre los días 20 y 32. Tampoco hubo afectaciones durante la aparición de la yema posterior, ya que los tiempos observados durante la exposición a As y Hg también coinciden con lo observado por Yáñez-Rivera y Méndez (2014).

Contrario a lo observado durante la exposición de *Eurythoe* sp. A a As, en *D. neapolitana*, existe un retraso en la etapa de cicatrización y formación de blastema al estar expuesto a 250 µg As/L (Coppola *et al.*, 2016). Estas diferencias pueden ser un indicio de diferentes

mecanismos de depuración por parte de ambas especies que les permite tener umbrales de tolerancia distintos entre ellas.

Se sabe que el proceso de regeneración anterior de *E. complanata sensu lato* está influenciado por el sistema nervioso (Müller y Berenzen, 2003). A pesar del efecto neurotóxico del Hg registrado por Moltedo *et al.* (2019) en el poliqueto *Hediste diversicolor*, el tiempo de exposición transcurrido entre la amputación y el desarrollo completo del prostomio, aparentemente no fue suficiente para observar anomalías externas de dicho efecto.

Los resultados encontrados durante la exposición a As y Hg durante la primera fase difieren de los descritos para *E. complanata sensu lato* por exposición a Cu (Zapata-Vívenes *et al.*, 2005) y a aceite de automóvil (Nuseti *et al.*, 2005), donde existe una reducción en la capacidad de cerrar la herida y un retraso en el periodo de cicatrización. Estas diferencias podrían atribuirse a que los mecanismos de acción de los EPTs son diferentes. El Cu es un elemento esencial que en dosis altas es tóxico para los organismos (Chiarelli y Roccheri, 2014). Por lo tanto, existen mecanismos que regulan la homeostasis de este elemento sin provocar daño celular, pero cuando hay un exceso de este elemento en el organismo, estos mecanismos son insuficientes para prevenir afectaciones (Gaetke *et al.*, 2014). En cambio, el aceite para automóvil es una mezcla de productos orgánicos e inorgánicos, y de elementos esenciales y no esenciales, que activan diferentes mecanismos antioxidantes y tienen un efecto negativo en el sistema inmune (Nuseti *et al.*, 2005).

Por otro lado, los mecanismos del As en poliquetos parecen variar según la especie y las características intrínsecas de los individuos (edad, talla, sexo, dieta), pero en la mayoría de los casos, el As se presenta en forma de arsenobetaína (Waring y Maher, 2005). La arsenobetaína es una de las formas menos tóxicas del As, que al no ser metabolizada es excretada de esta forma (Tao y Bolger, 2014). También existen especies que presentan mecanismos asociados a metalotioneínas como *A. marina* y *D. neapolitana* para la desintoxicación por As (Casado-Martínez *et al.*, 2012; Coppola *et al.*, 2016).

Los mecanismos de defensa ante el Hg descritos en poliquetos son principalmente asociados a estrés oxidativo debido a la alta afinidad del elemento por los grupos sulfhidrilos que se encuentran en varios agentes antioxidantes (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2017; Freitas *et al.*,

2017). Sumado a esto, no existen trabajos previos sobre los efectos del Hg en la regeneración de anélidos. Sin embargo, se sabe que el metilmercurio provoca un retraso en la regeneración de planarias (Medvedev y Komov, 2005). *E. complanata sensu lato* cuenta con mecanismos asociados a metalotioneínas para la desintoxicación por Cu y Zn (Marcano *et al.*, 1996), por lo que es posible que cuente con mecanismos similares para la desintoxicación por As y Hg.

8.3. Fase 2: Formación de segmentos

La tasa de formación de segmentos anteriores de los grupos control de ambos experimentos fue menor que un segmento por día. Yáñez-Rivera y Méndez (2014) registraron que la formación de segmentos anteriores en *Eurythoe* es de un segmento por día bajo condiciones similares a las naturales (con salinidad de 34 ups y una capa de arena del sitio de muestreo que reducía el estrés en los organismos y con un sistema de agua corriente que impedía el estancamiento de ésta). Las diferencias experimentales en ambos estudios (agua corriente y falta de sedimento en los acuarios experimentales), pueden ser el motivo de la reducción en el número de segmentos diarios en ambos experimentos.

La tasa de formación de segmentos posteriores fue menor que la tasa de regeneración de segmentos anteriores en ambos experimentos, igual a lo descrito por Kudenov (1974). Esto puede atribuirse al número limitado de segmentos que *E. complanata sensu lato* tiende a regenerar en la región anterior (entre 12 y 16 segmentos) y la necesidad de regenerar los apéndices sensoriales necesarios para conseguir alimento (Kudenov, 1974). De acuerdo con Yáñez-Rivera y Méndez (2014) la falta de un patrón evidente en la formación de segmentos posteriores puede atribuirse a características individuales de cada gusano, como el metabolismo, edad, estado de salud, o incluso al estrés provocado por la falta de alimento, que no suele presentarse en condiciones naturales, pues son omnívoros.

Varios mecanismos están involucrados en la regeneración de *E. complanata sensu lato*, entre los cuales participan los procesos oxidativos (Zapata-Vívenes *et al.*, 2017). Durante el inicio de la exposición a As, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) aumenta, y con ello crece la respuesta oxidativa con la finalidad de eliminar las EROs (Byeon *et al.*, 2021). Un ejemplo de lo anterior es descrito por Ventura-Lima *et al.* (2007), quienes

encontraron que en *Laeonereis acuta* existe un incremento de actividad antioxidante después de dos días de exposición a 50 µg As/L, con tendencia a regresar a los valores naturales después de siete días. Es posible que *Eurythoe* sp. A tenga una respuesta similar, ya que no se encontraron diferencias significativas con el grupo control al término del experimento en ninguno de los extremos regenerados. Debido a la actividad constante de los agentes antioxidantes, puede ocurrir una fase de restauración de varias funciones fisiológicas después de un tiempo (Byeon *et al.*, 2021), lo que podría permitir llevar a cabo la regeneración sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Esto también podría explicar porque los ejemplares con regeneración posterior expuestos a 100 µg As/L incrementaron la incorporación de segmentos después de 60 d de exposición, además en este tiempo ya recibían alimento, lo cual también puede influir durante esta etapa del proceso (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014). En cambio, estos mecanismos de respuestas antioxidante podrían haber sido insuficientes en los ejemplares con regeneración anterior expuestos a 100 y 250 µg As/L, ya que existió un retraso significativo en la incorporación de segmentos. Esto último coincide con la reducción en la tasa de formación de segmentos posteriores en *D. neapolitana* expuestos a 250 µg As/L, donde se observó daño celular asociado a los agentes antioxidantes (Coppola *et al.*, 2016).

El Hg produce una disminución en la capacidad antioxidante debido a la inhibición de enzimas involucradas en el mecanismo en *Perinereis gualpensis* (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2017) y una insuficiencia en *H. diversicolor* (Freitas *et al.*, 2017), lo que eventualmente provocaría daños a nivel celular. Estos mecanismos podrían ser responsables de la reducción en el número de segmentos observada en *Eurythoe* sp. A por la exposición a Hg.

El tiempo de exposición y la concentración de los EPTs influyen en la tasa de formación de segmentos anteriores y posteriores de *Eurythoe* sp. A, como se vio durante la exposición a As y Hg, así como a aceite para automóviles (Nusetti *et al.*, 2005). A pesar de la tendencia observada en esta fase, las características inherentes de los organismos influyeron en los resultados obtenidos durante la exposición a As y Hg (Waring y Maher, 2005), como se pudo apreciar en la variabilidad que hubo a lo largo de los experimentos.

8.4. Fase 3: Crecimiento de los extremos regenerados

Los segmentos regenerados en *Eurythoe* sp. A tuvieron un mayor crecimiento relacionado con la concentración de As. Es decir, los gusanos expuestos a las concentraciones más altas de As mostraron un aumento de tamaño mayor que los controles y los del tratamiento de 50 µg As/L. Contrario a lo encontrado en el onúfido *D. neapolitana*, donde encontraron una reducción de tamaño, pero valores elevados de glucógeno y proteína en la concentración más elevada de As. Esto podría deberse a una reducción del metabolismo en concentraciones altas de As para conservar las reservas de energía como mecanismo de defensa (Coppola *et al.*, 2016). Es probable que *Eurythoe* sp. A tenga una respuesta similar durante la fase de formación de segmentos, ya que las diferencias de tamaño entre tratamientos fueron evidentes después de que comenzaron a recibir alimento. Durante la fase de crecimiento, los organismos de *Eurythoe* sp. A expuestos a las concentraciones más altas de As se mostraron más activos y solían alimentarse más rápido que los controles y los de la concentración más baja. Se ha visto que un efecto a largo plazo después de una exposición crónica de hipoxia en *Hermodice carunculata*, puede provocar un incremento en la ingesta de alimento (Grimes *et al.*, 2020). Esto fue más evidente en los ejemplares con regeneración posterior, los cuales eran más grandes que sus contrapartes con regeneración anterior al finalizar el experimento. Esto último podría ser en consecuencia de que, al tener un prostomio preexistente, los ejemplares con regeneración posterior eran capaces de capturar una cantidad mayor de alimento que los ejemplares con el prostomio recién regenerado.

El incremento de volumen en las regiones regeneradas de los organismos expuestos a 5 y 10 µg Hg/L fue bajo. La exposición a Hg puede inducir una aceleración en el metabolismo en *H. diversicolor* por la activación de los mecanismos de defensa, acompañada de una disminución en sus reservas de energía (Freitas *et al.*, 2017). Sumado a esto, la regeneración en *Eurythoe* conlleva una demanda energética importante (Yáñez-Rivera y Méndez, 2014), por lo que es de esperar un crecimiento lento en los organismos expuestos.

8.5. Conducta

Se observaron comportamientos distintos de *Eurythoe* sp. A durante ambos experimentos. Los organismos expuestos a As se mostraron más activos en las concentraciones más altas y

se alimentaron de manera normal. Estos resultados son contradictorios al comportamiento observado en *A. marina* y *H. diversicolor* después de una exposición de ocho y 21 d a As, respectivamente (Casado-Martínez *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2022). Ambas especies tienden a reducir su movilidad, y *H. diversicolor* disminuye la velocidad de alimentación por la exposición a 250 µg As/L (Valente *et al.*, 2022). Algunos anfípodos y copépodos tienen un incremento en la actividad locomotora por la exposición a diferentes EPTs (Sornom *et al.*, 2012; Michalec *et al.*, 2013), así como algunos anélidos terrestres tienen una tendencia a evitar sedimentos contaminados (García *et al.*, 2008; Tenório-Nunes y Gaeta-Espíndola, 2012). Este comportamiento podría ser un mecanismo de defensa para evitar o reducir la exposición a agentes tóxicos ya que suelen ser respuestas tempranas a la exposición. En otros invertebrados, como el camarón *Litopenaeus vannamei* también existe un incremento de la actividad locomotora asociado a cambios en la actividad de la acetilcolinesterasa por una exposición de 24 h a pesticidas (García-de la Parra *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay resultados similares por exposición crónica, como los observados en *Eurythoe* sp. A por la exposición a As. Se conoce un comportamiento parecido en el pez cebra (*Danio reiro*) en el que la exposición a concentraciones bajas de As incrementa la actividad locomotora, pero los mecanismos asociados a este efecto son poco conocidos y han sido estudiados principalmente en vertebrados (Dipp *et al.*, 2018).

Por otro lado, el comportamiento de *Eurythoe* sp. A durante la exposición a Hg es concordante con los observados en *P. gualpensis*, quien tiene una reducción en el enterramiento por la exposición a Hg (Díaz-Jaramillo *et al.*, 2013). Lo mismo ocurre con *N. diversicolor* por la exposición a Cu, probablemente por cambios metabólicos y fisiológicos producidos por la exposición (Bonnard *et al.*, 2009). En *Eurythoe* sp. A no se hicieron observaciones relacionadas al enterramiento de los organismos; sin embargo, se observó una aletargamiento y enroscamiento que podrían ser provocado por la exposición a Hg.

8.6. As en *Eurythoe* sp. A

La acumulación de As en *Eurythoe* sp. A fue dependiente de la concentración en solución: es decir, a mayor concentración en solución, la acumulación en tejidos fue mayor. Esto era

de esperarse, ya que esta respuesta también se ha observado en otras especies de poliquetos (Geiszinger *et al.*, 2002a; Geiszinger *et al.*, 2002b; Coppola *et al.*, 2016).

Los poliquetos tienen la capacidad de bioacumular As. En los tratamientos control (sin As añadido), de diferentes experimentos se han detectado valores desde 0.009 $\mu\text{g As/g}$ (*D. neapolitana*, después de dos meses de aclimatación; Coppola *et al.*, 2016) hasta 16 $\mu\text{g As/g}$ (*N. virens* y *N. diversicolor* después de dos días de aclimatación; Geiszinger *et al.*, 2002b). Por lo que lo encontrado en *Eurythoe* sp. A se ubica dentro de lo esperado para organismos provenientes de vida libre después de un periodo de aclimatación. En escenarios de exposición de 50 y 100 $\mu\text{g As/L}$ se han registrado valores $>100 \mu\text{g As/g}$ (Geiszinger *et al.*, 2002). Estos resultados superan a los valores encontrados en *Eurythoe* sp. A expuesto a las mismas concentraciones.

Se observó un incremento en la concentración de As en los extremos anteriores regenerados, en comparación con los extremos preexistentes. Esto concuerda con algunos antecedentes en las especies *A. marioni*, *N. virens* y *N. diversicolor*, donde se encontraron valores más altos en las estructuras regeneradas del prostomio (Gibbs *et al.*, 1983; Geiszinger *et al.*, 2002b), así como en la corona branquial regenerada de *S. spallanzanii* (Fattorini y Regoli, 2004). Estos resultados sugieren una movilización del elemento hacia el extremo anterior regenerado, en los que suelen encontrarse un mayor número de estructuras como los palpos, antenas y la carúncula; en comparación con el pigidio que no cuenta con estructuras adicionales.

Por otro lado, los extremos posteriores preexistentes acumularon las concentraciones más altas de As en todos los tratamientos. Tal vez porque en estos extremos hay más intestino que en los extremos anteriores. Algo similar ocurrió con *N. virens*, donde se encontró la concentración más alta de As en el intestino en comparación con el resto del cuerpo (Geiszinger *et al.*, 2002b). Así mismo, estos organismos capturaban más alimento durante la fase de crecimiento debido a que el tamaño de la faringe preexistente era notoriamente más grande que las regeneradas, por lo que es posible que la movilización de As hacia el intestino haya sido mayor en estos organismos que en los que regeneraron el extremo anterior.

La absorción de As en el transcurso del tiempo pudo no haber sido constante, ya que los primeros 42 días (fase 1 y 2) el decremento de As en solución fue mayor, lo cual explicaría el retraso en la formación de segmentos anteriores y posteriores por exposición a As. La acumulación de Cu en *E. complanata sensu lato* incrementa con el tiempo durante siete días de exposición (Nusseti *et al.*, 2001). Esta respuesta parece similar con el As, al menos durante los primeros días de exposición, ya que la absorción parece reducirse a partir del día 56 (fase 3). Esta reducción podría ser porque la especie alcanza la estabilidad después de este tiempo, como ocurre con la acumulación de Hg en *H. Diversicolor* (Cardoso *et al.*, 2009).

8.7. Hg en *Eurythoe* sp. A

El Hg acumulado por *Eurythoe* sp. A tras la exposición de más de 50 y 70 días en soluciones de 1 a 10 $\mu\text{g Hg/L}$, es mucho mayor al observado previamente por Vázquez-Núñez *et al.* (2007) en soluciones de 1.5 a 11 $\mu\text{g Hg/L}$ durante ocho días. Por otro lado, *H. diversicolor* es capaz de acumular hasta 217.09 $\mu\text{g Hg/}$ después de 28 d de exposición a 10 $\mu\text{g Hg/L}$ (Molledo *et al.*, 2019), valores muy cercanos a los registrados en cada uno de los extremos de *Eurythoe* sp. A expuesto a la misma concentración durante el proceso de regeneración. Esto se atribuye a que la acumulación de Hg en tejido incrementa con el tiempo de exposición (Cardoso *et al.*, 2009; Díaz-Jaramillo *et al.*, 2017), lo cual se confirmó al comparar los resultados obtenidos con *Eurythoe* después de ocho días de exposición (Vázquez Núñez *et al.*, 2007).

En los fragmentos posteriores se observó que la acumulación del elemento por parte de los organismos es dependiente de la concentración del elemento en solución, similar a lo registrado previamente por Vázquez-Núñez *et al.* (2007). Así mismo, la acumulación de Hg en los fragmentos anteriores y posteriores expuestos a 1 y 10 $\mu\text{g Hg/L}$ fue equitativa, lo cual ha sido previamente registrado en otras especies de poliquetos en ambientes contaminados con Hg (Sola *et al.*, 2020). Sin embargo, los fragmentos anteriores expuestos a 5 $\mu\text{g Hg/L}$ que acumularon cinco veces más que los fragmentos posteriores de la misma solución y el doble que los fragmentos anteriores expuestos a 10 $\mu\text{g Hg/L}$, posiblemente porque estuvieron expuestos durante tres y seis días más. Por lo tanto, es posible que la acumulación de Hg en

tejido de *Eurythoe* sp. A esté principalmente influenciada por la concentración y el tiempo de exposición.

La elevada acumulación de Hg en *Eurythoe* sp. A podría ser la causa de los niveles bajos del elemento en solución. Después de ocho días de exposición en 11 µg Hg/L, *Eurythoe* es capaz de acumular hasta el 100% del Hg en solución, aunque en concentraciones más bajas es posible que una porción importante se volatilice y una fracción pequeña se adhiera a las paredes de los acuarios (Vázquez-Núñez *et al.*, 2007).

9. Conclusiones

Las concentraciones de As analizadas son subletales para *Eurythoe* sp. A, incluso con el daño producido por la amputación. Sin embargo, las concentraciones de Hg, que son consideradas subletales en organismos completos, podrían ser letales cuando se presenta un proceso de regeneración.

Se confirma que *Eurythoe* sp. A tiene una capacidad regenerativa alta, ya que es capaz de regenerar completamente ambos extremos del cuerpo durante la exposición a As, aunque con un retraso en la segunda fase del proceso. En cambio, esto no ocurrió durante la exposición a Hg, ya que los organismos sólo fueron capaces de concluir con la formación de segmentos. Con estos resultados se confirma el efecto tóxico de ambos EPTs.

Se presentaron malformaciones atribuibles al As y al Hg. Las lesiones observadas en los organismos expuestos a Hg coinciden con lo observado en estudios previos con este elemento.

Las diferencias en el volumen de los organismos expuestos a As indican posibles alteraciones metabólicas ocasionadas por la combinación del alimento y el EPT.

El gusano de fuego *Eurythoe* sp. A tiene una capacidad alta para acumular As y Hg, principalmente en el extremo posterior, así como en el extremo anterior regenerado en caso del As.

Es posible que el género *Eurythoe* se profile como biomonitor debido a su abundancia, disponibilidad a lo largo del año, muestreo y mantenimiento sencillos, así como su capacidad de acumular niveles altos de EPTs. También representa un excelente modelo para estudios de procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con regeneración y toxicidad.

10. Literatura citada

- Ahmed, A., Belal, A.A.M. (2019). Macro-benthic invertebrates as a bio-indicator for water and sediment quality in Suez Bay, Red Sea. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45(2): 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.03.003>.
- Ahrens, J.B., Kudenov, J.D., Marshall, C. D., Schulze, A. (2014). Regeneration of posterior segments and terminal structures in the bearded fireworm *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae). *Journal of Morphology*, 275(10): 1103-1112. <https://doi.org/10.1002/jmor.20287>.
- Ali, H., Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs: Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25(6): 1353-1376. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>.
- ASTM (2022). Standard guide for conducting acute, chronic, and life-cycle aquatic toxicity tests with polychaetous annelids (ASTM- E 1562-22). <https://www.astm.org/e1562-22.html>.
- Barroso, R., Klautau, M., Solé-Cava, A.M., Paiva, P.C. (2010). *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomida), the ‘cosmopolitan’ fireworm, consist of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157: 69-80. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1296-9>.
- Bely, A.E. (2006). Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integrative and Comparative Biology*, 46(4): 508-518. <https://doi.org/10.1093/icb/icj051>.
- Berke, S.H., Cruz, V., Osman, R.W. (2009). Sublethal predation and regeneration in two onuphid polychaetes: patterns and implications. *The Biological Bulletin*, 217(3): 242–252. <https://doi.org/10.1086/bblv217n3p242>.
- Bindra, S. S. (1927). A study of the genus *Eurythoe* (family Amphinomidae). *Fauna of Karachi, Memories of the Department of Zoology, Punjab University, 1*: 1-18.
- Bonnard, M., Romeo, M., Amiard-Triquet, C. (2009). Effects of copper on the burrowing behavior of estuarine and coastal invertebrates, the polychaete *Nereis diversicolor* and the bivalve *Scrobicularia plana*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 15(1): 11-26. <https://doi.org/10.1080/10807030802614934>.
- Brusca, R.C., Moore, W., Shuster, S.M. (2016). *Invertebrates*. Tercera edición. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 1104 pp.
- Byeon, E., Kang, H.M., Yoon, C., Lee, J.S. (2021). Toxicity mechanisms of arsenic compounds in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 237, 105901. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105901>.

- Cardoso, P.G., Lillebø, A.I., Pereira, E., Duarte, A.C., Pardal, M.A. (2009). Different mercury bioaccumulation kinetics by two macrobenthic species: The bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Environmental Research*, 68(1): 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.03.006>.
- Casado-Martínez, M.C., Duncan, E., Smith, B.D., Maher, W.A., Rainbow, P.S. (2012). Arsenic toxicity in a sediment-dwelling polychaete: detoxification and arsenic metabolism. *Ecotoxicology*, 21(2): 576-590. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0818-7>.
- Chatterjee, S., Moogoui, R., Gupta, D.K. (2017). Arsenic: source, occurrence, cycle, and detection. In: Gupta, D.K., Chatterjee, S. (Eds.). *Arsenic contamination in the environment* (pp. 13-35) Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54356-7_2.
- Chiarelli, R., Roccheri, M.C. (2014). Marine invertebrates as bioindicators of heavy metal pollution. *Open Journal of Metal*, 4(4): 93-106. <https://doi.org/10.4236/ojmetal.2014.44011>.
- Chowdhury, R., Chatterjee, R., Giri, A.K., Mandal, C., Chaudhuri, K. (2010). Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, *Erk* signaling and *CyclinA* expression. *Toxicology Letters*, 198(2): 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.006>.
- Coppola, F., Pires, A., Velez, C., Soares, A.M., Pereira, E., Figueira, E., Freitas, R. (2016). Biochemical and physiological alterations induced in *Diopatra neapolitana* after a long-term exposure to Arsenic. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 189: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.06.006>.
- David, A. A., Williams, J.D. (2012). Asexual reproduction and anterior regeneration under high and low temperatures in the sponge associate *Polydora colonia* (Polychaeta: Spionidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 56(4): 315-324. <https://doi.org/10.1080/07924259.2011.638404>.
- Dean, H.K. (2008). The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Revista de Biología Tropical*, 56(4): 11-38.
- de Jong D.M., Seaver E.C. (2016) A Stable Thoracic Hox Code and Epimorphosis Characterize Posterior Regeneration in *Capitella teleta*. *PLoS ONE*, 11(2): e0149724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149724>
- del Olmo, I., Verdes, A., & Álvarez-Campos, P. (2022). Distinct patterns of gene expression during regeneration and asexual reproduction in the annelid *Pristina leidyi*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23143>.

- Diario Oficial de la Federación. (2022). *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales*. (DOF) 11 de marzo de 2022. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5645374&fecha=11/03/2022.
- Díaz-Jaramillo, M., da Rocha, A.M., Chiang, G., Buchwalter, D., Monserrat, J.M, Barra, R. (2013). Biochemical and behavioral responses in the estuarine polychaete *Perinereis gualpensis* (Nereididae) after *in situ* exposure to polluted sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89: 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.026>.
- Díaz-Jaramillo, M., Miglioranza, K.S., Carriquiriborde, P., Marino, D., Pegoraro, C.N., Valenzuela, G., Barra, R. (2017). Sublethal effects in *Perinereis gualpensis* (Polychaeta: Nereididae) exposed to mercury-pyrene sediment mixture observed in a multipolluted estuary. *Ecotoxicology*, 26(6): 792-801. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1810-7>.
- Dipp, V.R., Valles, S., Ortiz-Kerbertt, H., Suarez, J.V., Bardullas, U. (2018). Neurobehavioral alterations in zebrafish due to long-term exposure to low doses of inorganic arsenic. *Zebrafish*, 15(6): 575-585. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1627>.
- Engel, N., Aguado, M.T., Maraun, M. (2023). Trophic ecology of three marine polychaete species: Evidence from laboratory experiments using stable isotopes (^{15}N , ^{13}C), fatty acid (NFLA) analyses, and C and N stoichiometry. *Marine Environmental Research*, 185: 105878. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105878>.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2021). *National Recommended Water Quality Criteria. Aquatic Life Criteria Table*. (EPA). <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>.
- Fattorini, D., Regoli, F. (2004). Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(8): 1881-1887. <https://doi.org/10.1897/03-562>.
- Fauchald K., (1977) Polychaetes from intertidal areas in Panama, with a review of previous shallow-water records. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 221: 1-81. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.221>
- Fauchald, K., Jumars, P.A. (1979). The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 17: 193-284.
- Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Amado, L.L., Geracitano, L.A., Rebelo, M., Bianchini, A., Monserrat, J.M. (2009). Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2): 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.07.003>.

- Freitas, R., de Marchi, L., Moreira, A., Pestana, J.L., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M. (2017). Physiological and biochemical impacts induced by mercury pollution and seawater acidification in *Hediste diversicolor*. *Science of the Total Environment*, 595: 691-701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.005>.
- Freitas, R., Pires, A., Velez, C., Almeida, Â., Wrona, F.J., Soares, A.M., & Figueira, E. (2015). The effects of salinity changes on the Polychaete *Diopatra neapolitana*: impacts on regenerative capacity and biochemical markers. *Aquatic Toxicology*, 163: 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.006>.
- Gaetke, L.M., Chow-Johnson, H.S., Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*. 88(11): 1929-1938. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>.
- Garcia, M., Römbke, J., de Brito, M.T., Scheffczyk, A. (2008). Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, 153(2): 450-456. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.007>.
- García-de la Parra, L.M., Bautista-Covarrubias, J.C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-Lozano, M., Guilhermino, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(3): 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.09.001>.
- Geislinger, A.E., Goessler, W., Francesconi, K. A. (2002a). The marine polychaete *Arenicola marina*: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater. *Marine Environmental Research*, 53(1): 37-50. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(01\)00106-4](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(01)00106-4).
- Geislinger, A. E., Goessler, W., Francesconi, K. A. (2002b). Biotransformation of arsenate to the tetramethylarsonium ion in the marine polychaetes *Nereis diversicolor* and *Nereis virens*. *Environmental Science & Technology*, 36(13): 2905-2910. <https://doi.org/10.1021/es015808d>.
- Gibbs, P.E., Langston, W.J., Burt, G.R., Pascoe, P.L. (1983). *Tharyx marioni* (Polychaeta): A remarkable accumulator of arsenic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 63(2): 313-325. <https://doi.org/10.1017/s0025315400070703>.
- Glasby, C.J., Hutchings, P.A., Fauchald, K., Paxton, H., Rouse, G.W., Watson-Russell, C., Wilson, R.S. (2000). Class Polychaeta. In: Beesley, P.L., Ross, G.J., Glasby, C.J. (Eds.), *Polychaetes & allies: the southern synthesis*. Vol. 4. (pp. 1-271) CSIRO publishing.

- Grimes, C.J., Capps, C., Petersen, L.H., Schulze, A. (2020). Oxygen consumption during and post-hypoxia exposure in bearded fireworms (Annelida: Amphinomidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 190(6): 681-689. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01308-y>.
- Harris, L.H., de León-González, J.A., Salazar-Vallejo, S.I. (2021). Morfología, métodos, clave para familias y clasificación. In: de León-González, J.A., Bastida-Zavala, J.R., Carrera-Parra, L.F., García-Garza, M.E., Salazar-Vallejo, S.I., Solís-Weiss, V., Tovar-Hernández, M.A. (Eds.). *Anélidos marinos de México y América tropical*. (pp:9-49). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Jonathan, M.P., Roy, P.D., Thangadurai, N., Srinivasalu, S., Rodríguez-Espinosa, P.F. Sarkar, P.F., Lakshumanan. C., Navarrete-López M., Muñoz-Sevilla, N.P. (2011). Metal concentrations in water and sediments from tourist beaches of Acapulco, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 62(4): 845-850. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.042>.
- Kalia, K., Khambholja, D. B. (2015). Arsenic contents and its biotransformation in the marine environment. In *Handbook of Arsenic Toxicology*. In: Handbook of arsenic toxicology. Academic Press. (pp. 675-700). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418688-0.00028-9>.
- Kaur, S., Kamli, M.R., Ali, A. (2011). Role of arsenic and its resistance in nature. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(10): 769-774. <https://doi.org/10.1139/w11-062>.
- Khan, M.U., Nazim, K., Ahmed, M. (2017). Metal bioavailability; toxicity in sediments and accumulation in fireworm *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766) (Polychaeta: Amphinomidae) from Buleji Karachi, Pakistan. *Fuuast Journal of Biology*, 7(2): 171-176.
- Komar, D., Dolenc, M., Dolenc, T., Vrhovnik, P., Lojen, S., Kniewald, G., Matešić, S.S. Lambaša Belak, Ž., Orlando-Bonaca, M. (2017). Benthic organisms as ecological indicators for the status assessment of coastal ecosystems. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(8): 1907-1917. <https://doi.org/10.1017/s0025315417001527>.
- Kozin, V.V., Kostyuchenko, R.P. (2015). *Vasa*, *PL10*, and *Piwi* gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens*. *Development Genes and Evolution*, 225(3): 129–138. <https://doi.org/10.1007/s00427-015-0496-1>.
- Kudenov, J.D. (1974). The Reproductive Biology of *Eurythoe complanata* (Pallas, 1766), (Polychaeta: Amphinomidae). [Ph. D. Thesis]. University of Arizona, (128 pp.)
- Madrid, L. (2010). “Heavy metals”: reminding a long-stand and sometimes forgotten controversy. *Geoderm*, 155(1-2): 128-129. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.11.031>.
- Marcano, L., Nusetti, O., Rodríguez-Grau, J., Vilas, J. (1996). Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 114(3): 179–184. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(96\)00016-3](https://doi.org/10.1016/0742-8413(96)00016-3).

- Medvedev, I.V., Komov, V.T. (2005). Regeneration of freshwater planarians *Dugesia tigrina* and *Polycelis tenuis* under the influence of methyl mercury compounds of natural origin. *Russian Journal of Developmental Biology*, 36(1): 29-33. <https://doi.org/10.1007/s11174-005-0005-y>.
- Méndez, N., Green-Ruiz, C., Vázquez-Nuñez, R. (2009). Mortality and abnormalities observed after experimental Hg exposure in the polychaete *Eurythoe complanata* (Pallas) from Mazatlán, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(4): 488-492. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9820-7>.
- Méndez, N., Linke-Gamenick, I., Forbes, V.E. (2000). Variability in reproductive mode and larval development within the *Capitella capitata* species complex. *Invertebrate Reproduction & Development*, 38(2): 131-142. <https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652448>
- Méndez, N., Páez-Osuna, F. (1998). Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlán Bay: effect of body size on concentrations. *Environmental Pollution*, 102(2-3): 279-285. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(98\)00061-x](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(98)00061-x).
- Michalec, F.G., Holzner, M., Menu, D., Hwang, J.S., Souissi, S. (2013). Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants. *Aquatic toxicology*, 138: 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.007>.
- Moltedo, G., Martuccio, G., Catalano, B., Gastaldi, L., Maggi, C., Virno-Lamberti, C., Cicero, A.M. (2019). Biological responses of the polychaete *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776) to inorganic mercury exposure: A multimarker approach. *Chemosphere*, 219: 989-996. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.064>.
- Müller, M.C.M., Berenzen, A. Westheide, W. (2003). Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanata* (“Polychaeta”, Amphinomidae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration. *Zoomorphology*, 122(2): 95-103. <https://doi.org/10.1007/s00435-003-0073-4>.
- Novikova, E.L., Bakalenko, N.I., Nesterenko, A.Y., Kulakova, M.A. (2013). Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa). *EvoDevo*, 4: 14. <https://doi.org/10.1186/2041-9139-4-14>.
- Nusetti, O., Esclapes, M., Salazar, G., Nusetti, S., Pulido, S. (2001). Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(5): 576-581. <https://doi.org/10.1007/s001280047>.

- Nusetti, O., Zapata-Vívenes, E., Esclapés, M. M., Rojas, A. (2005). Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4): 509-514. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0041-0>.
- Özpalat, B.D., Bely, A. (2016). Developmental and molecular biology of annelid regeneration: a comparative review of recent studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40: 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.010>.
- Páez-Osuna, F. (2014). Metales y metaloides: origen, movilidad y ciclos biogeoquímicos. In: Botello, A.V., Páez-Osuna, F., Méndez-Rodríguez, L., Betancourt-Lozano, M., Álvarez-Borrego, S., Lara-Lara, R. (Eds.), *Pacífico mexicano. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (pp. 225-240). UAC, UNAM-ICMYL, CIAD-Mazatlán, CIBNOR, CICESE.
- Páez-Osuna, F., Álvarez-Borrego, S., Ruiz-Fernández, A.C., García-Hernández, J. Jara-Marini, E., Bergés-Tiznado, M.E., Piñón-Gimate, A., Alonso-Rodríguez, R., Soto-Jiménez, M.F., Frías-Espéricueta, M.G., Ruelas-Inzunza, J.R., Green-Ruiz, C.R., Osuna-Martínez, C.C., Sánchez-Cabeza, J.A. (2017). Environmental status of the Gulf of California: A pollution review. *Earth-Science Reviews*, 166: 181-205. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.01.014>.
- Pardo, E.V., Amaral, A.C.Z. (2006). Foraging and mobility in three species of Aciculata (Annelida: Polychaeta). *Brazilian Journal of Biology*, 66(4): 1065-1072. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842006000600014>.
- Paulus, T., Müller, M.C.M. (2006). Cell proliferation dynamics and morphological differentiation during regeneration in *Dorvillea bermudensis* (Polychaeta, Dorvilleidae). *Journal of Morphology*, 267(4): 393-403. <https://doi.org/10.1002/jmor.10280>.
- Pérez-Moreno, V., Ramos-López, M.A., Zavala-Gómez, C.E., Rico-Rodríguez, M.A. (2016). Heavy metals in seawater along the Mexican Pacific coast. *Interciencia*, 41(6): 419-423. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33945816008>.
- Pesch, C.E., Schauer, P.S. (1988). Flow-through culture techniques for *Neanthes arenaceodentata* (Annelida: Polychaeta), including influence of diet on growth and survival. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 7(12): 961-968. [https://doi.org/10.1897/1552-8618\(1988\)7\[961:fctfna\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1552-8618(1988)7[961:fctfna]2.0.co;2).
- Pfeifer, K., Dorresteijn, A.W.C., Fröbius, A.C. (2012). Activation of *Hox* genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii*. *Development Genes and Evolution*, 222(3): 165–179. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0402-z>.

- Pires, A., Freitas, R., Quintino, V., Rodrigues, A.M. (2012). Can *Diopatra neapolitana* (Annelida: Onuphidae) regenerate body damage caused by bait digging or predation? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 110: 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.12.039>.
- Planques, A., Malem, J., Parapar, J., Vervoot, M., Gazave, E. (2019). Morphological, cellular and molecular characterization of posterior regeneration in the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *Developmental Biology*, 445(2): 189-210. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.004>
- Pourret, O., Hursthouse, A. (2019). It's time to replace the term "heavy metals" with "potentially toxic elements" when reporting environmental research. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(22): 4446. <https://doi.org/10.3390/ijerph16224446>.
- Prentiss, N.K., Tyler, M.S., Dean, D. (2017). A morphological and histological investigation of the regeneration in *Myxicola infundibulum* (Montagu, 1808) (Sabellida, Annelida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 97(5): 1155– 1165. <https://doi.org/10.1017/S0025315417000248>.
- Rainbow, P.S., Smith, B. D., Casado-Martínez, M.C. (2011). Biodynamic modelling of the bioaccumulation of arsenic by the polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Chemistry*, 8(1): 1-8. <https://doi.org/10.1071/en10089>.
- Reish, D. J., Gerlinger, T. V. (1997). A review of the toxicological studies with polychaetous annelids. *Bulletin of Marine Science*, 60(2): 584-607.
- Reish, D.J., Asato, S.L., LeMay, J.A (1989) The effect of cadmium and DDT on the survival and regeneration in the amphinomid polychaete *Eurythoe complanata*. In: VII Simposio. Internacional de Biología Marina (pp 107–1111). 5 June 1989, La Paz, México.
- Ruelas-Inzunza, J.R., Páez-Osuna, F., (1998). Barnacles as biomonitors of heavy metal pollution in the coastal waters of Mazatlán harbor (Mexico). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(5): 608-615. <https://doi.org/10.1007/s001289900804>.
- Seaver, E.C., de Jong, D.M. (2021). Regeneration in the Segmented Annelid *Capitella teleta*. *Genes*, 12(11): 1769. <https://doi.org/10.3390/genes12111769>.
- Shalaeva, A.Y., Kozin, V.V. (2023). Cell Proliferation Indices in Regenerating *Alitta virens* (Annelida, Errantia). *Cells*, 12: 1354. <https://doi.org/10.3390/cells12101354>.
- Simonetti, P., Botté, S.E., Fiori, S.M., Marcovecchio, J.E. (2013). Burrowing crab (*Neohelice granulata*) as a potential bioindicator of heavy metals in the Bahía Blanca estuary, Argentina.

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(1), 110-118. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9804-1>.
- Sola, M.C.R., de Jesus, R.M., Nascimento, M.M., da Rocha, G.O., de Andrade, J.B. (2022). Occurrence of mercury in polychaete species (Annelida) and their associated sediments from an important Southern Atlantic Ocean Bay. *Science of The Total Environment*, 851: 157965. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4113870>.
- Sornom, P., Gismondi, E., Vellinger, C., Devin, S., Férard, J.F., Beisel, J.N. (2012). Effects of sublethal cadmium exposure on antipredator behavioural and antitoxic responses in the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*. *PloS ONE*, 7(8): e4243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042435>.
- Sujitha, S.B., Jonathan, M.P., Campos Villegas, L.E., Hernández-Camacho, C.J. (2020). Occurrences and ecotoxicological risks of trace metals in the San Benito Archipelago, Eastern Pacific Ocean, Mexico. *Ocean and Coastal Management*, 184: 105003. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2019.105003>.
- Tao, S.H., Bolger, P.M. (2014). Toxic metals: Arsenic. In: Motarjemi, Y. (Ed.) *Encyclopedia of Food Safety*. (pp. 342-345). Academic Press <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378612-8.00201-8>
- Tenorio-Nunes M.E., Gaeta-Espíndola E.L. (2012) Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, 21(4):1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0859-6>.
- Valente, P., Cardoso, P., Giménez, V., Salvador-Silva, M.S., Sá, C., Figueira, E., Pires, A. (2022). Biochemical and behavioural alterations induced by arsenic and temperature in *Hediste diversicolor* of different growth stages. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19: 15425. <https://doi.org/10.3390/ijerph192315426>.
- Vázquez-Núñez, R., Méndez, N., Green-Ruiz, C. (2007). Bioaccumulation and elimination of Hg in the fireworm *Eurythoe complanata* (Annelida: Polychaeta) from Mazatlan, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(4): 541-548. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0016-4>.
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Ferreira-Cravo, M., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L.A., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M. (2007). Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after arsenic exposure. *Environment International*, 33(4): 559-564. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.09.016>.
- Waring, J., Maher, W. (2005). Arsenic bioaccumulation and species in marine Polychaeta. *Applied organometallic chemistry*. 19(8): 917-929. <https://doi.org/10.1002/aoc.938>.

- Weidhase, M., Bleidorn, C., Beckers, P., Helm, C. (2016). Myoanatomy and anterior muscle regeneration of the fireworm *Eurythoe cf. complanata* (Annelida: Amphinomidae). *Journal of Morphology*, 277(3): 306-315. <https://doi.org/10.1002/jmor.20496>.
- Yáñez-Rivera, B. (2009). Amphinomidae Savigny in Lamarck, 1818. In: de León-González, J.A., Bastida-Zavala, R., Carrera-Parra, L.F., García-Garza, M.E., Peña-Rivera, A., Salazar-Vallejo, S.I., Soís-Weiss, V. (Eds.). *Poliquetos (Annelida: Polychaeta) de México y América Tropical*. (pp: 77-88). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Yáñez-Rivera, B. (2015). *Chloeia, Eurythoe y Notopygos* (Polychaeta: Amphinomidae): Revisión de las especies registradas en México y aspectos reproductivos [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Yáñez-Rivera, B., Méndez, N. (2014). Regeneration in the stinging fireworm *Eurythoe complanata* (Annelida): Lipid and triglyceride evaluation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 459: 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.05.023>.
- Zapata-Vívenes, E., Del Valle-Marcano, L., Acosta, V. (2018). Respuestas inmunológicas, estabilidad lisosomal y frecuencia de micronúcleos en *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) expuestos a una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(2): 297-305. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.02.10>.
- Zapata-Vívenes, E., Nusetti, O. A., Marcano, L., Esclapés, M. M., Arredondo, L. (2005). Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas*, 31(1A): 1-10. <https://doi.org/10.7773/cm.v31i11.83>.
- Zapata-Vívenes, E., Nusetti, O., Marcano, L. (2017). Variaciones temporales de las defensas antioxidantes e índices proteína: ADN y ARN: ADN en el poliqueto *Eurythoe complanata*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3): 529-538. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572017000300010>.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., Smith, G.M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. New York: Springer. 574p. https://doi.org/10.1007/978-0-387-87458-6_5.

Anexos

Anexo 1. Días en los que aparecieron ciertas características durante la primera fase de la regeneración del extremo anterior durante la exposición a diferentes concentraciones de As.

Tratamiento	0 µg/L			50 µg/L			100 µg/L			250 µg/L		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fragmentos												
Expulsión de intestino				×			×					
Evaginación del peritoneo			×							×		
Retracción de intestino				55			15					
Retracción de del revestimiento del celoma			6							6		
Blastema blanco	3	3	8		2	2	20	2	2	2	2	3
Blastema rojo	6	6	11		6	11	22	6	8	6	8	6
Carúncula	15	22	16		16	15	31	15	15	16	16	16
Ojos	18	25	18		18	16	32	16	17	18	18	18

Anexo 2. Días en los que aparecieron ciertas características durante la primera fase de la regeneración del extremo posterior durante la exposición a diferentes concentraciones de As

Tratamiento	0 µg/L			50 µg/L			100 µg/L			250 µg/L		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fragmentos												
Tejido rosado	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tejido rojo	6	6	6	8	6	8	8	8	8	8	6	8
Yema	15	13	27	15	15	20	13	22	20	20	20	15

Anexo 3. Días en los que aparecieron ciertas características durante la primera fase de la regeneración del extremo anterior durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.

Tratamiento Fragmento	0 µg/L			1 µg/L			5 µg/L			10 µg/L		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Expulsión de intestino				×								
Evaginación del peritoneo							×			×		
Retracción de intestino				53								
Retracción de del revestimiento del celoma							29			10		
Blastema blanco	2	2	1		1	1		1	1	11	1	1
Blastema rojo	10	10	10		10	10	31	8	8	14	10	11
Carúncula	16	20	20		16	17	34	14	16	20	20	20
Ojos	17	21	25		17	17	36	16	16	23	23	25

Anexo 4. Días en los que aparecieron ciertas características durante la primera fase de la regeneración del extremo posterior durante la exposición a diferentes concentraciones de Hg.

Tratamiento Fragmento	0 µg/L			1 µg/L			5 µg/L			10 µg/L		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tejido rosado	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tejido rojo	16	20	10	16	16	10	16	16	8	16	16	10
Yema	16	23	23	23	25	25	41	20	20	31	20	16