



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



# UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES EN PECES Y MOLUSCOS COMO INDICADORES DE ESTRÉS AMBIENTAL EN LAGUNAS COSTERAS

## T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestría en Ciencias**  
(Biología Marina)

p r e s e n t a

**JULIÁN RÍOS SICAIROS**

Directora de Tesis: Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Comité Tutorial: Dra. Luz María García de la Parra

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

Dr. Carlos René Green Ruíz

Dr. Miguel Betancourt Lozano

Mazatlán, Sinaloa a noviembre de 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A mis Padres

A mis Hermanos

A mi Esposa

A mi hija

A la memoria de Camilo<sup>†</sup>

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis formó parte de un estudio multidisciplinario realizado con el esfuerzo de Investigadores y alumnos en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A. C. Unidad Mazatlán, institución a la que agradezco por el apoyo técnico y académico, financiado conjuntamente por los proyectos SEMARNAT-2004-01-199 “Utilización de biomarcadores ecotoxicológicos para evaluar la contaminación ambiental en lagunas costeras de Sinaloa” y SEMARNAT-2002-C01-0735 “Calidad ambiental en ecosistemas litorales mediante el uso de biomarcadores moleculares en peces”.

A la Unidad Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, sus académicos, investigadores y administrativos.

A mi directora de Tesis, Dra. Silvia Alejandra García Gasca por su capacidad de formación de recursos humanos, ética profesional y apoyo en conocimientos de biología molecular y estudios ecotoxicológicos.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dr. Miguel Betancourt Lozano, Dra. Luz María García de la Parra, Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez y Dr. Carlos René Green Ruíz por la contribución en la elaboración del proyecto de Tesis, las observaciones y sugerencias en sus líneas particulares de investigación.

A MC. Rubí Hernández y MC. Roxana Atondo (apoyo en técnicas moleculares en laboratorio y campo), MC. Selene Abad (apoyo en técnicas histológicas en laboratorio y campo), MC. Gabriela Aguilar y MC. Irma Martínez (apoyo en técnicas cromatográficas en laboratorio y campo).

A Beatriz A. Leal, Irma Osuna, David Herrera, Jessy, Karen Brito, Cecilia Bastidas, Gamaliel Aztatzi, Martha Dorantes, Jonathan Cervantes, Lorenzo Verdugo por el apoyo en recolecta de muestras en campo y técnicas de procesamiento en laboratorio.

A L.I. Arnoldo Vázquez por el soporte y mantenimiento de los equipos computarizados requeridos en el procesamiento y análisis de muestras.

A los pescadores Hipólito Holague, Juan Sarmiento, Inés Pardo, Willy, Arturo Jiménez y Delfino por su apoyo en el reconocimiento de los ecosistemas y captura de organismos.

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron biomarcadores de estrés ambiental a distintos niveles de organización biológica en dos especies nativas de diferente nivel trófico (la lisa blanca *Mugil curema* y el mejillón de mangle *Mytella strigata*), en los ecosistemas lagunares-estuarinos de Ensenada del Pabellón, Estero de Urías y Estero Teacapán en el estado de Sinaloa. Estos sistemas presentan diferentes escenarios de contaminación de origen antropogénico. Ensenada del Pabellón recibe las aguas de retorno de miles de hectáreas de agricultura intensiva y los efluentes residuales de dos ingenios azucareros. El Estero de Urías recibe una diversidad de contaminantes a consecuencia de las descargas de residuos urbanos e industriales, además de los residuos generados por la flota pesquera, actividad turística, una planta termoeléctrica, agricultura y acuicultura. El Estero de Teacapán recibe efluentes provenientes de la agricultura, ganadería y actividad minera. El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación espacio-temporal de algunos biomarcadores moleculares y biológicos en *M. curema* y *M. strigata* como indicadores de efectos ocasionados por multi-estresores durante un periodo anual. Los resultados se analizan buscando establecer relaciones entre los biomarcadores como respuesta a las condiciones ambientales, poniendo en contexto respuestas con baja relevancia ecológica (por ejemplo respuestas a nivel molecular y celular) y respuestas con alta relevancia ecológica (por ejemplo alteraciones reproductivas e índices biológicos). El conjunto de biomarcadores evaluados en ambas especies reúnen evidencias que permiten valorar la salud de cada ecosistema: la proporción de sexos en *M. curema* fue constante y significativamente mayor para hembras de los tres ecosistemas, lo que podría estar relacionado con alteraciones ambientales. Asimismo, la población de *M. curema* del Estero Teacapán presentó la mejor condición reproductiva, menor estrés hepático y mejor condición general reflejados en los índices biológicos; por el contrario, los datos obtenidos en los sistemas de Ensenada del Pabellón y el Estero de Urías indican efectos negativos en la salud poblacional probablemente por la presencia de estresores ambientales de origen antropogénico. En *M. strigata*, los índices de condición biológica fueron indicadores principalmente de la presencia de materia orgánica y enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas, sobresaliendo el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón. La correlación positiva entre Hsp70 y CYP450 sugiere que ambos genes responden de manera similar a estresores en los tres ecosistemas y por lo tanto pueden ser buenos biomarcadores de estrés ambiental. En conclusión, las especies con diferentes escenarios de exposición a contaminantes dentro de un mismo ecosistema, utilizadas como bioindicadores de estrés ambiental pueden dar cuenta del grado de impacto general como es el caso de *M. curema* por su carácter nectónico; también de escenarios particulares o puntuales con especies sésiles como *M. strigata*. Ambas especies pueden ser consideradas como candidatas a estudios de biomonitorio ambiental. En términos de estrés ambiental, los resultados del presente trabajo se podrían compendiar de la siguiente manera: Estero de Urías > Ensenada del Pabellón > Estero de Teacapán. Este estudio es parte de un proyecto multidisciplinario e interinstitucional que persigue proporcionar información relevante del estado de salud de los ecosistemas estudiados.

## ABSTRACT

The present study evaluated biomarkers of environmental stress at different levels of biological organization in two native species of different trophic level (white mullet *Mugil curema* and mangrove mussel *Mytella strigata*) in the lagoon-estuarine ecosystems of Ensenada del Pabellon, Estero de Urias and Estero Teacapan in the state of Sinaloa. These systems present different scenarios of anthropogenic pollution. Ensenada del Pabellon estuary receives runoff water from thousands of hectares of intensive agriculture and wastewater effluents from two sugar mills. The Urias estuary receives a variety of pollutants as a result of discharges of urban and industrial wastes, in addition to the waste generated by the fishing fleet, tourism, a thermoelectric plant, agriculture and aquaculture. Teacapan estuary receives effluents from agriculture, cattle ranching and mining activities. The aim of this study was to evaluate the spatial and temporal variation of selected biological and molecular biomarkers in *M. curema* and *M. strigata* as indicators of multiple stressors over a year period. The results are analyzed in order to establish relationships between biomarkers as responses to environmental conditions, placing in context responses of low ecological relevance (eg responses at the molecular and cellular levels) with those of high ecological significance (eg reproductive disorders and biological indicators). The set of biomarkers evaluated in both species gather evidences aimed as assessing the health of the ecosystem: sex ratios in *M. curema* were consistently and significantly higher for females in all three ecosystems, which could be related to environmental deterioration. Also, the population of *M. curema* in Teacapan presented the best reproductive condition, lower hepatosomatic index and better overall biological condition. In contrast, the data obtained in Ensenada del Pabellon and Estero de Urias systems indicated adverse population health effects probably caused by environmental stressors of anthropogenic origin. In *M. strigata*, biological condition indices seemed to respond to the presence of organic matter and nutrient enrichment of the coastal lagoons, particularly in the Estero de Urias and Ensenada del Pabellon. The positive correlation between Hsp70 and CYP450 suggests that both genes respond similarly to stress factors in the three ecosystems, and therefore can become good indicators of environmental stress. In conclusion, species with different scenarios of exposure to contaminants within the same ecosystem, used as bioindicators of environmental stress can give an account of the degree of overall impact as it is the case of *M. curema* for its nektonic character, as well as possible site-specific scenarios with sessile species such as *M. strigata*. Both species can then be considered as candidates for environmental biomonitoring. In terms of environmental stress, the results of this study could summarize as follows: Estero de Urias > Ensenada del Pabellon > Estero Teacapan. This study is part of a multidisciplinary and inter-institutional project that intends to provide relevant information on health status of coastal ecosystems.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen .....	lv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de figuras y tablas.....	xiii
Glosario .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	6
3. JUSTIFICACIÓN .....	17
4. HIPÓTESIS .....	18
5. OBJETIVOS .....	18
5.1. Objetivo general .....	18
5.2. Objetivos específicos .....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1. Área de estudio .....	19
6.2. Fase de Campo .....	21
6.2.1. Recolecta de organismos .....	21
6.2.2. Parámetros ambientales de los sitios de estudio .....	23
6.2.3. Procesamiento de organismos y fijación de muestras en campo .....	23
6.3. Fase de laboratorio .....	24
6.3.1. Análisis histológico .....	24
6.3.2. Análisis de expresión génica de Hsp70 y CYPs .....	25
6.3.2.1. PCR en tiempo real .....	26
6.3.3. Índices de condición .....	27
6.4. Análisis estadístico .....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
7.1. Parámetros ambientales .....	30
7.1.1. Temperatura .....	30
7.1.2. Salinidad .....	31
7.1.3. Oxígeno disuelto .....	32
7.2. Recolecta de muestras .....	34

7.2.1. <i>Mugil curema</i> .....	34
7.2.1.1. Proporción de sexos de <i>M. curema</i> .....	34
7.2.1.2. Índices de condición biológica de <i>M. curema</i> .....	37
7.2.1.2.1. Índice gonadosomático (IGS) de <i>M. curema</i> .....	37
7.2.1.2.2. Índice hepatosomático (IHS) de <i>M. curema</i> .....	41
7.2.1.2.3. Factor de Condición (FC) de <i>M. curema</i> .....	43
7.2.1.3. Análisis molecular de <i>M. curema</i> .....	47
7.2.1.3.1. Secuenciación y diseño de oligos de <i>M. curema</i> .....	47
7.2.1.3.2. Expresión de CYP1A en <i>M. curema</i> (PCR en tiempo real) ..	49
7.2.1.3.3. Expresión de Hsp70 en <i>M. curema</i> (PCR en tiempo real) ...	51
7.2.1.4. Correlación de biomarcadores de <i>M. curema</i> .....	54
7.2.2. <i>Mytella strigata</i> .....	58
7.2.2.1. Proporción de sexos de <i>M. strigata</i> .....	58
7.2.2.2. Índices de condición biológica de <i>M. strigata</i> .....	60
7.2.2.2.1. Índice gonadosomático (IGS) de <i>M. strigata</i> .....	60
7.2.2.2.2. Índice de glándula digestiva (IGD) de <i>M. strigata</i> .....	63
7.2.2.2.3. Índice de condición (IC) de <i>M. strigata</i> .....	65
7.2.2.3. Análisis moleculares de <i>M. strigata</i> .....	67
7.2.2.3.1. Secuenciación y diseño de oligos de <i>M. strigata</i> .....	67
7.2.2.3.2. Expresión de Hsp70 en <i>M. strigata</i> (PCR en tiempo real) ...	68
7.2.2.3.3. Expresión de CYP1A en <i>M. strigata</i> (PCR en tiempo real) ..	70
7.2.2.4. Correlación de biomarcadores de <i>M. strigata</i> .....	72
7.2.3. <i>M. curema</i> y <i>M. strigata</i> como bioindicadores de estrés ambiental.....	80
8. CONCLUSIONES.....	84
9. RECOMENDACIONES .....	85
10. BIBLIOGRAFÍA .....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación esquemática del orden secuencial de respuestas a estrés por contaminación dentro de un sistema biológico (van del Oost <i>et al.</i> , 2002).	.....7
Figura 2. Ecosistemas bajo estudio y estaciones de muestreo.....	.....21
Figura 3. Temperatura del agua (°C) en las estaciones de estudio .....	.....31
Figura 4. Salinidad del agua (ups) en las estaciones de estudio .....	.....32
Figura 5. Oxígeno disuelto en el agua (mg O <sub>2</sub> /L) en las estaciones de estudio.	.....34
Figura 6. Comparación de la proporción de sexos en <i>Mugil curema</i> de los tres sistemas durante el periodo de estudio.	.....36
Figura 7. Comparación temporal del índice Gonadosomático de hembras (arriba) y machos (abajo) de <i>Mugil curema</i> .	.....38
Figura 8. Comparación espacial del índice Gonadosomático de a) Hembras y b) machos de <i>Mugil curema</i> .	.....40
Figura 9. Comparación temporal del índice hepatosomático de <i>Mugil curema</i> en los tres sistemas de estudio.	.....41
Figura 10. Comparación espacial del Índice Hepatosomático promedio de <i>Mugil curema</i> entre los tres sistemas de estudio.	.....43
Figura 11. Comparación temporal del factor de condición de <i>Mugil curema</i> en los tres sistemas de estudio.	.....44
Figura 12. Comparación espacial del Factor de condición de <i>Mugil curema</i> entre los tres sistemas de estudio.	.....45
Fig. 13. Índices de condición biológica de <i>M. curema</i> de los tres sistemas durante las épocas de estudio.	.....47
Figura 14. Comparación temporal de los niveles de expresión de CYP1A en <i>Mugil curema</i> durante el periodo de estudio.	.....50
Figura 15. Comparación de los niveles de expresión de CYP1A en <i>Mugil curema</i> durante el periodo de estudio.	.....51
Figura 16. Comparación temporal de los niveles de expresión de Hsp70 en <i>Mugil curema</i> durante el periodo de estudio.	.....53

Figura 17. Comparación espacial de los niveles de expresión de Hsp70 en <i>Mugil curema</i> durante el periodo de estudio.	.....54
Figura 18. Correlación de Pearson entre el Índice Gonadosomático e Índice hepatosomático de hembras de <i>M. curema</i> .	.....56
Figura 19. Correlación de Pearson entre el nivel de expresión de Hsp70 y CYP1A de <i>Mugil curema</i> .	.....58
Figura 20. Comparación de la proporción de sexos de <i>Mytella strigata</i> de cada sitio de estudio.	.....59
Figura 21. Comparación de la variación temporal del Índice Gonadosomático de <i>Mytella strigata</i> en cada sitio de estudio.	.....61
Figura 22. Comparación de la variación espacial del índice Gonadosomático de <i>Mytella strigata</i> en cada época de estudio.	.....62
Figura 23. Comparación de la variación temporal del Índice de Glándula Digestiva de <i>Mytella strigata</i> en cada sitio de estudio.	.....64
Figura 24. Comparación espacial del Índice de Glándula Digestiva de <i>Mytella strigata</i> en cada época de estudio.	.....65
Figura 25. Comparación temporal de la variación del Índice de condición de <i>Mytella strigata</i> en cada sitio de estudio.	.....66
Figura 26. Comparación espacial de la variación del Índice de Condición de <i>Mytella strigata</i> en cada época de estudio.	.....67
Figura 27. Comparación temporal de los niveles de expresión de Hsp70 en <i>Mytella strigata</i> durante el periodo de estudio	.....69
Figura 28. Comparación espacial de los niveles de expresión de Hsp70 en <i>Mytella strigata</i> durante el periodo de estudio.	.....70
Figura 29. Comparación temporal de los niveles de expresión de CYP4 en <i>Mytella strigata</i> durante el periodo de estudio.	.....71
Figura 30. Comparación espacial de los niveles de expresión de CYP4 en <i>Mytella strigata</i> durante el periodo de estudio.	.....72
Figura 31. Correlación de Pearson entre el Índice gonadosomático y el índice de glándula digestiva de <i>M. strigata</i> en a) Juárez y b) Sirena durante el periodo de estudio.	.....75

Figura 32. Correlación de Pearson entre el Índice de condición y el índice gonadosomático de <i>M. strigata</i> en a) Mapachera y b) Boca durante el periodo de estudio.	.....76
Figura 33. Correlación de Pearson entre el Índice de glándula digestiva y el índice de condición de <i>M. strigata</i> en a) Juárez y b) Sirena durante el periodo de estudio.	.....76
Figura 34. a) Correlación de Pearson negativa entre el Índice de glándula digestiva y los Niveles de expresión de HSp70 de <i>M. strigata</i> en Guamuchilera, b) Correlación positiva entre el Índice gonadosomático y los Niveles de expresión de HSp70 de <i>M. strigata</i> en Boca.	.....77
Figura 35. a) Correlación de Pearson entre el Índice de condición y los Niveles de expresión de CYP4 de <i>M. strigata</i> en Boca, b) Correlación entre concentración de oxígeno disuelto y los Niveles de expresión de HSp70 de <i>M. strigata</i> en Cruces.	.....79
Figura 36. Correlación de Pearson entre el nivel de expresión promedio de Hsp70 y CYP4 de <i>M. strigata</i> durante el periodo de estudio.	.....80
Tabla 1. Escenarios de contaminación en sistemas lagunares-estuarinos del estado de Sinaloa (Leal-Tarín, 2007).	.....12
Tabla 2. Fechas de recolección de organismos durante el periodo de estudio..	.....22
Tabla 3. Proporción de sexos en <i>Mugil curema</i> durante cada época de estudio.	.....35
Tabla 4. Matriz de Correlaciones de Pearson (r ; valor-p) para parámetros ambientales (n=4-5), Índices de condición biológica y biomarcadores moleculares de <i>Mugil curema</i> en los tres ecosistemas de estudio.	.....55
Tabla 5. Matriz de Correlaciones de Pearson (r ; valor-p) para parámetros ambientales, Índices de condición biológica y biomarcadores moleculares de <i>Mytella strigata</i> en los tres ecosistemas de estudio.	.....73

## GLOSARIO

**Bioacumulación:** Aumento progresivo, en función del tiempo, de la concentración en un organismo de una sustancia que procede de su ambiente.

**Bioindicador:** Organismos que pueden reflejar cambios biológicos, químicos o físicos atribuidos a condiciones ecológicas particulares, los cuales pueden ser útiles para evaluar estrés ambiental.

**Biomarcador:** Cambios cuantificables a diferentes niveles de organización biológica (molecular, bioquímico, fisiológico y conductual) inducidos por contaminantes y otros estresores ambientales que permiten establecer alteraciones biológicas tempranas y cuyos cambios, de manera ideal, establecen una relación de causalidad.

**Disfunción endocrina:** Ocurre cuando una sustancia química afecta el balance normal de las funciones hormonales en los organismos.

**Estrogénico:** Todo compuesto, de la naturaleza química, sintético o no, que sea capaz de generar el estrógeno en un animal hembra.

**Mutagénico:** Agente (físico, químico o biológico) que puede inducir mutación genética.

**Teratogénico:** Capacidad de un agente físico o químico para causar malformaciones estructurales permanentes o alteraciones en el desarrollo del feto, es decir, defectos congénitos.

**Xenobiótico:** Producto sintético u orgánico que no es utilizable en los ciclos biogeoquímicos naturales ni en el metabolismo de los seres vivos y que, sin embargo, puede ser objeto de transformaciones por parte de los mecanismos metabólicos de éstos (biotransformaciones).

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lagunas costeras presentan una alta heterogeneidad fisiográfica y reciben aportes de aguas continentales y oceánicas, conformando el característico flujo de energía cinética por efecto de vientos y corrientes de marea que causan la circulación de nutrientes, materia orgánica, plancton y larvas, lo que los hace ecosistemas altamente productivos (Odum, 1988). Por esta razón, estos sistemas lagunares (incluidos los del Pacífico Mexicano) tienen un especial interés económico y ecológico. Por otro lado, estos mismos sistemas son zonas de refugio y criaderos naturales para muchas especies de peces, crustáceos y moluscos de interés comercial (Álvarez-Cadena *et al.*, 1984), recursos que en los últimos años han estado sujetos a cambios por sobrepesca y contaminación a distintos niveles causados por las actividades antropogénicas (Yáñez-Arancibia, 1976).

En la actualidad, el acelerado incremento demográfico y desarrollo tecnológico, ha ocasionado la modificación y deterioro de las cuencas hidrológicas y, con ello, cambios en las condiciones naturales de las aguas costeras que son el receptor final de descargas agrícolas, urbanas e industriales, donde se presentan graves problemas ecológicos, socioeconómicos y de salud (Páez-Osuna y Osuna-López, 1990; Pathiratne y George, 1996).

En los ecosistemas lagunares-estuarinos, los contaminantes se encuentran tanto en la columna de agua como en los sedimentos y la resuspensión de éstos está en función de su solubilidad, estructura de la partícula sedimentaria, actividades biológicas, influencia de la velocidad del agua cercana a la columna sedimentaria y condiciones físico-químicas del medio (Galindo *et al.*, 1992; Chen y Chen, 1999; Soto y Páez, 2001; Riba *et al.*, 2003). Las propiedades químicas del agua estuarina favorecen la acumulación de contaminantes con baja solubilidad en sedimentos finos, pero pueden permanecer biológicamente activos, lo cual incrementa riesgos de toxicidad crónica y aguda en la fauna bentónica (Osuna-López *et al.*, 2001). Debido a que los contaminantes están mayormente concentrados en granos finos, éstos pueden no estar distribuidos uniformemente en el estuario (Weis y Weis, 1994) y es necesario, en

estudios de monitoreo ambiental, disponer de una amplia batería de biomarcadores que pueda proveer bases válidas para la interpretación de estudios ecotoxicológicos (Beliaeff y Burgeot, 2002).

Así pues, un **biomarcador** es una respuesta biológica susceptible a ser medida e inducida por uno o varios xenobióticos (incluso otros estresores ambientales) en células, componentes celulares o procesos bioquímicos, estructuras o funciones que pueden ser medidas en una muestra o sistema biológico (National Research Council, 1987). En un contexto toxicológico, los biomarcadores son considerados como indicadores sensibles a efectos tempranos que muestran que los contaminantes han entrado al organismo y se han distribuido en sus tejidos produciendo efectos tóxicos (McCarthy y Shugart, 1990), los cuales pueden ocasionar lesiones como la formación de aductos y daño al ADN, alteración endocrina y cambios en la función reproductiva, pérdida de crecimiento, daños en órganos, desequilibrios en la condición biológica general, mortalidad, entre otros (Sorensen *et al.*, 2001; Battaglin y Fairchild, 2002; De Metrio *et al.*, 2003; van der Ven *et al.*, 2003).

La utilización de biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica es una herramienta útil para monitorear algunos efectos (actividad enzimática, expresión de genes, alteraciones en órganos, crecimiento, entre otros) de la contaminación en ecosistemas costeros (Leatherland *et al.*, 1998) ya que: (a) permiten la detección y medición de sustancias o compuestos químicos, sus metabolitos o el producto de la interacción entre el xenobiótico y determinada molécula o célula que puede ser medido en un compartimento del organismo (biomarcador **de exposición**), (b) que miden respuestas moleculares, bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones en tejidos o fluidos que puedan ser reconocidas y asociadas con posibles alteraciones en la salud o enfermedad del organismo (biomarcadores **de efecto**), o bien, (c) que indican la pérdida o adquisición de la habilidad de un organismo a responder al cambio provocado por un xenobiótico específico, incluyendo factores genéticos y cambios que alteren su susceptibilidad a dicha exposición (biomarcador **de susceptibilidad**) (van der Oost *et al.*, 2003).

Según Cajaraville et al. (2000), los moluscos bivalvos son considerados especies centinelas apropiadas para medir la mayoría de los biomarcadores (excepto para la inducción del sistema P450), lo cual podría ser medido en peces. La selección tanto de un biomarcador de contaminación como del organismo centinela es muy importante ya que ciertos biomarcadores pueden ser apropiados en una especie, pero presentar respuestas diferentes en otra. Deben elegirse organismos que interactúen directamente con los contaminantes, que sean de fácil manejo e identificación, de ciclos de vida preferentemente cortos y residentes permanentes del ecosistema; entre estos organismos destacan los moluscos y peces como grupos centinela (Smith y Suthers, 1999; Lester, et al., 2001; Roy et al., 2003), que son objeto del presente estudio.

Entre las respuestas a nivel molecular frecuentemente estudiadas en distintos grupos de organismos, se encuentra la expresión de proteínas de estrés Hsp70 (Heat shock protein-70kDa), las cuales pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas, presentes en el citoplasma celular de muchos grupos animales, pueden verse inducidas por la síntesis de compuestos endógenos o por la presencia de estrés de tipo exógeno (Hamdoun *et al.*, 2003). Esta familia de proteínas cumple funciones muy importantes a nivel celular entre las que destacan conservar la integridad de otros grupos proteínicos ante agentes estresores, están presentes durante el desarrollo embrionario de los organismos, así como en tejidos reproductivos manteniendo funciones asociadas a la integridad del ADN en la división celular, entre otras (Neuer, et al., 2000). La inducción de Hsp70 ha sido identificada en organismos expuestos a cambios ambientales o estresores químicos, por lo que son utilizadas como posible biomarcador de alteraciones homeostáticas (hipertermia, cambios osmóticos) y macromoleculares (daño al ADN ó proteínas, lipoperoxidación) en ambientes contaminados (Kültz, 2005).

Por otro lado, otro biomarcador ampliamente utilizado es la expresión de proteínas de la superfamilia de oxidasas de función mixta (MFO) dependientes de citocromo P450 que en condiciones normales participa en el metabolismo de compuestos endógenos como el colesterol, ácidos grasos, ácidos biliares y hormonas

esteroides (Sanderson y van den Verg, 2003), así como en la biotransformación de compuestos exógenos a través de enzimas catalíticas de oxidación, reducción e hidrólisis (fase de bioactivación) (Orellana y Guajardo, 2004). En una segunda fase, los metabolitos bioactivados son conjugados con productos del metabolismo endógeno (glucuronato, glutatión, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato, etc.) y subsecuentemente eliminados por el organismo (Siroká y Drastichová, 2004). La desintoxicación de sustancias genotóxicas por el sistema de oxidasas de función mixta (P450), ocasionalmente produce reactivos químicos intermediarios los cuales son altamente electrofílicos y pueden covalentemente unirse a bases nitrogenadas de ADN formando aductos (Ching *et al.*, 2001). Esta pérdida en la integridad del ADN puede inducir mutaciones, aberraciones cromosomales, asimismo enfermedades genotóxicas como cánceres (Nigro *et al.*, 2002).

El presente estudio aborda el monitoreo de dos especies estuarinas de diferente grupo taxonómico, con diferente estado trófico, ecológicamente importantes con escenarios de exposición y capacidad de respuesta particulares a xenobióticos y otros cambios ambientales a nivel molecular e individual debido a su metabolismo, hábitos alimenticios y capacidad de bioacumulación, entre otros. Por un lado, *Mytella strigata* es una especie de molusco bivalvo de carácter sésil con amplia distribución geográfica, hábitos alimenticios filtradores que presenta contacto con sedimentos y el detritus de manglar, por poseer un metabolismo sencillo tiene la habilidad de secuestrar algunos metales, contaminantes lipofílicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), plaguicidas clorados y bifenilos policlorados (PCBs) (Lam y Wu, 2003), es potencial candidato para representar condiciones puntuales en el ecosistema. La segunda especie *Mugil curema* pertenece al grupo de los peces, nectónica residente de lagunas costeras con distribución cosmopolita (Harrison, 1995; Castro-Aguirre *et al.*, 1999; Froese y Pauly, 2003) con hábitos alimenticios detritívoros e incorpora cantidades importantes de sedimentos (Yáñez-Arancibia, 1976) lo que representa una vía de ingestión de contaminantes biodisponibles en dicho sustrato (Van Veld *et al.*, 1990). Sus características de movilidad y exposición a diversos xenobióticos vía gástrica y respiratoria principalmente, hacen que esta especie represente la condición general del

ecosistema. Además, ambas especies son de importancia comercial local y ocasionalmente de consumo humano, lo que tiene implicaciones sobre posibles riesgos en materia de salud pública.

Este estudio es parte de un proyecto multidisciplinario e interinstitucional para realizar un análisis comparativo de los efectos ocasionados por estrés ambiental mediante una batería de biomarcadores integrados, que propone al bivalvo *Mytella strigata* y el pez *Mugil curema* como especies indicadoras del grado de estrés ambiental en los ecosistemas lagunares-estuarinos de Ensenada del Pabellón, Estero de Urías y Estero Teacapán en el estado de Sinaloa. Los resultados se analizan buscando establecer relaciones entre los biomarcadores como respuesta a las condiciones ambientales, poniendo en contexto respuestas con baja relevancia ecológica (moleculares y celulares) y respuestas con alta relevancia ecológica (alteraciones reproductivas e índices biológicos). El estudio persigue proporcionar información relevante del estado de salud de los ecosistemas estudiados y sentar las bases para estudios de riesgo ambiental.

## 2. ANTECEDENTES

Los sistemas lagunares estuarinos están ubicados en la interfase continental y marina, siendo receptores finales de descargas agrícolas, urbanas e industriales lo que puede causar deterioro en su composición natural y en la biota que los integra por la acumulación de compuestos **xenobióticos** (Pathiratne y George, 1996).

Los xenobióticos son productos sintéticos y orgánicos no utilizables en los ciclos biogeoquímicos naturales ni en el metabolismo de los organismos en estudio y sin embargo, al ser introducidos, pueden ocasionar alteraciones y subproductos metabólicos en los mismos (**biotransformaciones**) (Porte *et al.*, 2002).

Por otro lado, los cambios o alteraciones en los sistemas lagunares pueden ser estudiados mediante un **monitoreo ambiental**, que, se refiere al estudio de las condiciones ambientales analizadas en base a múltiples parámetros bióticos y abióticos, seleccionados a escala espacial y temporal para conocer el estatus y condiciones ecológicas de un ecosistema y preveer futuros riesgos y la sustentabilidad de los recursos. En décadas pasadas los programas de monitoreo ambiental se concentraban en la medición de variables físico-químicas y solo ocasionalmente eran incorporadas variables biológicas, medidas que actualmente están siendo adoptadas por muchas naciones. En este contexto, los **bioindicadores** son organismos que reaccionan a un estresor por alteraciones ambientales-biológicas y/o composición química y es posible a través de ellos inferir cambios significativos en el ambiente. En general los bioindicadores son organismos de prueba o monitoreo de alta sensibilidad a cambios ambientales, en los que se pueden cualificar y cuantificar sustancias en el ambiente y en algunos casos detectar sus efectos a través de biomarcadores (Lam y Wu, 2003).

En las últimas décadas se han utilizado organismos acuáticos a distintos niveles de organización biológica (subcelular, tisular, poblacional, etc.) en condiciones experimentales y en ecosistemas antropogénicamente alterados con la finalidad de identificar los efectos de la contaminación y su relevancia en el ambiente (Fig. 1). En

este sentido, es aún de mayor valía, la utilización de bioindicadores nativos *in situ* para monitorear alteraciones ambientales.



Figura 1. Representación esquemática del orden secuencial de respuestas a estrés por contaminación dentro de un sistema biológico (van del Oost *et al.*, 2002).

Estudios relacionados con efectos de contaminantes en ecosistemas acuáticos como el de Macdowell-Capuzzo *et al.* (1988) señalan que a nivel organismo los tóxicos pueden causar alteraciones que afectan la función de sus sistemas, con la potencial reducción de la viabilidad en las larvas y anormalidades en los gametos y el desarrollo embrionario, entre otros. En 1995, Davis estudió los efectos de la exposición en organismos silvestres a mezclas de plaguicidas, metales pesados, fitoesteroides, vitaminas y plastificantes reportados como teratogénicos, ocasionando serios problemas en su ciclo normal de vida, induciendo estas alteraciones incluso con exposiciones subletales.

Por otro lado, Olsson (1998) demostraron que algunos trastornos en peces son asociadas a contaminación por metales pesados como cadmio, cobre, zinc y mercurio, ocasionando daños a nivel celular y neurológico en el organismo. Con relación a la exposición de peces a metales, Zikic *et al.* (2001) estudiaron la exposición de peces a cadmio, zinc y cobre, reportando anemia por destrucción de eritrocitos y alteración del

metabolismo de carbohidratos y proteínas así como alteraciones de glucosa sanguínea e hipoxia en los organismos.

Los biomarcadores con baja especificidad como Hsp70, han sido estudiados en conjunto con una serie de biomarcadores a distintos niveles de organización y análisis químicos. Triebkorn *et al.* (2002), analizaron peces silvestres y sedimentos expuestos a mezclas urbanas e industriales, registrando una mayor expresión de Hsp70 en los organismos expuestos a altas concentraciones de dichas mezclas de contaminantes, llegando a un límite máximo, sin embargo detectaron que la expresión de Hsp70 después de ciertas concentraciones altas del químico declinaba a un límite umbral; además de detectar cambios de expresión relacionados con la estacionalidad independientemente de la temperatura, por lo que el biomarcador debe manejarse con cierta precaución para evitar falsas interpretaciones sobre todo en estudios de campo con organismos silvestres.

En este sentido, Iwama *et al.* (1999), estudiaron la inducción de las proteínas de estrés Hsp70 bajo condiciones adversas, así como su respuesta inespecífica a estresores y su papel fisiológico en peces; los autores mencionan la importancia de las Hsp70 en el mantenimiento de la integridad de proteínas, previniendo translocación proteica, entre otras funciones, sugiriendo que el incremento en los niveles de Hsp70 induce tolerancia a subsecuentes estresores a nivel celular, tisular y del organismo completo. Tal es el caso reportado por Adam *et al.* (2000) quienes evaluaron la expresión de proteínas de estrés Hsp70 en embriones de pez zebra (*Danio rerio*) con el promotor transgénico *lacZ* expuestos a temperaturas elevadas, demostrando que la inducción de la proteína puede ser un biomarcador de estrés térmico que probablemente responda además a sustancias exógenas en el ambiente (Kültz, 2005) y proponen a *D. rerio* como buen bioindicador de estrés ambiental.

Mediante un estudio realizado por Jans *et al.* (1997), se analizó la expresión de Hsp70 y apoptosis folicular de peces expuestos a mezclas de desechos provenientes de plantas procesadoras de papel, asociando la inducción de Hsp70 y la elevada apoptosis folicular ovárica con tallas de ovario reducidas, decremento en la testosterona

plasmática y un incremento en las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol; sin embargo no se determinó si la inducción de Hsp70 está directamente relacionada con la apoptosis folicular o es una respuesta al estrés general ambiental. En otro estudio de proteínas Hsp70 relacionadas con procesos reproductivos, Neuer *et al.* (2000) identificaron la expresión de Hsp70 en casos de problemas de infertilidad en humanos debido probablemente a la exposición previa de pacientes a infecciones patológicas en el tracto genital, lo que induce una respuesta inflamatoria persistente. Por otro lado identificaron problemas de daño citotóxico, donde los leucocitos del endometrio producen especies reactivas del oxígeno y citoquinas que son moduladas por la expresión de Hsp, la cual juega un papel importante como agente anti-apoptosis.

Por otro lado, el sistema multi-enzimático de oxidasas de función mixta (MFO) participa de manera natural en el metabolismo de sustratos endógenos como ácidos grasos, hormonas, ácidos biliares entre otros (Orellaba y Guajardo, 2004). Asimismo, el sistema MFO participa en la desintoxicación activa de sustancias xenobióticas por medio del complejo multi-enzimático denominado Citocromo P450 que cataliza reacciones de oxidación y excreción de sus metabolitos y es ampliamente usado como biomarcador de estrés inducido por químicos orgánicos en muchos grupos de animales acuáticos (Kirby *et al.*, 2000). La inducción de citocromo P450 en peces es posiblemente el biomarcador más utilizado para monitorear la presencia de sustancias tóxicas como HPAs y CBPs entre otros xenotóxicos en ambientes acuáticos (Arinç y Şen, 1999). Ejemplo de lo anterior, son las observaciones en el lenguado *Pleuronectes americanus* expuesto a efluentes de descargas industriales que registró una alta actividad de citocromo P450 en su forma de etoxiresorufin-o-desetilasa (EROD) (Khan y Payne, 2002), la cual se ha reportado que es inducida por hidrocarburos poliaromáticos (HPAs) y compuestos bifenil policlorados (BPCs) (Burgeot *et al.*, 1994). La utilización en peces del biomarcador CYP1A como isoenzima que se activa para la desintoxicación de muchos compuestos persistentes ha sido monitoreada ampliamente en los últimos años. Van Veld *et al.* (1990), reportan una elevada actividad de citocromo P450 en intestino e hígado de peces recolectados en ecosistemas riparios, así como la presencia de HPAs en sedimentos de los mismos ecosistemas, sugiriendo que el

intestino juega un papel importante en la absorción y metabolismo de HPAs y la exposición puede ser detectada utilizando este tipo de biomarcadores. También han sido reportados otros compuestos relacionados con alteraciones en el sistema enzimático citocromo P450, entre ellos las dibenzodioxinas policloradas (DDPCs), dibenzofuranos policlorados (DFPCs), compuestos alquílicos y metales (Arinç *et al.*, 2000). Estos mismos autores mencionan que CYP1A se induce en peces para oxidar benzo-a-pireno en presencia de epóxidos y formar el carcinógeno benzo-a-pireno 7,8 dihydrodiol 9,10-epóxido (BPDE) el cual forma aductos con el ADN, por lo que este biomarcador indica la presencia de estos grupos de compuestos químicos, así como posibles riesgos en el ecosistema. Recientemente se han empleado técnicas moleculares, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), para identificar la expresión de CYP1A en organismos tanto en estudios de exposición en laboratorio como en el medio silvestre (Snyder, 1998; Waxman, 1999; Stegeman, 2000; Lewis *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003). Sin embargo son necesarios nuevos estudios que identifiquen posibles relaciones de inhibición de CYPs con la exposición de compuestos xenobióticos en organismos acuáticos para una mejor interpretación de respuestas en estudios de biomonitorio ambiental.

Entre las mezclas de contaminantes en el ambiente, las sustancias genotóxicas como benzo-a-pireno y otras sustancias altamente reactivas con el ADN, pueden contribuir en defectos hereditarios a través de mutaciones en líneas de células germinales y tener efectos teratogénicos y genotóxicos (Mitchelmore y Chipman, 1998; Lyons *et al.*, 1999). Algunos estudios para identificar aductos en ADN por contaminantes específicos, son desarrollados en exposiciones de laboratorio como el realizado por Malmström *et al.* (2000), exponiendo hepatocitos de peces a hidrocarburos específicos como el benzo-a-pireno. Los autores identificaron aductos al ADN por medio de la técnica del  $^{32}\text{P}$ -post-marcaje, coincidiendo las concentraciones y el tiempo de exposición con el aumento en la cantidad de aductos en los hepatocitos, mostrando la genotoxicidad de compuestos por aducciones hidrofílicas al ADN y en consecuencia daño a la integridad del material genético.

Otro aspecto importante en el estudio de biomarcadores de estrés ambiental es la condición reproductiva y fisiológica de los organismos, las cuales tiene estrecha relación entre sí y están sujetas a deficiencias y alteraciones por efecto de estresores ambientales. Al respecto Couillard *et al.* (1999) en un estudio realizado en áreas con influencia de descargas industriales, analizaron el factor de condición (FC) e índice gonadosomático (IGS) entre otros, donde el índice gonadosomático fue mayor en dos de los sitios mayormente contaminados con respecto a los de referencia, sin explicar las posibles causas de dichas diferencias. Esta misma línea de investigación ha sido objeto de estudio por Smith y Suthers (1999), analizando los efectos de descargas de aguas negras en índices de abundancia, condición y mortalidad del pez *Trachinops taeniatus* en la costa central de Australia, donde las hembras grávidas de localidades mayormente contaminadas tuvieron índices gonadosomáticos similares a los sitios de referencia pero con un número significativamente mayor de huevos con tallas menores que las localidades control. Asimismo, en estuarios contaminados principalmente con HPAs, entre otros contaminantes, Kirby *et al.* (2000) encontraron índices gonadosomáticos mayores que en los del sitio de referencia, atribuyendo esta razón a que posiblemente los sitios contaminados contengan estrógenos que inducen una maduración sexual precoz; además analizaron el índice hepatosomático, reportando niveles 30% menores en el sitio de referencia que en los impactados, atribuyendo a que el hígado muestra menor actividad metabólica cuando no está expuesto a contaminantes y por lo tanto presenta menor crecimiento.

En lo que respecta al monitoreo de contaminantes y sus efectos en la biota de la zona de estudio, se han realizado investigaciones aisladas principalmente enfocadas a determinar las concentraciones de algunos agroquímicos y metales pesados en sedimentos y organismos. Para dar cuenta de los escenarios de contaminación a los que están expuestos los sitios del presente estudio, a continuación se muestran las principales fuentes antropogénicas y las concentraciones en forma simbólica de los contaminantes detectados en cada sitio (Tabla 1), siendo según estudios previos, el sistema de Urías el de mayor afectación por contaminantes, seguido por Ensenada del

Pabellón y finalmente el Estero Teacapán en orden descendente de influencia antropogénica.

Tabla 1. Escenarios de contaminación en sistemas lagunares-estuarinos del estado de Sinaloa (Leal-Tarín, 2007). Con fines comparativos, arbitrariamente las concentraciones de contaminantes corresponden a altas(\*\*\*), moderadas (\*\*) y bajas (\*).

Sistema	Sitio	Fuente de emisión	Contaminantes detectados
Ensenada del Pabellón	Mapachera	Agricultura-Ganadería	(5) Plag <sup>+++</sup> , (4) Met <sup>++</sup> , (5) NyP <sup>+++</sup>
		Acuicultura	Antib <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup> , (7) MO <sup>+</sup>
		Ingenio azucarero	(7) MO <sup>+</sup>
		Urbano	PAHs <sup>++</sup> , (6) Met <sup>++</sup> , Org dom <sup>++</sup> , (7) MO <sup>++</sup> , NyP <sup>+</sup> ,
Guamuchilera		Agricultura-Ganadería	(5) Plag <sup>+</sup> , (4) Met <sup>+</sup> , (5) NyP <sup>+</sup>
		Acuicultura	Antib <sup>++</sup> , NyP <sup>++</sup> , (7) MO <sup>++</sup>
		Urbano	PHAs <sup>++</sup> , Met <sup>+</sup> , (8) Org dom <sup>+++</sup> , MO <sup>+++</sup> , Plag <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup>
Estero de Urías	Juárez	Industria (PEMEX-enlatadoras)	(10) PAHs <sup>+++</sup> , (9) Met <sup>++</sup>
		Flotas pesquera	PAHs <sup>++</sup> , (9) Met <sup>+++</sup>
		Demanda bioquímica de oxígeno	O <sub>2</sub> <sup>+++</sup>
		Sirena	Acuicultura
Agricultura	Plag <sup>+</sup> , (9) Met <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup>		
Deposición de sedimentos	(10) PAHs <sup>++</sup> , (9) Met <sup>++</sup> , Plag <sup>+</sup> , MO <sup>++</sup> , (8) Org dom <sup>++</sup>		
Termoeléctrica	T°C <sup>+++</sup> , Biocidas <sup>++</sup> , (9) Met <sup>++</sup> , (10) PAHs <sup>++</sup> , PCBs <sup>+</sup>		
Demanda bioquímica de oxígeno	O <sub>2</sub> <sup>++</sup>		
Estero Teacapán	Cruces	Minería	(3)Hg <sup>++</sup> , ( )Met <sup>++</sup>
		Agricultura-Ganadería	(1) Plag <sup>++</sup> , (2) Met <sup>++</sup> , NyP <sup>++</sup>
		Acuicultura	Antib <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup> , MO <sup>+</sup>
		Salinidad	NaCl <sup>+++</sup>
Boca		Minería	(3) Hg <sup>+</sup> , Met <sup>+</sup>
		Urbano	PAHs <sup>+</sup> , Met <sup>+</sup> , Org dom <sup>+</sup> , MO <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup>
		Agricultura-Ganadería	(1) Plag <sup>+</sup> , (2) Met <sup>+</sup> , NyP <sup>+</sup>
		Salinidad	NaCl <sup>+++</sup>

Plag: plaguicidas, Met: metales, NyP: nitrógeno y fósforo, Antib: antibióticos, MO: materia orgánica, PHAs: hidrocarburos poliaromáticos, Org dom: organismos dominantes, O<sub>2</sub>: oxígeno, Hg: mercurio, NaCl: salinidad. (1) Galindo, *et al.*, 1992; (2) Galindo, 2000, Álvarez, *et al.*, 1986, Amescua, *et al.*, 1987; (3) Rodríguez, 2004; (4) Izaguirre *et al.*, 1992; (5) Galindo *et al.*, 1999; Páez-Osuna *et al.*, 1992; (6) Ruiz *et al.*, 2002; (7) Páez-Osuna *et al.*, 1998; (8) Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990; (9) Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000; Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990; (10) Álvarez, 1980.

Dentro del área de estudio, el sistema lagunar de Ensenada del Pabellón, recibe un escurrimiento de al menos 3,276 millones de metros cúbicos por año a través del río Culiacán (DEEE, 1985). Además, recibe las aguas de retorno (escorrentía) de 276 000 ha de agricultura intensiva de hortalizas y cereales del Valle de Culiacán y Navolato y los efluentes residuales de los ingenios azucareros La Primavera y El Dorado aportando diversos contaminantes, así como una fracción significativa de materia orgánica en sedimentos entrantes al sistema (Páez-Osuna *et al.*, 1998). Al respecto, Galindo-Reyes *et al.* (1999) realizaron un estudio en sedimentos, columna de agua y organismos, detectando la presencia de plaguicidas tales como el endrín, lindano, aldrín, DDT y sus metabolitos, señalándolos como una causa de mortalidades masivas y diversas patologías de organismos en el sistema. En otro estudio realizado por Izaguirre-Fierro *et al.* (1992) evaluaron los niveles de metales pesados en el músculo comestible, branquias y vísceras de *Mugil curema* y *Tilapia mossambica* en lagunas tributarias al sistema, encontrando niveles de 6.4 µg/g de cobre en tejido comestible de *M. curema*, concentración considerada como alta pero que no rebasa los límites establecidos por la Legislación Internacional de Salud Pública. Por otro lado, Green-Ruiz y Páez-Osuna (2001) analizaron la concentración de metales pesados en sedimentos de 79 sitios ubicados dentro del ecosistema Ensenada del Pabellón, relacionando la presencia de Cu, Cr, Mn y Pb con las descargas de drenes agrícolas detectando un mayor enriquecimiento particularmente con el Pb. Ruiz-Fernández *et al.* (2003) emplearon isótopos radioactivos para analizar metales traza y nutrientes en sedimentos del sistema Ensenada del Pabellón, además señalaron que en algunas estaciones de muestreo cercanas a las descargas de drenes agrícolas, los nutrientes y metales traza pueden estar sujetos a remoción constantemente y reincorporarse a la cadena trófica comprometiendo la salud del ecosistema.

Por otro lado, el estero de Urías es el sistema lagunar más importante del Puerto de Mazatlán y recibe una diversidad de contaminantes a consecuencia de las descargas de residuos urbanos e industriales principalmente. De 1985 a 1995 el sistema recibió un promedio anual de 22' 075, 200 m<sup>3</sup> de aguas residuales y 58, 400 m<sup>3</sup> de lodos a través de la planta de tratamientos primarios de Mazatlán (Osuna-López *et*

*al.*, 1997). Para 1998, Páez-Osuna *et al.*, reportan la generación de 82, 000 m<sup>3</sup> por día<sup>-1</sup> de mezclas de aguas residuales e industriales no tratadas, así como un promedio de lodos y sólidos suspendidos de 42 ton por día<sup>-1</sup>, donde sólo el 40 % recibía un tratamiento primario por la planta de tratamientos de aguas residuales de Mazatlán (Soto-Jiménez *et al.*, 2001). Tales descargas son fuente de materia orgánica, detergentes, metales pesados, entre otros. En lo referente a la actividad industrial, destacan por el volumen y tipo de aguas residuales que generan las industrias procesadoras de alimentos de pescado y camarón y cooperativas pesqueras del puerto, además de una fábrica de envases plásticos y el rastro municipal, Además, se suman los residuos generados por la flota pesquera, la actividad turística, una planta termoeléctrica, la agricultura y la acuicultura, cuyas descargas son emitidas al sistema sin existir un programa de monitoreo de efluentes. Cabe resaltar que estas industrias pueden ser fuente importante de sustancias como bifenilos policlorinados (BPCs) o hidrocarburos (Comisión para la Cooperación Ambiental CCA, 1997). Páez-Osuna y Osuna-López (1990) reportaron altas concentraciones de cobalto, manganeso, cobre, plomo y otros metales pesados en sedimentos de distintas estaciones dentro del sistema. Sin embargo, Páez y Tron (1996) reportaron bajas concentraciones de metales en tejidos de camarón *Litopenaeus vanameii* en sistemas de cultivos asociados al ecosistema. Asimismo, Villanueva y Botello (1996) mencionan bajas concentraciones de metales pesados en sedimentos del sistema en comparación a otras lagunas costeras del Golfo de California. Por su parte, Méndez y Páez-Osuna (1998) reportan altas concentraciones de cobre y plomo en el poliqueto *Eurythoe coplanata* siguiendo una tendencia a la concentración en sedimentos y proponen a la especie como potencial bioindicador de contaminación por metales en sedimentos. En otro estudio, Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna (2000) señalan la presencia en el sistema de altas concentraciones de Cd, Mn y Zn en el mejillón *Mytella strigata* comparativamente con los bivalvos *C. corteziensis* y *F. dentivarians* durante el verano de 1996, señalando como posible causa la distinta condición reproductiva de cada especie y por lo tanto la biodisponibilidad y eliminación de metales traza. De igual manera, Soto-Jiménez *et al.* (2001) registran altas concentraciones de metales pesados en sedimentos asociados al

emisor de la planta de tratamientos de Mazatlán, con altas concentraciones de Cd, Cu, Mn y Zn en bivalvos durante el verano, resaltando una fracción disponible de Cd superior al 86 %. Asimismo, en otro estudio realizado por Soto-Jiménez y Páez-Osuna (2001) detectaron en sedimentos finos del sistema una considerable tasa de enriquecimiento en las concentraciones de Cd, Pb, Zn y Cu en estaciones cercanas a la zona industrial, zonas profundas del sistema y el estero El Infiernillo, sin embargo no señalan a la granulometría de los sedimentos como factor determinante en la capacidad para capturar metales entre sedimentos lagunares y de manglar. Pese a la actividad industrial en este sistema lagunar-estuarino, se cuenta con pocos estudios sobre compuestos bifenil policlorados (BPCs). Tal es el caso del realizado por Galindo-Reyes *et al.* (2003) registrando Aroclor 1254 con mayor concentración en sedimentos y una serie de compuestos congéneres a éste, sin embargo en concentraciones por debajo de la concentración letal media (LC<sub>50</sub>) del camarón *L. vannameii* determinada en el mismo estudio. Por otro lado, Galindo-Reyes *et al.* (2001) reportaron la presencia de compuestos organoclorados (BPCs e insecticidas) en organismos del sistema y destacaron que la agricultura y la acuicultura también pueden afectar al sistema por el arrastre de sustancias químicas como insecticidas y productos utilizados para el control de enfermedades.

Por su parte, Méndez-Ubach (2002) refiere la utilización de anélidos como organismos indicadores de alteraciones por efecto de actividades antropogénicas en el ecosistema tomando en cuenta su estructura poblacional, señalando las zonas de descargas acuícolas y cercanas a la planta termoeléctrica con baja alteración antropogénica y muy alterada la zona cercana a las plantas procesadoras de alimentos, donde se observó una total desaparición de la macrofauna. Recientemente, Fajer-Ávila *et al.* (2006), estudiaron la diversidad parasitaria en la lisa *Mugil curema* como indicador de impacto antropogénico entre el Estero de Urías y el Estero Teacapán, señalando la baja presencia del nemátodo *Contracecum* sp en el sistema de Urías como respuesta a un escenario adverso para su potencial infectivo, caso contrario el copépodo *Ergasilus* sp, que registró una alta abundancia en el Estero de Urías característico de hospederos en condiciones de estrés, sugiriendo que las interacciones entre

hospederos y parásitos pueden reflejar las condiciones negativas que presenta un sistema estuarino.

Además de este escenario de estudios, el sector naval emite descargas de combustibles, aceites y sus derivados, pinturas anti-incrustantes, encontrándose actualmente el sistema con síntomas evidentes de degradación ambiental, lo cual pone en riesgo las especies acuáticas y finalmente a la población humana que las consume.

En el estero de Teacapán, la agricultura y ganadería son las principales actividades económicas y a esto puede deberse la presencia de plaguicidas en el sistema. Galindo-Reyes *et al.* (1992) encontraron cantidades bajas de DDT, lindano, isodrin, endrin, endosulfán, heptaclor y aldrin en sedimentos y agua del estero, sin detectar alguno de estos compuestos en camarones peneidos. Asimismo, Galindo-Reyes (2000) relaciona la mayor incidencia de residuos de plaguicidas encontrados en los meses de julio-septiembre con el inicio del ciclo agrícola de verano en los valles aledaños al estero y el arrastre de plaguicidas con la llegada de las lluvias. El plaguicida más frecuentemente encontrado fue el lindano, debido probablemente al empleo de esta sustancia en el combate de garrapatas y otros ectoparásitos del ganado, empleado en los potreros de Teacapán. En otro estudio realizado por Osuna-López *et al.* (2001) en sedimentos superficiales del Estero Teacapán y otras lagunas costeras, detectaron la presencia de DDVP, insecticida utilizado para el control de algunos minadores frutales, principalmente en los cultivos de mango aledaños al sistema. Recientemente Rodríguez-Preciado (2004) reportó altas concentraciones de mercurio en músculo de *Mugil curema* provenientes del Estero Teacapán, relacionando estas concentraciones con la influencia de la minería de oro y plata desarrollada en la zona serrana del sur de Sinaloa, la cual utilizó mercurio en la extracción de estos metales, siendo probablemente arrastrado por los ríos Baluarte, Cañas y sus arroyos tributarios hasta el sistema.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de las lagunas costeras en Sinaloa presentan síntomas de degradación ambiental ya que reciben descargas agrícolas, industriales y/o urbanas, lo cual pone en riesgo a las especies acuáticas y finalmente a la población humana. Estudios previos en algunas de estas lagunas detectaron la presencia de metales tóxicos, hidrocarburos poliaromáticos y compuestos organoclorados, la mayoría de los cuales son persistentes en el medio y causan efectos adversos en los organismos debido a sus propiedades cancerígenas, teratogénicas o alteradoras del sistema endocrino. Por esto es necesario evaluar la calidad y/o estrés ambiental en cada laguna costera y sus efectos en organismos residentes que además son de consumo humano. El análisis integrado de la información del presente estudio, permitirá valorar la condición ambiental y algunos efectos en los organismos e interpretar el grado de estrés ambiental en términos de relevancia ecológica. Por un lado, se propone el biomonitoreo conjunto de especies sésiles y móviles; el análisis de biomarcadores a nivel molecular y fisiológico, de exposición y de efecto, que puedan tener proyección a nivel de población y por ende de comunidades y del ecosistema. Por otro lado, el estudio tiene relevancia como herramienta para discernir la magnitud de la contaminación por xenobióticos y/o efectos de otros estresores ambientales entre ecosistemas costeros. Esto en un futuro, coadyuvará a proponer programas de biomonitoreo, evaluación de riesgo y remediación ambiental en los sistemas lagunar-estuarinos y/o aportará evidencias para implementar estrategias de regulación y control de descargas, aunado a programas de manejo y/o recuperación de los ecosistemas costeros.

#### **4. HIPÓTESIS**

La evaluación de biomarcadores (índices biológicos, HSP70 y CYP450) en *Mugil curema* y *Mytella strigata* registrará en su conjunto el grado de estrés ambiental que presenta cada ecosistema, esperando que, en base a los escenarios de contaminación en cada sistema, el Estero de Urías manifieste mayores indicadores de estrés ambiental.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la variación espacio-temporal de biomarcadores moleculares y biológicos en *M. curema* y *M. strigata* como indicadores de efectos biológicos por multi-estresores en tres lagunas costeras con diferente grado de impacto antropogénico.

##### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar la condición biológica de las especies seleccionadas mediante índices de condición (índice gonadosomático, índice hepatosomático (*M. curema*), índice de glándula digestiva (*M. strigata*) y factor de condición) en las tres lagunas costeras durante el periodo de estudio.

2. Medir la expresión de proteínas de estrés hsp70 en las especies seleccionadas como respuesta general a estresores ambientales en las tres lagunas costeras durante el periodo de estudio.

3. Medir la expresión de CYP450 (CYP1A en *M. curema* y CYP4 *M. strigata*) como posible respuesta de desintoxicación ocasionada por sustancias xenobióticas en las tres lagunas costeras durante el periodo de estudio.

4. Establecer las posibles relaciones causales entre biomarcadores moleculares (HSP70 y CYP450), índices fisiológicos y condiciones ambientales en las tres lagunas costeras durante el periodo de estudio.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Área de estudio

Se seleccionaron para su estudio, tres sistemas lagunares-estuarinos del sureste del Golfo de California con diferente grado y tipo de impacto antropogénico con la finalidad de realizar comparaciones entre ellos y analizar los escenarios de contaminación presentes a nivel regional.

Bahía de Ensenada del Pabellón (impacto agrícola) está localizada en el litoral costero del centro del estado de Sinaloa, entre los 24° 20' y 24° 50' de latitud norte y los 107° 20' y 107° 58' de longitud oeste (Fig. 1). El sistema lagunar se encuentra asociado a varios esteros y lagunas interiores, de las cuales destacan por su tamaño Bataoto, Caimanero y Chiricahueto y forman un complejo estuarino de aproximadamente 460 km<sup>2</sup>, incluyendo 100 km<sup>2</sup> de manglar. Geológicamente el origen de este sistema lagunar costero se clasifica como tipo III-A, según Lankford (1977) esto es, depresiones inundadas al borde continental, protegidas por barreras arenosas producidas por el oleaje y la corriente litoral. En el sistema se seleccionaron dos estaciones de estudio, siendo Mapachera la estación con mayor influencia de aportes agrícolas por la cercanía a los drenes de descarga donde se han reportado plaguicidas y metales pesados (Izaguirre-Fierro *et al.*, 1985) y la estación Guamuchilera que recientemente recibe descargas de granjas de camarón.

El Estero de Urías (impacto urbano-industrial) está localizado al sur de Sinaloa, entre los 23° 10' y 23° 13' de latitud norte y los 106° 20' y 106° 25' de longitud oeste (Fig. 1). Esta conformado por varios esteros tributarios de los cuales resaltan el Estero del Infiernillo, Estero Confites y Estero de la Sirena. El sistema tiene una extensión de 17 km y un área de 880 hectáreas; cuenta con una profundidad menor a 1 metro en los márgenes y llanuras de inundación y alcanza los 10 metros en el canal de navegación (Páez-Osuna *et al.*, 1990). Su origen geológico corresponde a la descripción de laguna costera de tipo III-A, según Lankford (1977). Fueron seleccionadas dos estaciones para su estudio siendo Juárez la estación cercana a la zona industrial y urbana del sistema y la estación Sirena ubicada en la zona más interna del sistema. Los agentes causantes

de la contaminación son muy diversos, con mayor impacto en la estación Juárez: la planta tratadora de aguas negras, las plantas procesadoras de alimentos pesqueros, el canal de PEMEX, los embarcaderos que albergan las flotas pesqueras y comerciales y las descargas directas de aguas residuales urbanas y provenientes de áreas turísticas. La estación Sirena recibe la influencia de los efluentes de una termoeléctrica, de la agricultura de temporal y aportes de la camaronicultura.

El Estero Teacapán (impacto agropecuario-minero) forma parte del complejo lagunar llamado Teacapán-Agua Brava-Marismas Nacionales, localizado al sur del estado de Sinaloa; colinda, con el estado de Nayarit y sus coordenadas son entre los 22° 28' y 22° 45' latitud norte y los 105° 38' y 105° 46' longitud oeste (Fig. 1). El Estero Teacapán se comunica al norte con el sistema litoral del Estero de Majahual mediante el Estero del Maíz. El sistema de Majahual está conformado por las lagunas de: Cerritos, Grande, Cañales, Sábalo y Agua Grande, recibiendo los afluentes de los ríos Baluarte y Cañas (Contreras, 1993), constituyendo un ecosistema de aproximadamente 5 mil hectáreas con un origen geológico de tipo III-A (Lankford, 1977). El Estero recibe contaminación por plaguicidas debido a las actividades agrícolas que se llevan a cabo en la región (Galindo, 2000; Osuna-López *et al.*, 2001). Además, recientemente se ha asociado la presencia de mercurio en organismos residentes a la influencia minera desarrollada en la zona serrana del sur de Sinaloa (Rodríguez-Preciado, 2004). Se seleccionaron dos estaciones de estudio con diferente influencia de actividad antropogénica ubicándose la estación Cruces más cercana a la actividad agrícola de temporal, pesca ribereña y cultivo de camarón (Berlangua, 1999). La estación Boca se ubica cercana a la influencia marina y adyacente a asentamientos humanos.

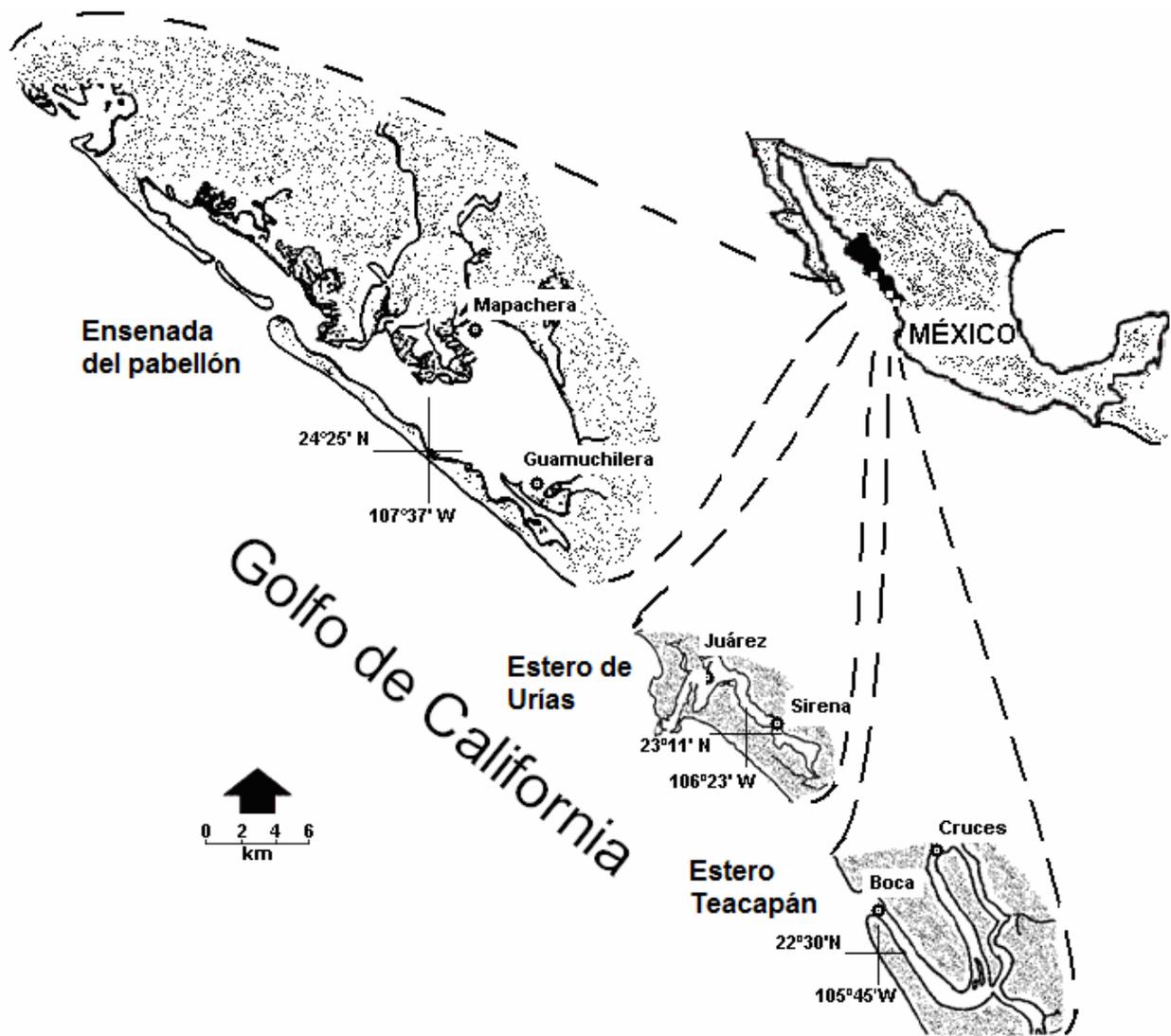


Figura 2. Ecosistemas bajo estudio y estaciones de muestreo. En orden latitudinal de norte a sur, se esquematizan: Ensenada del Pabellón, Estero de Urías y Estero Teacapán respectivamente.

## 6.2. Fase de campo

### 6.2.1. Recolecta de organismos

Se realizó un estudio anual (2005 a 2006) con cinco recolectas de organismos en cada sitio de estudio durante los periodos climáticos caracterizados como verano, otoño (2005), invierno, primavera y verano (2006). Se utilizaron lanchas de fibra de vidrio con motor fuera de borda equipadas con un vivero de flujo continuo de agua para mantener

a los organismos vivos en condiciones adecuadas y similares al medio externo, hasta su análisis. En cada ocasión, de cada estación de estudio se recolectaron 30 lisas dentro de cada sistema empleando una red de enmalle ó agallera de 120 a 300 m de largo, con altura de 5 m y tamaño de malla de 3.5 pulgadas; el material de construcción es nylon monofilamento número 0.55. La maniobra de captura consistió en una operación de cerco con la embarcación en movimiento rodeando el cardumen con la red. Dada la movilidad de la especie de estudio, generalmente se efectuó una sola captura para caracterizar la población del sistema, seleccionando los organismos de mayor talla. Ocasionalmente se utilizó una atarraya con luz de malla de dos pulgadas y doce metros de diámetro, operando entre 40 y 90 cm de profundidad.

Además, durante cada muestreo se recolectaron manualmente 96 mejillones por localidad (con una longitud mínima de 3.5 cm) directamente de los sistemas de raíces del manglar (sitios: Mapachera, Guamuchilera, Sirena y Cruces) y de estructuras de puentes y muelles (sitios: Juárez y Boca) (Tabla 2). La mitad de ellos (48) fueron recolectados de la zona detectada con mayor influencia antropogénica y el resto de una zona menos perturbada dentro del sistema, el cual se consideró como sitio de referencia interno.

Tabla 2. Fechas de recolección de organismos durante el periodo de estudio.

Época		Ver-05	Oto-05	Inv-06	Prim-06	Ver-06
Localidad y sitios						
Ensenada del Pabellón	Mapachera	Julio	Noviembre	Enero	Marzo	Julio
	Guamuchilera	2005	2005	2006	2006	2006
Estero de Urías	Juárez	Julio	Noviembre	Enero	Marzo	Julio
	Sirena	2005	2005	2006	2006	2006
Estero Teacapán	Cruces	Julio	Noviembre	Enero	Marzo	Julio
	Boca	2005	2005	2006	2006	2006

### **6.2.2. Parámetros ambientales de los sitios de estudio**

Se registraron de manera puntual la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la columna de agua ( $\leq 1$  m de profundidad) en cada estación de estudio al momento del muestreo (entre 9:00 am y 12:00 pm).

Para medir la temperatura se utilizó un termómetro marca Brannan (0 a 50 °C;  $\pm 1$  °C). La salinidad fue registrada con un refractómetro (Fisher) con compensador automático de temperatura (1 a 100 ups;  $\pm 1$  ups). El oxígeno disuelto se registró con un oxímetro (YSI modelo 95;  $\pm 0.1$  mg/l) aproximadamente a 50 cm de profundidad.

### **6.2.3. Procesamiento de organismos y fijación de muestras en campo**

Se procesaron por muestreo y localidad, de forma inmediata a su captura, 30 lisas y 48 mejillones de tallas y pesos similares para la obtención de registros morfométricos y fijación de tejidos para análisis molecular e histológico. Otros 48 mejillones se trasladaron al laboratorio en refrigeración a 4 °C para análisis de índices de condición biológica. Además, en cada sitio se recolectaron un par de muestras de tejido muscular del total de las lisas con 150 g aproximadamente para análisis de metales y contaminantes orgánicos respectivamente, de igual manera en cada sitio fueron recolectadas dos muestras de tejidos blandos de mejillones para los análisis antes mencionados (datos no incluidos en el presente trabajo).

En los peces ( $n=30$ ), se registraron los datos biométricos de longitud total (LT), longitud patrón (LP) y altura (A) con la ayuda de un ictiómetro convencional de  $60 \pm 0.1$  cm (Hubbs y Lagler, 1958). Asimismo, se pesó el organismo en una balanza (OHAUS E1D110) ( $\pm 0.1$  g). Posteriormente los peces fueron sacrificados por dislocación cervical, disectándose branquias, hígado y gónada con lavados de solución salina (KCl 1.15 %) para evitar contaminación de los tejidos con el medio. El hígado, gónadas e intestino fueron pesados.

Cada hígado se disectó en tres secciones; una primera muestra se fijó en formaldehído al 4 % (Luna, 1960) para análisis histológico, una segunda sección fue preservada en 1 ml de RNAlater (Amnion) para análisis molecular de Hsp70 y CYP1A.

El instrumental empleado para la disección de los tejidos fue lavado con isopropanol al 70% entre muestras. Las gónadas disectadas se pesaron y una muestra de tejido fue fijada en formaldehído al 4 % para su análisis histológico. Una tercera parte de tejido de cada órgano fue inmediatamente después colocada en nitrógeno líquido y posteriormente en hielo seco (CO<sub>2</sub>) para ser preservada y transportada al laboratorio a -80 °C, donde fueron almacenadas a la misma temperatura para análisis bioquímicos posteriores (considerados en proyecto general).

Los mejillones (n=48) de cada una de las estaciones de cada sistema lagunar fueron divididos en dos submuestras: la mitad (n=24) se disectó (individualmente) inmediatamente en tres partes, una parte para análisis moleculares (glándula digestiva; fijado en 1 ml de RNAlater), otra para análisis histológico (gónada y glándula digestiva) (fijado en formaldehído al 4 %) y una tercera parte (gónada, glándula digestiva y branquia) criopreservada a -80 °C de igual forma que los peces para análisis bioquímicos posteriores. La otra mitad (n=24) se transportó al laboratorio a 4 °C para análisis de condición biológica.

### **6.3. Fase de laboratorio**

#### **6.3.1. Análisis histológico**

Las muestras de hígado (lisas), glándula digestiva (mejillones) y gónada de aproximadamente 0.5 g fueron fijadas inmediatamente después de la disección de los organismos en formaldehído al 4 % hasta ser procesadas de acuerdo con Luna (1968). Los tejidos fijados se colocaron en histocassettes, se deshidrataron, aclararon y embebieron en parafina en un histoquinette (Tissue-Tek II). Se colocaron con parafina en un molde utilizando un histoembebedor (Leica Jung Histoembedder). A continuación los tejidos se cortaron a 5 µm de grosor en un microtomo (Jung Biocut Shandon) y fueron desparafinados a 50 °C. La rehidratación y tinción de los tejidos se realizó en un tren de tinción con solución de hematoxilina-eosina (H&E). Se fijaron los tejidos teñidos con resina sintética en cubreobjetos y finalmente se dejaron secar a 37 °C (Luna, 1968).

El sexo de los peces y los mejillones se identificó por histología de la gónada; los cortes histológicos fueron observados en un microscopio óptico (OLYMPUS Bx60) a 5x, 10x, 40x y 60x y las imágenes se capturaron en un sistema digital integrado (OLYMPUS 3040). La identificación de los estadios de maduración gonádica en peces se realizó con base en los estadios de maduración ovárica establecidos por Merson *et al.* (2000) y los estadios de maduración testicular establecidos por Gutiérrez-Rivera (2002). La identificación de los estadios de maduración gonádica en mejillones se realizó con base en los estadios de maduración gonadal de Cuevas-Guevara (1978) y Rogers y García-Cubas (1980).

Los tejidos hepáticos (peces) y de glándula digestiva (mejillones) fueron procesados histológicamente y almacenados para posteriores estudios histopatológicos (no contemplados en el presente estudio).

### **6.3.2. Análisis de expresión génica de Hsp70 y CYPs**

El RNA total fue extraído con Trizol (Gibco-Invitrogen) y tratado con DNAsal (Promega). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a 45 °C con la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) en presencia de random primers (Promega).

Para *Mugil curema* previamente se diseñaron oligos específicos para CYP1A a partir de un fragmento de cDNA clonado y secuenciado en el laboratorio de Biología Molecular del CIAD Unidad Mazatlán (GenBank: AY827103) (González-López, 2005), amplificando un producto de 200 bases. De igual forma en este estudio se diseñaron oligos degenerados para Hsp70 a partir de secuencias de bases de datos GenBank. (AY195744, ORZHSC70, NM\_131397, DRHSC70, AY436786, AB176855, AB176854). El fragmento amplificado de aproximadamente 350 bases fue clonado y secuenciado, obteniendo una secuencia de 354 bases, de la cual se diseñaron oligos específicos que amplificarán un fragmento de 211 bases. Además, como control interno de la integridad del RNA se diseñaron oligos específicos del gen 28S rRNA de *M. curema* (GenBank: AF152159), cuyo producto de PCR es de 197 bases.

Para *Mytella strigata* fueron diseñados oligos degenerados para amplificar los genes Hsp70, CYP y 18S rRNA a partir de secuencias de otras especies de bivalvos (GenBank: AF172607, AY861684.1, AF144646 y OED318883 para Hsp70; AY522924.1, AF072855 y AF072853 para CYP4; X91974 y X91978 para 18S rRNA). Los productos de PCR fueron purificados, clonados y secuenciados obteniendo secuencias de 270, 356 y 415 bases para Hsp70, CYP4 y 18S rRNA respectivamente. A partir de estas secuencias se diseñaron oligos específicos para amplificar fragmentos de 173, 193 y 219 bases para Hsp70, CYP4 y 18S rRNA respectivamente.

#### **6.3.2.1. PCR en tiempo real**

La expresión cuantitativa de Hsp70 y CYP450 se evaluó por PCR en tiempo real en cinco organismos (c/u triplicado) de cada ecosistema y época del año. La submuestra fue seleccionada representativamente de una muestra total de 30 organismos en base a un análisis previo por PCR convencional. Los análisis de cuantificación de la expresión de Hsp70 y CYP450 se llevaron a cabo en un equipo para PCR en tiempo real (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System Applied Biosystems), utilizando SYBR green<sup>®</sup> y el método de curva estándar para cuantificación relativa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por triplicado en microplacas de 96 pozas con el siguiente protocolo: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 40 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Se realizaron diluciones seriadas de cDNA para amplificar cada gen con el objeto de construir la curva estándar correspondiente. Las curvas se calcularon por análisis de regresión lineal usando los valores de ciclo umbral ( $C_T$ ) y el logaritmo del número de copias ( $\log Co$ ) obtenido del análisis de diluciones seriadas. El número de copias de muestras desconocidas se calculó de la siguiente manera:  $[(C_T - b)/m]$  donde  $b$ =intercepto,  $m$ =pendiente. Los datos normalizados de  $Co$  se determinaron dividiendo  $Co$  del gen de interés (Hsp70 o CYP450) entre  $Co$  del control interno (28S y 18S rRNA para lisa y mejillón respectivamente). Una vez normalizados los datos, se determinó el promedio del nivel de expresión de Hsp70 y CYP450 (en unidades arbitrarias) para

cada mes/sitio de muestreo y estos valores fueron divididos entre el calibrador (el grupo con menor nivel de expresión, considerado como expresión basal).

### 6.3.3. Índices de Condición

A partir de los datos morfométricos, se calculó en índice gonadosomático (IGS) de los peces por medio de la ecuación propuesta por Rossenblum *et al.* (1987), tomado de Rodríguez y Marañón (1993) sustituyendo de la fórmula el peso total (Wt) por el peso total eviscerado (Wte).

$$\text{IGS} = (\text{Wg} / \text{Wte}) \times 100$$

Donde

Wg = Peso fresco de la gónada (g)

Wte = Peso fresco del ejemplar eviscerado (g)

Índice hepatosomático (IHS) de peces, según Busacker *et al.* (1990) sustituyendo de la fórmula el peso total (Wt) por el peso total eviscerado (Wte), por medio de la ecuación

$$\text{IHS} = (\text{Wh} / \text{Wte}) \times 100$$

Donde

Wh = Peso fresco del hígado en (g)

Wte = Peso fresco del ejemplar eviscerado (g)

Factor de condición (FC) de peces (Ricker, 1975; Lagler, 1978; Medina, 1980; Busacker *et al.* 1990) sustituyendo de la fórmula el peso total (Wt) por el peso eviscerado (We).

$$\text{FCM} = (\text{We} / \text{Lp}^b) \times 10$$

Donde

FC = Factor de condición

We = Peso del animal eviscerado (g)

Lp = Longitud patrón (cm)

b = Coeficiente de regresión de la longitud patrón

La constante “b” se obtiene del modelo de regresión del logaritmo natural de la longitud patrón (Lp) que es la variable explicativa en donde el peso (We) es la variable de respuesta.

En los mejillones el índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) fueron calculados siguiendo las ecuaciones de los índices de peces, con la diferencia de utilizar pesos secos de los órganos, además es utilizado el índice de condición (IC) de acuerdo con Rainer y Mann (1992), de la siguiente manera:

$$\text{IGS} = (\text{dWg} / \text{dWtsg}) \times 100$$

Donde

IGS = Índice gonadosomático

dWg = Peso seco de la gónada (g)

dWtsg = Peso seco total de tejidos del ejemplar sin gónada (g)

$$\text{IGD} = (\text{dWh} / \text{dWtsg}) \times 100$$

Donde

IGD = Índice de glándula digestiva

dWh = Peso seco de la glándula digestiva (g)

dWtsg = Peso seco total de tejidos del ejemplar sin gónada (g)

$$\text{IC} = (\text{dWtsg} / \text{dWc}) \times 100$$

Donde

dWtsg = Peso seco total de tejidos del ejemplar sin gónada (g)

dWc = Peso seco de las conchas (g)

#### **6.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico contempló pruebas de homocedasticidad. Los datos de cada sitio y época de muestreo se analizaron inicialmente para identificar posibles diferencias entre machos y hembras para cada variable estudiada mediante pruebas de

t-student o Mann-Whitney (según la homocedasticidad de los grupos de datos). Esto definió si el análisis posterior de cada variables se realizara separando los sexos o en conjunto. Para el análisis de cada respuesta biológica, se realizó un análisis de varianza de una y dos vías (Dunns y Tukey respectivamente) acoplado con análisis de comparaciones pareadas para identificar posibles diferencias entre localidad y época de muestreo para las distintas variables a estudiar (Zar, 1999) (datos no homocedásticos fueron previamente transformados con raíz cuadrada). Para análisis de proporciones de sexos se utilizó la prueba Z. Asimismo, se realizaron pruebas de correlación de Pearson entre las distintas variables para identificar posibles correspondencias entre biomarcadores e índices de condición en el plano espacial y temporal para cada especie. Los análisis de datos fueron realizados mediante el programa estadístico SigmaStat 3.0®.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1. Parámetros ambientales**

Las condiciones ambientales de un ecosistema desempeñan un papel importante en los organismos que lo habitan estimulando cambios conductuales, fisiológicos y de salud. Entre los principales factores abióticos en los ecosistemas estudiados se encuentran la temperatura (afectando los procesos biológicos), la salinidad (afectando la osmoregulación) y el oxígeno disuelto en el agua (interviene en el metabolismo de las actividades energéticas) (Spanopoulos *et al.*, 2005).

En el presente estudio se realizaron cinco muestreos durante un período anual entre el verano de 2005 y verano de 2006 que involucraron la medición puntual de las variables de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua en seis sitios ubicados en tres ecosistemas de la costa sureste del Golfo de California.

#### **7.1.1. Temperatura**

En Ensenada del Pabellón, la estación conocida como Mapachera registró una temperatura promedio anual de 25 °C con un máximo en verano de 2005 y 2006 de 30 °C y el mínimo en invierno de 2006 (enero de 2006) con 18 °C, mientras que la estación Guamuchilera registró un promedio anual de 27 °C con un máximo en verano de 2005 de 33 °C y un mínimo en invierno de 2006 con 20 °C (Fig. 3).

En el Estero de Urías la temperatura promedio durante el período de estudio en la estación Juárez fue de 27 °C con un máximo en verano de 2005 y 2006 de 32 °C y un mínimo en invierno de 2006 de 22 °C, mientras en la estación Sirena el promedio anual fue 29 °C con máxima en verano de 2005 de 34 °C y mínima en invierno de 2006 de 23 °C (Fig. 3), registrando un promedio de 2 °C más que Juárez, lo que podría deberse a la cercanía de Sirena con los efluentes sobrecalentados de la termoeléctrica “José Aceves Pozos” y/o a las características someras y de bajo dinamismo en el recambio de agua por estar al final de un sistema con una sola boca.

En el Estero Teacapán la temperatura promedio anual en la estación de Boca fue de 27 °C con un máximo en verano de 2005 y 2006 de 30 °C y un mínimo en invierno

de 2006 de 24 °C, mientras que en Cruces la temperatura promedio anual fue mayor con 28 °C con un máximo de 31 °C en verano de 2005 y un mínimo de 25 °C en invierno de 2006 (Fig. 3).

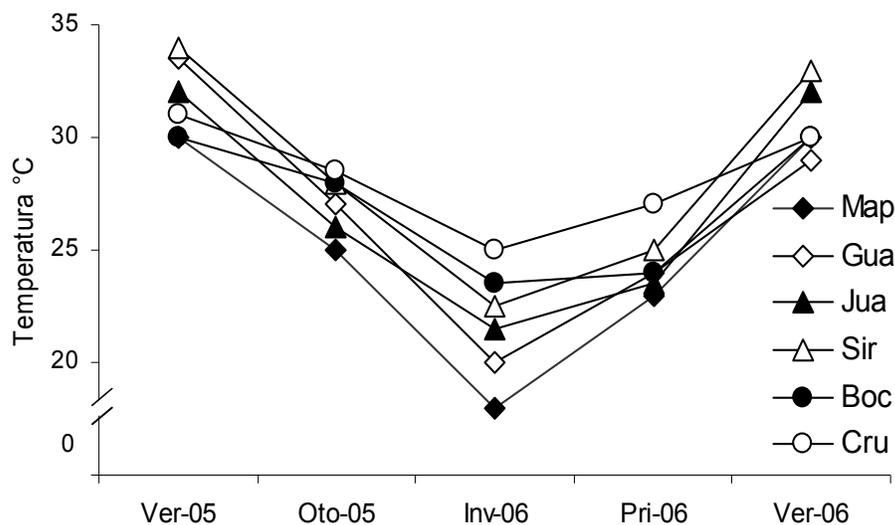


Figura 3. Temperatura del agua (°C) en las estaciones de estudio durante el período comprendido de verano de 2005 a verano de 2006. Map: Mapachera, Gua: Guamuchilera (Ensenada del Pabellón); Jua: Juárez, Sir: Sirena (Estero de Urías); Boc: Boca, Cru: Cruces (Estero Teacapán).

### 7.1.2. Salinidad

En Ensenada del Pabellón, Mapachera registró una salinidad promedio anual de 35 ups (unidades prácticas de salinidad) con un máximo en verano de 2005 de 40 ups y el mínimo en primavera de 2006 con 31 ups, mientras que la estación Guamuchilera registró un promedio anual de 34 ups con un máximo en verano de 2006 de 40 ups y un mínimo en verano de 2005 de 30 ups (Fig. 4).

En el Estero de Urías la salinidad promedio durante el período de estudio en la estación Juárez fue de 36 ups con un máximo en invierno de 2006 de 39 ups y un mínimo en verano de 2005 de 32 ups, mientras en la estación Sirena el promedio anual fue 37 ups con máxima en invierno de 2006 de 40 ups y mínima en otoño de 2005 de 36 ups (Fig. 4); es probable que Sirena presente una menor tasa de recambio de agua y un mayor índice de evaporación debido a lo somero y/o su lejanía con la boca del

sistema respecto a la estación Juárez que por su parte tiene una mayor influencia de efluentes antropogénicos pero con una mayor tasa de renovación de agua (Álvarez-León, 1980).

En el Estero Teacapán la salinidad promedio anual en la estación de Boca fue de 33 ups con un máximo en invierno de 2006 de 38 ups y un mínimo en otoño de 2005 de 19 ups, mientras que en Cruces la salinidad promedio anual fue mayor con 37 ups con un máximo de 44 ups en verano de 2006 y un mínimo de 31 ups en otoño de 2005 (Fig. 4). La baja de salinidad registrada en otoño de 2005 en la estación de Boca fue, al menos en parte, debido a un inhabitual incremento en la precipitación pluvial registrada a finales del verano de 2005 (CNA, 2005) y podría tener relevancia en las condiciones fisiológicas de los organismos (Innes y Haley, 1977).

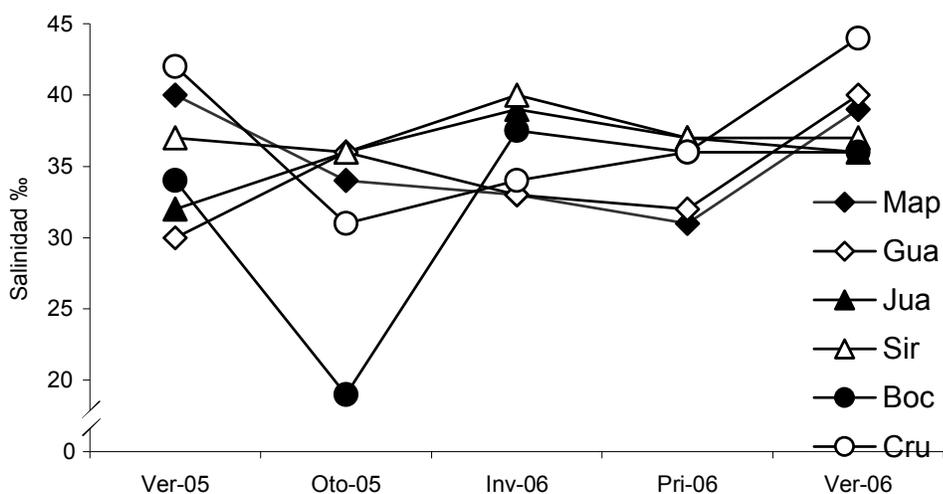


Figura 4. Salinidad del agua (ups) en las estaciones de estudio durante el período comprendido de verano de 2005 a verano de 2006. Map: Mapachera, Gua: Guamuchilera (Ensenada del Pabellón); Jua: Juárez, Sir: Sirena (Estero de Urías); Boc: Boca, Cru: Cruces (Estero Teacapán).

### 7.1.3. Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto en el agua fue el parámetro con mayores variaciones en todos los sistemas, el cual particularmente en sistemas estuarinos es afectado por una serie de factores tales como el fotoperiodo (horas luz), variación diurna, carga de

productores primarios y materias orgánica, hidrodinámica del sistema entre otros. En Ensenada del Pabellón, la estación Mapachera registró un promedio anual de oxígeno disuelto en el agua de 4.78 mg/l con un máximo en invierno de 2006 de 8.7 mg/l y mínimo en otoño de 2005 con 1.73 mg/l, mientras que la estación Guamuchilera registró un promedio anual de 5.77 mg/l con un máximo en invierno de 2006 de 9.8 mg/l y un mínimo en otoño de 2.24 mg/l (Fig. 5). La baja en oxígeno disuelto en otoño de 2005 se puede deber ocasionalmente a la oxidación de materia orgánica resuspendida y/o arrastrada por las lluvias a través de efluentes provenientes de la agricultura intensiva y actividades suburbanas que se realizan alrededor del sistema (Ruíz *et al.*, 2003).

En el Estero de Urías el oxígeno disuelto promedio durante el período de estudio en la estación Juárez fue de 4.32 mg/l con un máximo en invierno de 2006 de 6.4 mg/l y un mínimo en verano de 2006 de 3.13 mg/l, mientras en la estación Sirena el promedio anual fue 4.69 mg/l con máxima en invierno de 2006 de 4.02 mg/l y mínima en otoño de 2005 de 3.65 mg/l (Fig. 5).

En el Estero Teacapán el oxígeno disuelto promedio anual en la estación de Boca fue de 5.47 mg/l con un máximo en invierno de 2006 de 9.22 mg/l y un mínimo en otoño de 2005 de 3.44 mg/l, mientras que en Cruces el promedio anual fue de 5.05 mg/l con un máximo de 6.84 mg/l en verano de 2005 y un mínimo de 2.71 mg/l en verano de 2006 (Fig. 5).

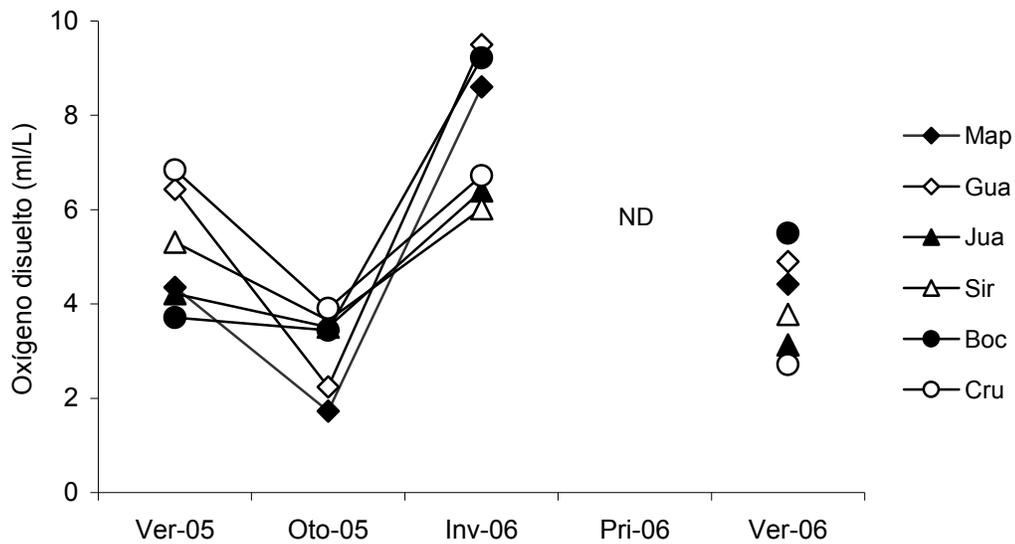


Figura 5. Oxígeno disuelto en el agua ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ) en las estaciones de estudio durante el período comprendido de verano de 2005 a verano de 2006. (ND) No se dispuso de datos. Map: Mapachera, Gua: Guamuchilera (Ensenada del Pabellón); Jua: Juárez, Sir: Sirena (Estero de Urías); Boc: Boca, Cru: Cruces (Estero Teacapán).

## 7.2. Recolección de muestras

Durante el periodo de estudio se recolectaron muestras de organismos (lisas y mejillones) para los diferentes análisis (histológicos, moleculares, índices de condición) con un total de 412 lisas procedentes de los tres sistemas lagunares y 1, 752 mejillones divididos en las seis estaciones correspondientes a las tres localidades de estudio.

### 7.2.1. *Mugil curema*

#### 7.2.1.1. Proporción de sexos de *M. curema*

Se identificó histológicamente el género de los organismos para determinar la proporción de sexos y desarrollo gonadal de 393 lisas recolectadas durante el periodo de estudio en los tres ecosistemas de interés, de las cuales 105 fueron recolectadas en Ensenada del Pabellón con una proporción global de 8:1 (hembras:machos), 139 organismos del Estero de Urías en proporción de 3:1 y 149 organismos del Estero de Teacapán con una proporción de 7:1. En casi todas las épocas del año donde se obtuvieron organismos se registró mayor proporción de hembras con diferencias

significativas ( $z \geq 2.278$ ,  $p \leq 0.023$ ) respecto a la proporción de machos (Tabla 3 y Fig. 6) incluso cuando la prueba fue analizada con valores esperados de 2:1 y 4:1 registrados en un estudio previo realizado por Ríos-Sicairos (2004) en el estero de Urías y Estero Teacapán respectivamente utilizando la misma metodología de captura. Sin embargo, los registros previos para la especie en lagunas costeras de otras latitudes del Océano Pacífico y Atlántico señalan que la proporción de sexos es equilibrada (Yáñez-Arancibia, 1976; Collins, 1985) y aún cuando las proporciones pueden variar de acuerdo a la época del año, la escala poblacional tiende a ser 1:1 (Briones *et al.*, 2002). No se descartan alteraciones por artefactos de toma de muestra, presión de pesca o comportamientos poblacionales particulares; incluso se ha demostrado que en algunas especies de peces en estadios tempranos expuestas a compuestos estrogénicos como PCBs (Aroclor), plaguicidas (lindano, DDT, DDE), compuestos aromáticos y otras mezclas de contaminantes ocurren alteraciones a nivel bioquímico y fenotípico en la diferenciación sexual induciendo feminización y hermafroditismo (Devlin y Nagahama, 2002). García-Gasca *et al.* (en prep.) han registrado la presencia de un caso de hermafroditismo en *M. curema* en el estero de Urías; incluso se ha reportado que *M. cephalus* ha presentado cambios en la proporción de sexos de la población dependiendo de la edad de los organismos, siendo ésta una especie cercanamente emparentada a *M. curema*; sin embargo, en el presente estudio no se identificaron organismos con hermafroditismo, lo cual indica una baja incidencia de inversión sexual al menos en organismos adultos.

Tabla 3. Proporción de sexos en *Mugil curema* durante cada época de estudio. El (\*) indica diferencias entre proporciones de sexos (prueba Z, 1:1).

	Ensenada del Pabellón		Estero de Urías		Estero Teacapán	
	hembras	Machos	hembras	machos	hembras	machos
Verano-05	--	--	1.67	: 1	*14	: 1
Otoño-05	*30	: 0	*3.29	: 1	*4	: 1
Invierno-06	*6.25	: 1	1.78	: 1	*3.83	: 1
Primavera-06	*4.8	: 1	*14	: 1	*9	: 1
Verano-06	*7.5	: 1	*4	: 1	*29	: 1
PROPORCIÓN	8.54	: 1	3.21	: 1	7.27	: 1

Por otro lado, la constante desproporción de sexos a favor de las hembras en los tres ecosistemas podría estar influenciada por factores antropogénicos y causar alteraciones a nivel de la estabilidad poblacional de *M. curema*, cambios en el flujo de energía a través de las cadenas tróficas y ocasionalmente dicha condición puede indicar alteraciones en otros grupos de organismos y pérdida de la salud del ecosistema. Pese a la notable diferencia en la proporción de sexos registrada, se requiere mayor información y nuevos estudios que expliquen dicha condición en el área de estudio.

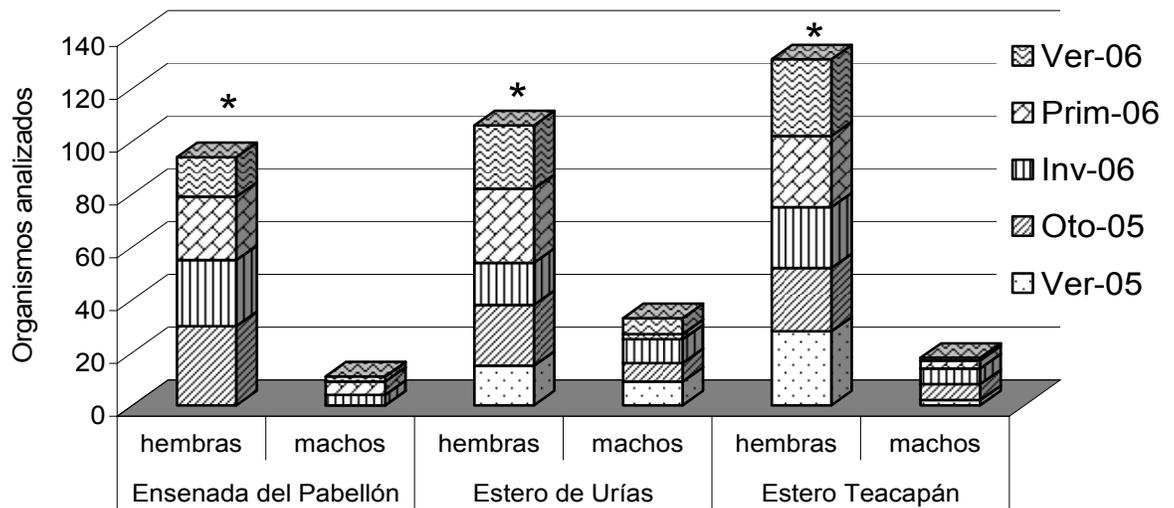


Figura 6. Comparación de la proporción de sexos en *Mugil curema* de los tres sistemas durante el periodo de estudio. El (\*) indica diferencias entre proporciones de sexos partiendo de una proporción esperada (1:1). No se dispuso de datos en verano de 2005 en Ensenada del Pabellón.

### **7.2.1.2. Índices de condición biológica de *M. curema***

#### **7.2.1.2.1. Índice Gonadosomático (IGS) de *M. curema***

El índice gonadosomático (IGS) está en función de la proporción del tejido gonadal respecto al peso corporal del organismo, lo que es directamente proporcional al desarrollo y maduración gonadal (Rodríguez y Maraño, 1993). De igual forma, el análisis histológico de desarrollo gonadal realizado en el presente estudio en *M. curema* corresponde en sus estadios de maduración avanzada con el IGS mayor, tanto en hembras como en machos, por lo que en conjunto pueden ser utilizados para comparar la salud reproductiva de las poblaciones de cada ecosistema (Devlin y Nagahama, 2002).

Los registros del IGS de *M. curema* fueron mayores en las hembras respecto a los machos ( $p < 0.05$ ) durante los meses de mayor actividad reproductiva, la cual ocurrió en la primavera de 2006 en ambos sexos para los tres ecosistemas con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de las épocas de estudio (Fig. 7). La mayor actividad reproductiva registrada durante la época de primavera coincide con el pico reproductivo de la especie en estudios previos en el área y otras latitudes de las costas del Pacífico y Atlántico (García-Gasca *et al.* en prep; Yañez-Arancibia, 1976; Collins, 1985). Por otro lado, en el Estero Teacapán se identificaron organismos de ambos sexos con gónadas de avanzado desarrollo durante el otoño de 2005 sin registrar diferencias ( $p > 0.05$ ) respecto al resto de las épocas analizadas debido a la heterogeneidad del IGS en los organismos. Sin embargo la capacidad de los organismos de presentar dos épocas de reproducción en un lapso anual en el estero Teacapán, puede ser un indicador de buena salud reproductiva de la población que es capaz de invertir energía en la reproducción cuando las condiciones ambientales son favorables, como posiblemente ocurrió durante las altas precipitaciones pluviales registradas en el verano y otoño de 2005 en el sistema (CNA, 2005) donde la temperatura del agua fue superior y la salinidad inferior al resto de las localidades de estudio (Fig. 3 y Fig. 4), los cuales son factores que posiblemente influyeron para

enriquecer la productividad del sistema y la disponibilidad de alimento que en conjunto pueden propiciar la maduración sexual de la población (Lee, 1981).

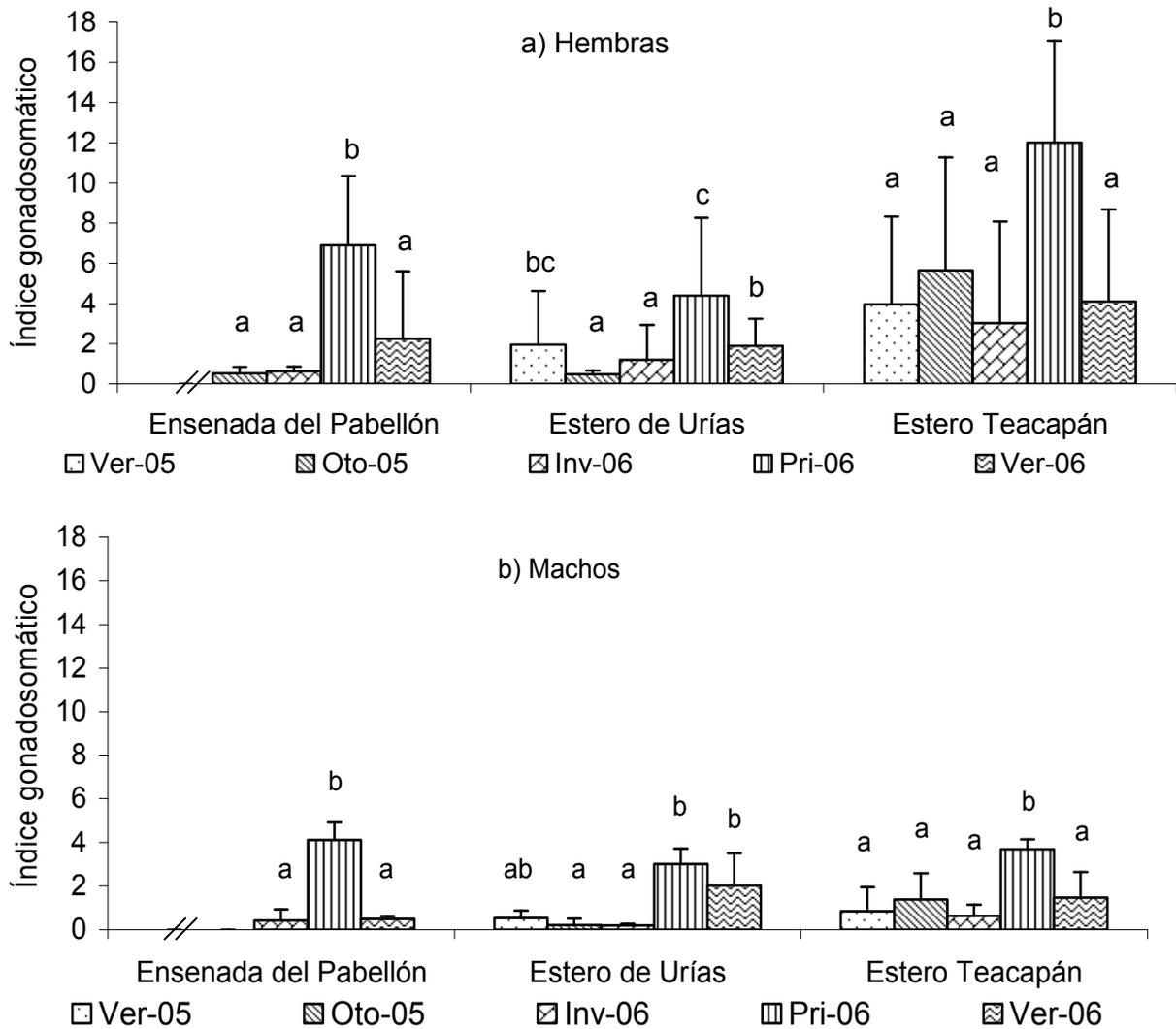


Figura 7. Comparación temporal del índice Gonadosomático de hembras (arriba) y machos (abajo) de *Mugil curema*. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para cada sistema. (//): no se dispuso de datos.

Además de identificar dos épocas de maduración gonádica en los organismos del estero Teacapán, las hembras presentaron una mejor condición reproductiva durante el periodo de estudio con IGS significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en otoño y primavera respecto a los otros sistemas. Asimismo, Ensenada del Pabellón presentó hembras con IGS significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) respecto al estero de Urías en la primavera que fue la época de mayor potencial reproductivo (Fig. 8). Allen *et al.* (1999) mencionan que la edad de los organismos y la condición latitudinal entre ecosistemas pueden ser factores que influyen en la condición reproductiva de las poblaciones. Sin embargo, West *et al.* (2001) señalaron que la capacidad reproductiva de los organismos (en términos de IGS) también puede ser afectada por contaminantes como PAHs y PCBs, reportados previamente en el estero de Urías por Galindo-Reyes *et al.* (2003), los cuales pueden alterar entre otros a procesos hormonales y disminuir la producción de vitelogenina en hembras, actuando así como inhibidores en el número de huevos, su eclosión y viabilidad de los embriones (Nicolas, 1999). Bajo este contexto, la salud reproductiva de *M. curema* en el estero Teacapán puede ser un referente para el resto de los ecosistemas estudiados.

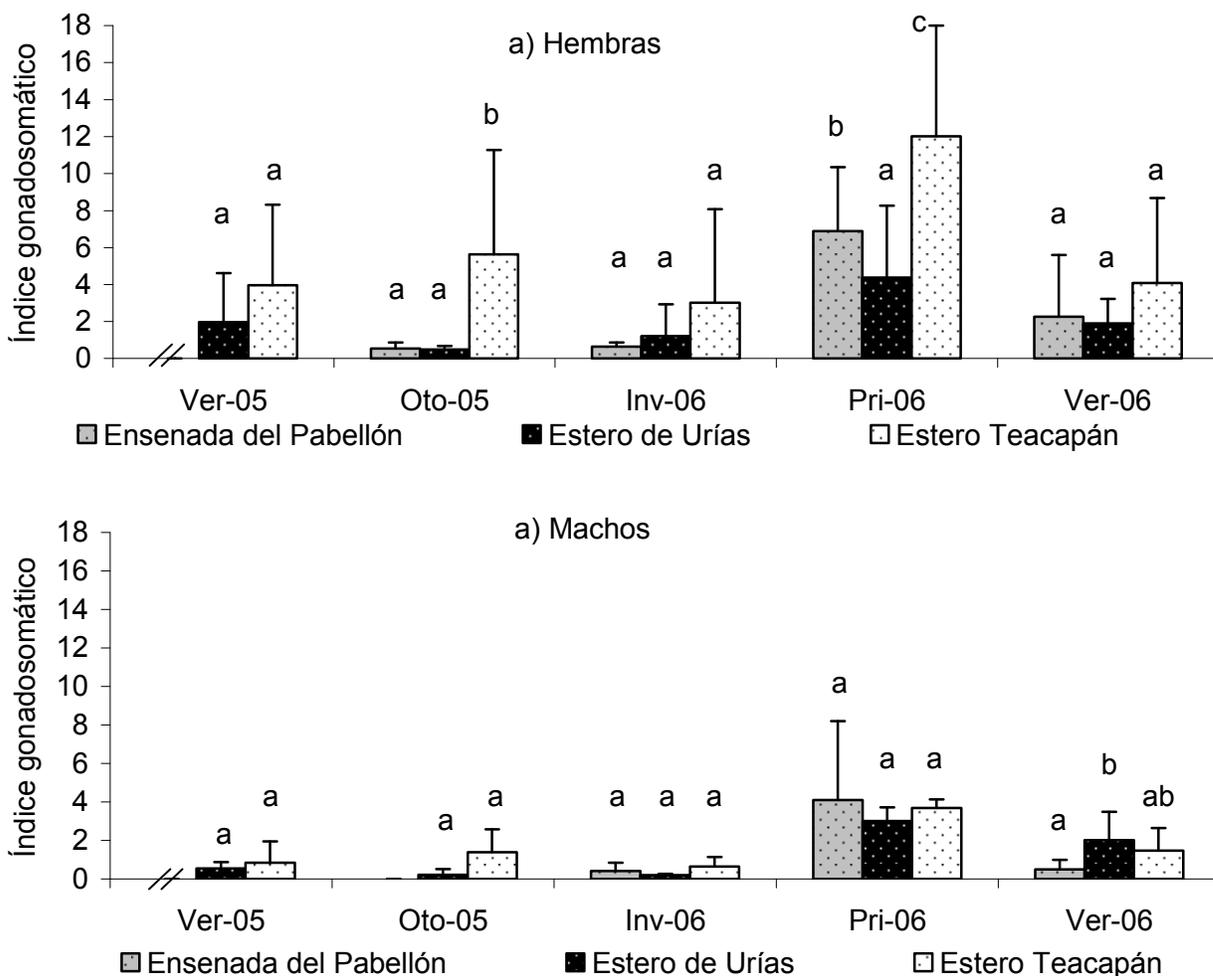


Figura 8. Comparación espacial del índice Gonadosomático de a) Hembras y b) machos de *Mugil curema*. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sistemas para cada época. (//): no se dispuso de datos.

Por otro lado, en los machos no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) en el IGS a través del tiempo a excepción del verano de 2006 donde fue mayor en el estero de Urías ( $n=3$ ). Sin embargo, en términos de requerimientos energéticos para la reproducción, los machos invierten un menor esfuerzo respecto a las hembras, por lo tanto, éstas reflejan mejor las diferencias entre sistemas.

### 7.2.1.2.2. Índice Hepatosomático (IHS) de *Mugil curema*

Las alteraciones en el tamaño del hígado pueden reflejar cambios en el metabolismo y reservas de energía en los organismos (Schmitt y Dethloff, 2000) razón por la cual, el IHS es usado como un indicador de la condición fisiológica y de salud de los organismos (Kirby *et al.*, 2000). En este estudio el IHS de *M. curema* no registró diferencias entre sexos ( $p > 0.05$ ) y fue mayor en primavera y verano con respecto a otoño e invierno ( $p < 0.05$ ) observándose un decremento significativo del IHS los tres sistemas (Fig. 9). El ciclo anual del IHS de *M. curema* confirma las observaciones de un estudio previo en el área (Ríos-Sicairos, 2004) y puede estar relacionado al metabolismo de procesos funcionales del organismo en la época reproductiva (primavera), en términos de síntesis de vitelogenina en el hígado y la eventual transferencia de reservas energéticas en la maduración sexual (Lenhardt y Predrag, 2000; Fanta *et al.*, 2003).

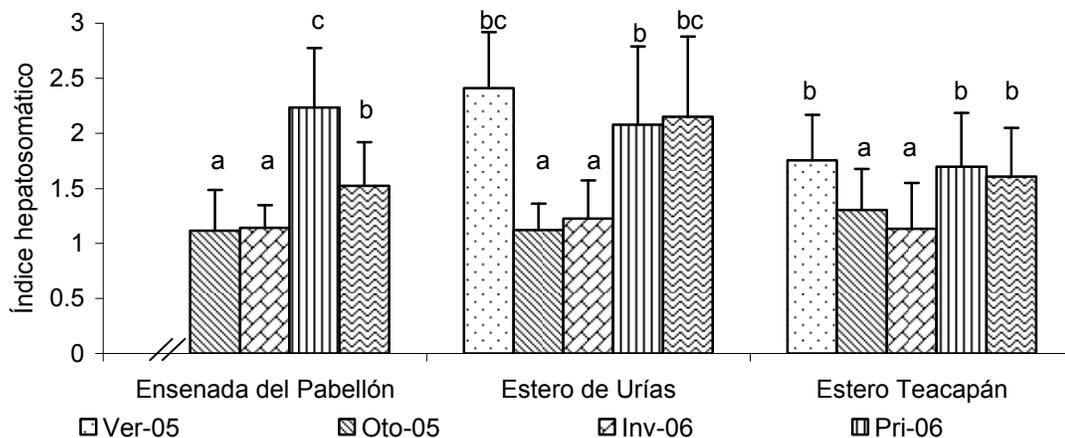


Figura 9. Comparación temporal del índice hepatosomático de *Mugil curema* en los tres sistemas de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para casa sistema. (//): no se dispuso de datos.

Sin embargo, el incremento en el peso del hígado relacionado con la síntesis y transferencia de reservas energéticas (vitelo) ocurre previamente al desove (Schmitt y Dethloff, 2000) durante la primavera, seguido de una baja actividad y teóricamente una

disminución del IHS. En el Estero de Urías, el promedio del IHS fue mayor en verano de 2005 (2.41) y 2006 (2.15) respecto al resto de las épocas, lo que podría indicar una respuesta metabólica en el hígado del organismo a la presencia de compuestos exógenos y otros estresores ambientales. Kirby *et al.* (2004) analizaron disfunción endocrina en poblaciones del lenguado *Platichthys flesus* expuestos a contaminación estrogénica en ecosistemas estuarinos y reportan un incremento del 30 % en el IHS de sitios contaminados respecto al sitio de referencia, descartando una correlación con la síntesis de vitelogenina y asociando su incremento a los procesos metabólicos de desintoxicación por exposición a PAHs. Por su parte, Facey *et al.* (2005) sugieren que el IHS puede ser utilizado como biomarcador para monitoreo de calidad ambiental debido a que los peces expuestos a ambientes con la presencia de PAHs, PCBs y metales pesados presentan un IHS elevado ya que el hígado actúa en la desintoxicación de contaminantes y su exposición puede causar un incremento en su tamaño por hipertrofia (aumento de volumen) y/o hiperplasia (aumento de número) de hepatocitos.

Otro hecho que puede sugerir la exposición de *M. curema* del estero de Urías a compuestos xenotóxicos capaces de activar procesos hepáticos de desintoxicación, es el registro de niveles significativamente mayores o iguales en el IHS durante el periodo de estudio (diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en primavera y verano de 2005 y 2006) con respecto al resto de los ecosistemas con excepción de Ensenada del Pabellón en primavera (Fig. 10), considerando que el esfuerzo reproductivo observado en el IGS fue significativamente menor en el estero de Urías. Además, históricamente el estero de Urías ha estado expuesto a desechos industriales y contaminación urbana con sustancias tales como hidrocarburos, plaguicidas, metales pesados, PCBs y otras mezclas químicas (Ruelas y Páez, 2000; Galindo-Reyes *et al.*, 1992; Soto y Páez, 2001; Galindo-Reyes *et al.*, 2003) las cuales han sido reportadas como sustancias xenobióticas que activan los sistemas de oxidasas de función mixta (MFO) en el hígado de peces para su conjugación orgánica y posterior excreción (Arinç *et al.*, 2000).

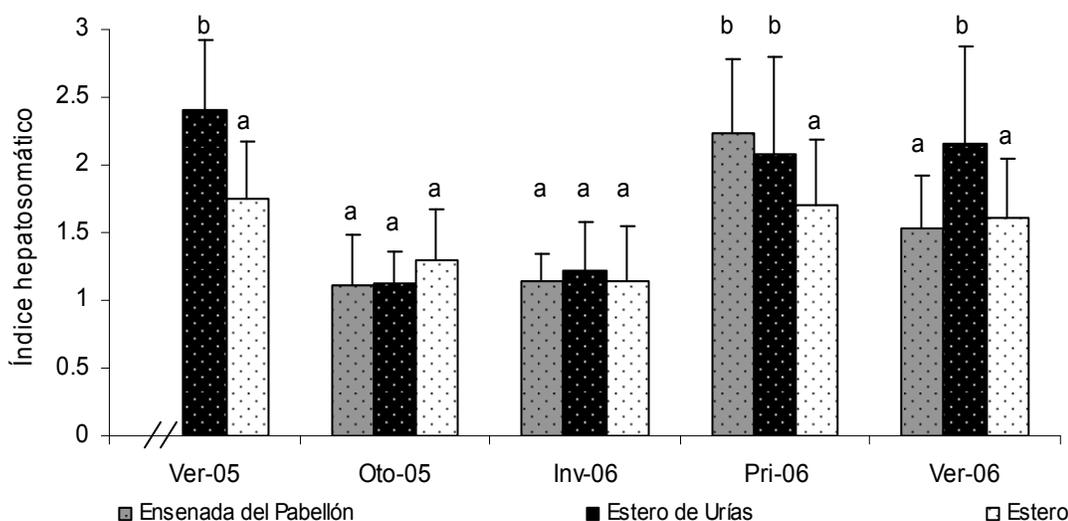


Figura 10. Comparación espacial del Índice Hepatosomático promedio de *Mugil curema* entre los tres sistemas de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sistemas para cada época. (//): no se dispuso de datos.

### 7.2.1.2.3. Factor de Condición (FC) de *M. curema*

El factor de condición (FC) es un índice fisiológico del organismo utilizado en acuicultura y estudios de biomonitorio ambiental como indicador del estatus nutricional y reproductivo, efectos de patógenos y exposición a químicos tóxicos que pueden causar interacciones proporcionales de talla y peso por debajo de lo normal (Schmitt y Dethloff, 2000). En el presente estudio el FC no registró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) espacio-temporales entre sexos por lo que los organismos fueron analizados en conjunto. De acuerdo a los resultados, para el ecosistema de Ensenada del Pabellón no se observó una estacionalidad bien definida, aunque el FC promedio máximo en la primavera (0.43) si presentó diferencias ( $p < 0.05$ ) respecto al valor mínimo (0.39) registrado en el verano de 2006, condición contraria a lo esperado de acuerdo con el ciclo reproductivo de los peces donde la acumulación de reservas ocurre los meses posteriores al desove y el FC disminuye durante el metabolismo de ácidos grasos en el periodo de transferencia energética previo a la maduración gonádica (Rodríguez y Maraño, 1993). Dicho comportamiento sí se observó en el Estero de Urías donde el promedio máximo del FC se registró en verano de 2006 (0.53) y el mínimo en primavera

(0.48) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las épocas de verano y otoño con respecto a invierno y primavera. De igual manera, el FC en los organismos del Estero Teacapán registró el promedio mínimo en la primavera (0.76) observando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al resto de las épocas de estudio (Fig. 11 y Fig. 12).

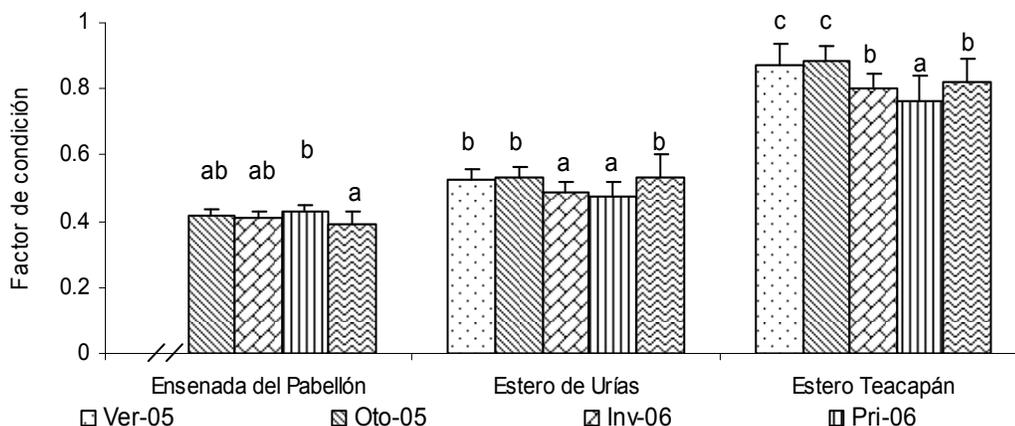


Figura 11. Comparación temporal del factor de condición de *Mugil curema* en los tres sistemas de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para cada sistema. (//): no se dispuso de datos.

Otro aspecto notable en el FC de los organismos es el hecho de registrar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ecosistemas a través de las épocas del año donde el Estero Teacapán registró consistentemente los promedios más altos durante el ciclo de estudio seguido por el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón respectivamente (Fig. 12). Estos resultados pueden asociarse a las condiciones de cada ecosistema como lo reportado por Vethaak *et al.* (1992) quienes monitorearon la salud del pez *Limanda limanda* en un ecosistema estuarino donde el FC de los organismos decreció conforme al grado de contaminación de cada sitio, siendo relacionado con desnutrición y vulnerabilidad a enfermedades encontrando una relación inversa entre el FC y la presencia de linfocitos. De igual manera, Laroche *et al.* (2002) observaron poblaciones del pez *Platichthys flesus* de dos estuarios altamente contaminados por descargas urbanas e industriales donde el FC fue bajo respecto a la

población del sitio de referencia posiblemente asociado a contaminantes, aunque no descartaron una posible relación con condiciones ambientales particulares. En otro estudio de evaluación de biomarcadores en *P. flesus* del Golfo de Gdansk en el Mar Báltico, Kopecka *et al* (2006) observaron correlación inversa entre el FC y las concentraciones de PAHs y PCBs medidas en sus tejidos indicando la influencia de los contaminantes en la salud general de los peces. Esta condición probablemente indica que los organismos del Estero Teacapán se encuentran en mejor condición que los del resto de los ecosistemas de estudio.

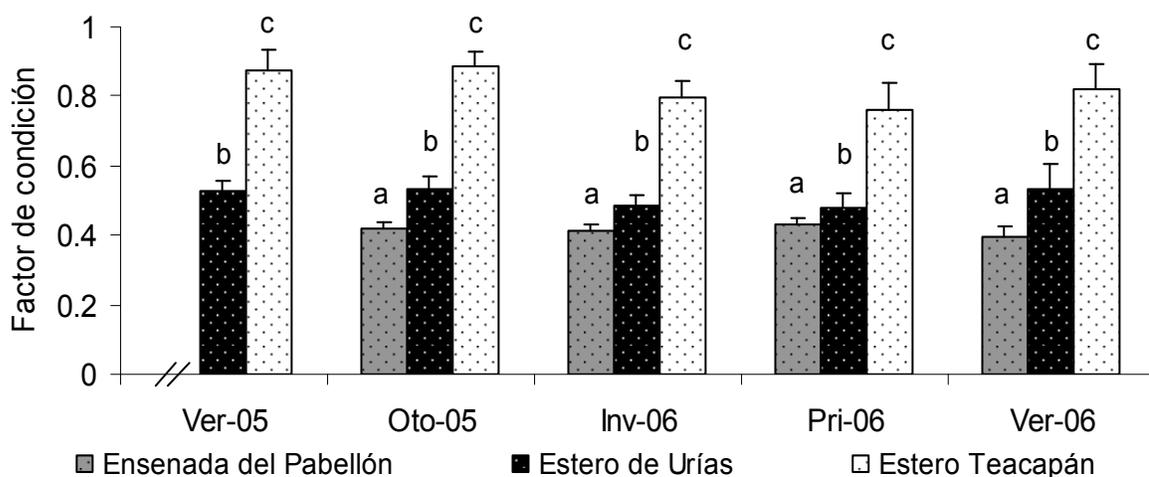


Figura 12. Comparación espacial del Factor de condición de *Mugil curema* entre los tres sistemas de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sistemas para cada época. (//): no se dispuso de datos.

En organismos silvestres, es difícil determinar la salud general de una población a partir de índices de condición biológica pero dan una idea en términos de balance energético entre reproducción, crecimiento y el mantenimiento de las funciones vitales para la sobrevivencia. Munkittrick *et al.* (2000) estudiaron poblaciones expuestas a sitios con diferentes factores de estrés, destacando tres escenarios principales: 1) sitios con mejor calidad de descargas y menores efectos deletéreos presentan abundancia de nutrientes, poblaciones que invierten energía en crecimiento y reproducción; 2) sitios

con peor calidad de descargas y mayores efectos deletéreos presentan enriquecimiento de nutrientes y disfunción metabólica en los organismos, poblaciones que invierten energía en crecimiento con efectos negativos en la reproducción; 3) sitios con peor calidad de descargas o efectos crónicos y mayores efectos deletéreos presentan toxicidad química, limitación de nutrientes, poblaciones que invierten energía para mantener sus funciones vitales con efectos negativos en crecimiento y reproducción. Bajo los escenarios anteriores, los índices de condición de *M. curema* analizados en el presente estudio podrían indicar la disponibilidad de alimento, condiciones nutricionales y metabólicas, así como efectos de exposición a condiciones deletéreas por contaminación ambiental en cada sistema. En Ensenada del Pabellón los índices de condición en los peces reflejaron un bajo uso de la energía en el crecimiento, compensado en términos reproductivos (Fig. 13), lo que podría indicar que es un sistema con disponibilidad de alimento pero mala calidad de descargas y causante de deficiencias metabólicas en los organismos. En el Estero de Urías los peces posiblemente canalizaron la energía mayormente al mantenimiento de las funciones básicas para su sobrevivencia quedando así con baja eficiencia reproductiva, lo que podría indicar que el sistema es afectado por descargas de mala calidad con efectos deletéreos crónicos y causar toxicidad de naturaleza química en los organismos, condiciones que han sido reportadas para poblaciones de peces provenientes de sistemas altamente contaminados por mezclas de sustancias químicas (Kirby *et al*, 2000). En el Estero Teacapán, los peces registraron el mayor FC y dos épocas de reproducción (Fig. 13), lo que hace suponer una buena condición nutricional y metabólica, teniendo posiblemente un escenario de disponibilidad de alimento, mejor calidad o menor cantidad de descargas antropogénicas y menores efectos deletéreos que posiblemente indican buena salud en el sistema.

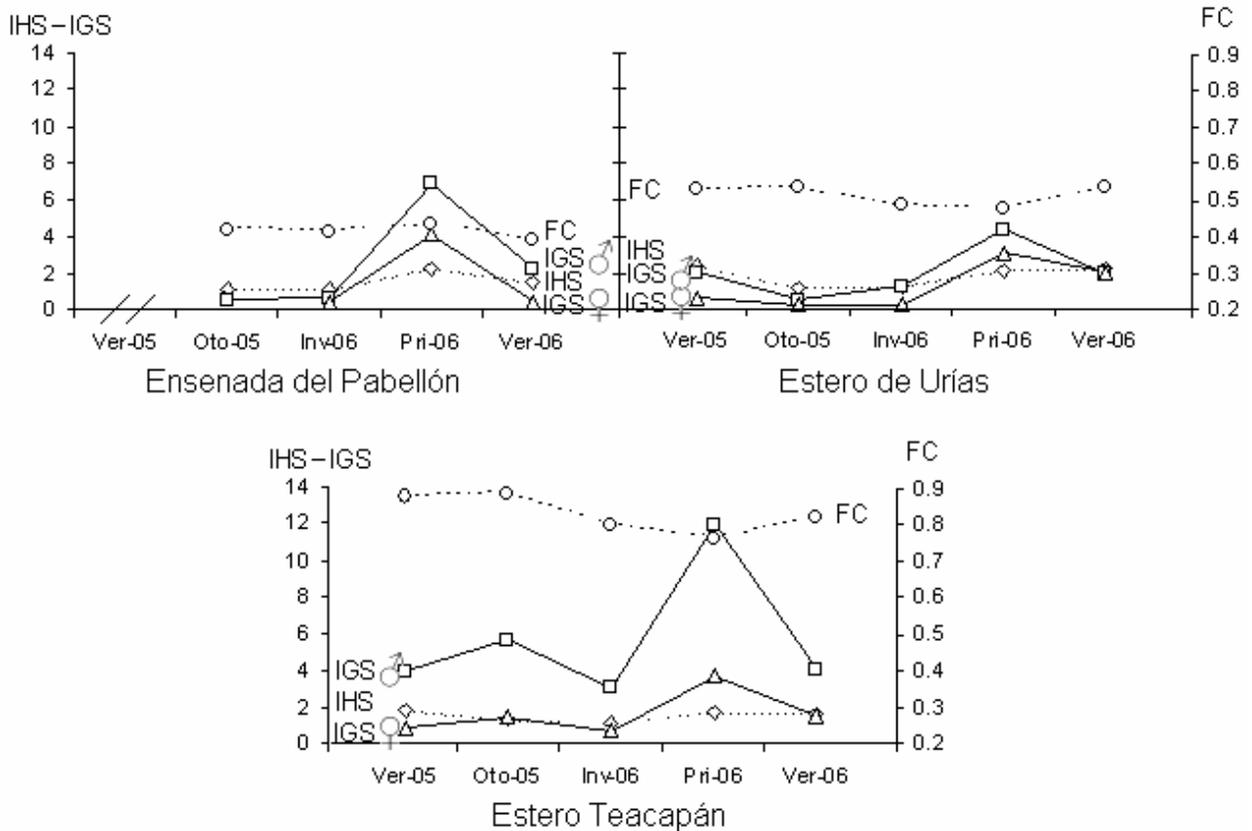


Fig. 13. Índices de condición biológica de *M. curema* de los tres sistemas durante las épocas de estudio.

### 7.2.1.3. Análisis molecular en *Mugil curema*

#### 7.2.1.3.1. Secuenciación y diseño de oligos de *M. curema*

Las secuencias obtenidas para Hsp70 y CYP450 de *M. curema* se muestran a continuación:

#### *Mugil curema* Hsp70, 354 bases

```

ATGACCAGAGACAACAACCTGTTGGGGAAATTTGAGCTGACTGGAATACCCCCAGCCCC
CGAGGTGTTCCCTCAGATTGAGGTTACTTTTGATATCGATGCCAATGGCATCATGAATGTT
TCCGCCGTCGACAAGAGCACTGGCAAGGAGAACAAGATTACAATTACCAACGcCAAAGGT
CGCTTGAGCAAGGAGGACATTGAGCGCATGGTCCAGGAAGCCGAGAAATACAAGGCTGAG
GATGATGTTcCAGAGAGAcAAGgTGACAGCCAAGAACGCTCTGGAGTCTTATGCCTTCAAT
ATGAAGTCTACTGTTGAGGACGAGAAGCTGAAGGGCAAGATCAGCGACGACGAC
    
```

***Mugil curema* CYP1A, 487 bases**

GACACAATCTCCACTGCCCTGTCGTGGTCAGTGATGTATTTGGTGGCTTACCCAGAGATA  
CAGGAGAGGGCTTTATCAAGAACTGAAGGAGAAGGTAGGTCTGGATCGTACACCTGTGCTT  
GCTGATCGAAACAGCTTACCTCTTCTTGAGGCCTTCATCCTAGAGAtCTTTCGCCATTCT  
TCCTTCCTTCCCTTCACAATTCCACACTGCACCACAAAAGACACATCTCTGAATGGATAC  
TATATTCCCAAAGACACCTGCGTCTTCATCAATCAGTGGCAGATCAACCATGATCCTGAG  
CTGTGGAAAGATCCATCATCCTTCAATCCAGACCGTTTCCTCAGTGCTGATGGAAGTGAG  
GTCAACAGGGTAGAAGAAGAGAAGGTGATGATTTTTGGCATGGGAAAGCGGCGCTGTATT  
GGTGAGGTCATTGCACGAAATGAAGTCTACTTGTTCCTTGGCCATCCTCATCCAAAAGCTG  
CACTTCT

Para el análisis de los niveles de expresión génica de Hsp70 y CYP1A en *M. curema* se diseñaron los siguientes oligos, amplificando productos de 211 y 200 bases respectivamente:

mcHSP70-F AAG AGC ACT GGC AAG GAG AAC AA  
mcHSP70-R CTG ATC TTG CCC TTC AGC TTC TC

mcCYP1A-F ACC ATG ATC CTG AGC TGT GGA AA  
mcCYP1A-R GAA GTG CAG CTT TTG GAT GAG GA

Como control interno se utilizó el gen 28S rRNA, con los siguientes oligos:

mc28S-F GCG GTA CAC CTG TCA AAC GT AAC  
mc28S-R GAC ACC TCC TGC TTA AAA CCC AAA

La temperatura umbral ( $T_m$ ) de replicación de todos los oligos fue de aproximadamente 65 °C. Tanto la  $T_m$  como el tamaño de los productos (~200 pb) están diseñados para el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real.

#### **7.2.1.3.2. Expresión de CYP1A en *M. curema* (PCR en tiempo real)**

La determinación de los niveles de citocromo P450 como respuesta de los organismos a la presencia de contaminantes en ambientes acuáticos ha sido reportada por muchos estudios en el mundo (Sleiderink y Boon, 1995; Arinç y Şen, 1999; Chaty *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 2007) y es tomada como marco de referencia para monitorear de manera general la presencia de mezclas de contaminantes que inducen la expresión de CYP1A en *M. curema*; aunque también es probable que algunos compuestos xenobióticos presenten la particularidad de inhibir dicha respuesta para lo cual son necesarios nuevos estudios.

El análisis de los niveles de expresión de CYP1A se representa gráficamente en comparación al grupo de menor nivel de expresión con valor “uno” (calibrador). En Ensenada del Pabellón los niveles de expresión de CYP1A en otoño de 2005 ( $157 \pm 175$ ) fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) respecto a los analizados en verano de 2006, los cuales, de hecho, presentaron el nivel de expresión mínimo de CYP1A (calibrador). En el Estero de Urías en otoño de 2005 también se registró una expresión elevada, con  $122 \pm 111$  veces mayor que el calibrador, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.085$ ). Por su parte, en los organismos del Estero Teacapán resalta el hecho de que no se registraron niveles elevados respecto al nivel de expresión de referencia ( $p > 0.05$ ) durante todo el ciclo de estudio (Fig. 14).

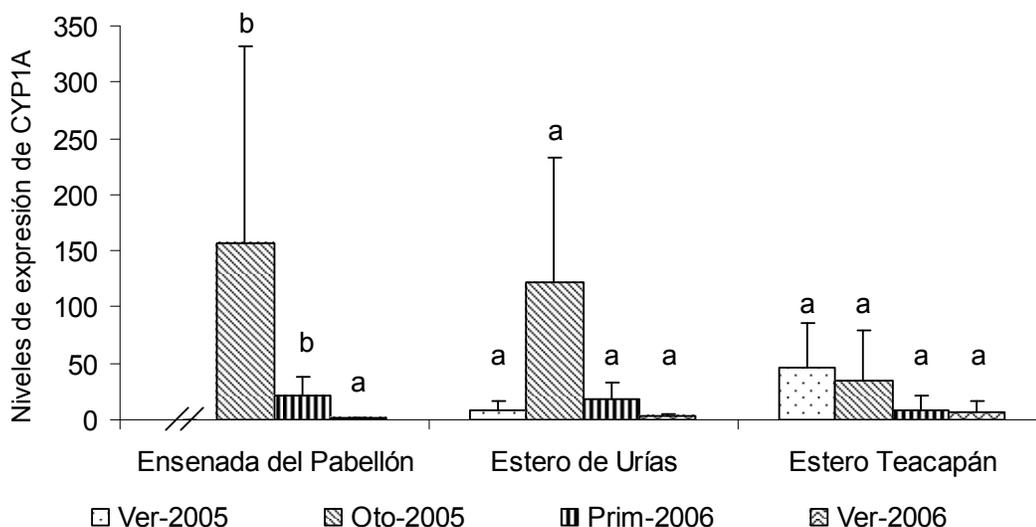


Figura 14. Comparación temporal de los niveles de expresión de CYP1A en *Mugil curema* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre épocas del año. (//): no se dispuso de datos.

Evidentemente, en otoño de 2005 los peces de Ensenada del Pabellón y Estero de Urías incrementaron sus niveles de transcripción de CYP1A, lo que algunos autores relacionan con los mecanismos de respuesta celular para la excreción o bioactivación de contaminantes durante la fase I del metabolismo de citocromo P450 (CYP1A) (Billiard *et al.*, 2004; Orellana y Guajardo, 2004; Barber *et al.*, 2007). Asimismo, una fuerte inducción de CYP1A es aceptada como un biomarcador de exposición para detectar ambientes acuáticos contaminados con algunos hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados, compuestos organoclorados o mezclas de ellos (Arinç *et al.*, 2001; Fent, 2004; Siroká y Drastichová, 2004).

La posible presencia de estresores ambientales, inductores de un incremento en la transcripción de CYP1A en los peces de Ensenada del Pabellón y Estero de Urías en otoño de 2005 (a pesar de no registrar diferencias significativas,  $p > 0.05$ , entre sistemas) (Fig. 15), puede obedecer a un inhabitual incremento en la precipitación pluvial registrada a finales del verano de 2005 (CNA, 2005), lo cual potencializa el acarreo de contaminantes a los sistemas y puede resuspender la parte biodisponible de los ya existentes, mediante las escorrentías ocasionadas por las lluvias. Algunos de los contaminantes reportados como inductores de CYP1A en peces, han sido reportados

históricamente en estos sistemas, tales como PAHs, PCBs, plaguicidas, metales pesados o mezclas de ellos (Villanueva y Botello, 1998; Galindo-Reyes *et al.*, 1999, 2003; Green y Páez, 2001) y posiblemente sus fuentes de emisión provengan de actividades agrícolas, urbanas o industriales, desarrolladas cerca de los sistemas. Por otra parte, la expresión de CYP1A en los organismos del Estero Teacapán, tendió a ser menor que en el resto de los ecosistemas, lo cual puede indicar una mejor condición en los organismos de dicho ecosistema.

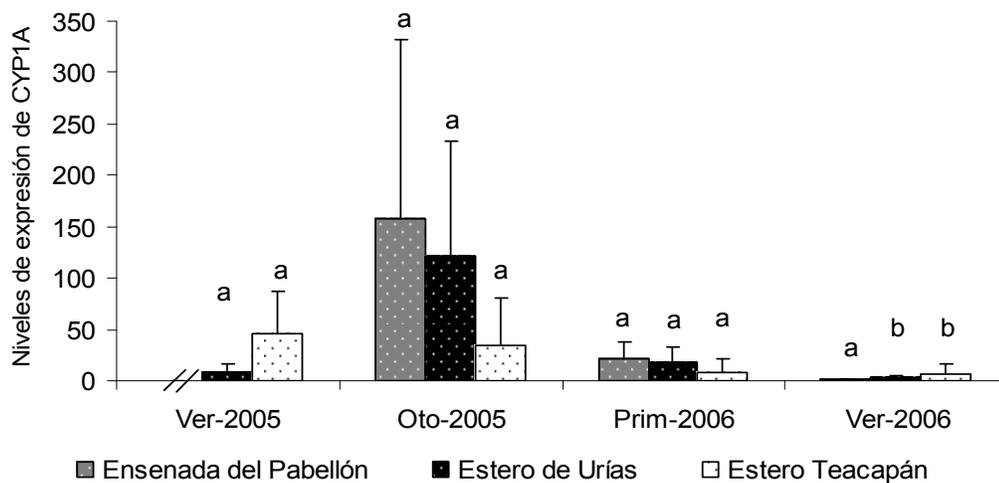


Figura 15. Comparación de los niveles de expresión de CYP1A en *Mugil curema* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre sitios. (//): no se dispuso de datos.

### 7.2.1.3.3. Expresión de Hsp70 en *M. curema* (PCR en tiempo real)

Las proteínas de estrés Hsp70 (por sus siglas en inglés, Heat shock protein-70kDa) participan en la integridad de otros grupos proteínicos, particularmente en la reparación del daño ocurrido en proteínas a consecuencia de estrés celular, desempeñando una función principal en la citoprotección (Deane y Woo, 2006). Su inducción se ha identificado en organismos expuestos a condiciones ambientales desfavorables y químicos capaces de ocasionar alteraciones homeostáticas y macromoleculares (Kültz, 2005).

Los niveles de expresión de Hsp70 en *Mugil curema*, se representan gráficamente en comparación al grupo con menor nivel de expresión con valor arbitrario

“uno” (calibrador), teniendo en cuenta que la expresión de Hsp70 puede ser utilizada como un biomarcador de respuesta general a condiciones de estrés que, en su conjunto, pueden alterar la condición basal del gen a niveles de expresión elevados (Deane y Woo, 2006). El menor nivel de expresión de Hsp70 fue registrado en organismos de Ensenada del Pabellón en verano de 2006 por lo cual fue asignado como nivel de comparación (calibrador). Los niveles máximos de expresión de Hsp70 se registraron en Ensenada del Pabellón y se observaron en otoño de 2005 con un promedio de  $49.3 \pm 55.8$  veces mayor que el calibrador, registrando diferencias significativas ( $p=0.003$ ). Por su parte, en el Estero de Urías en otoño de 2005 el promedio fue de  $44.7 \pm 40.4$  veces mayor que el calibrador pero no se observaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (Fig. 16). Las Hsp70 pueden ser usadas como indicadores no específicos de estrés por mezclas de contaminantes (Olsson *et. al.*, 2005), por lo que es probable que los organismos de Ensenada del Pabellón y Estero de Urías estuvieron expuestos a estrés ambiental en otoño de 2005, época durante la cual aumenta el ingreso de contaminantes a los sistemas costeros por escurrimientos pluviales, siendo ésta, una de las principales rutas de dispersión y captación de contaminantes tales como compuestos organoclorados, insecticidas, metales pesados y compuestos bifenilos policlorados (Rosales-Hoz, 1979). Por otro lado, el Estero Teacapán fue el único sistema que no presentó una variación evidente en los niveles de expresión con respecto al calibrador, lo cual puede estar relacionado al relativamente menor estrés al que pueden estar sometidas las poblaciones.

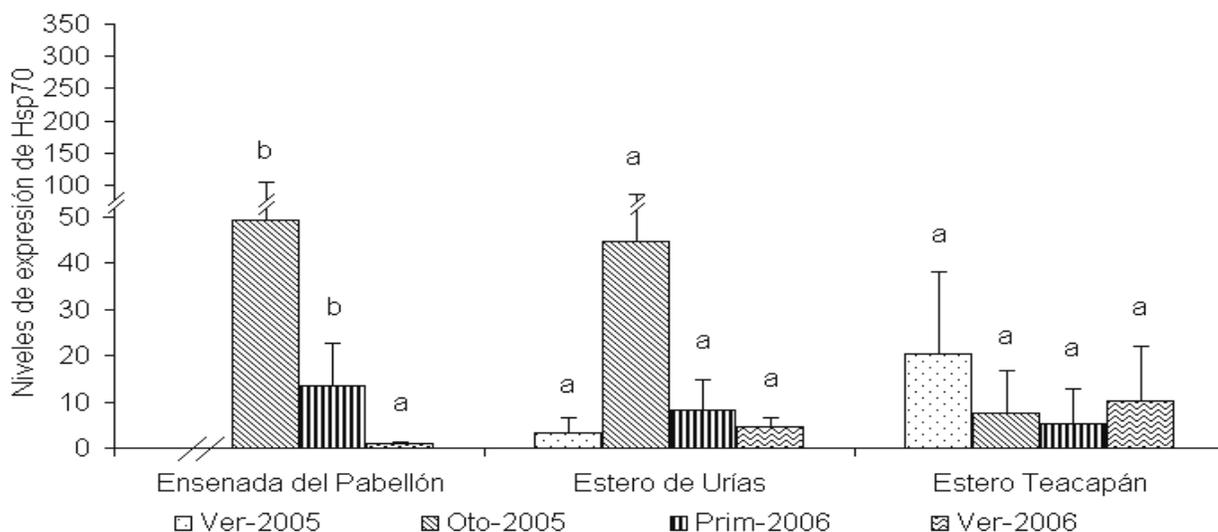


Figura 16. Comparación temporal de los niveles de expresión de Hsp70 en *Mugil curema* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre épocas del año. (//): no se dispuso de datos.

Por otro lado, en cada época de estudio, la expresión de Hsp70 en *M. curema* no registró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre localidades. Sin embargo, la época con mayor expresión (y mayor variabilidad) de Hsp70 fue otoño de 2005 para los organismos de Ensenada del Pabellón y Estero de Urías (Fig. 17), probablemente debido a una condición de estrés celular por factores como exposición a contaminantes particulares o mezclas químicas como lo reportado por Weber y Janz (2001) en un ensayo de exposición del bagre *I. punctatus* a  $\beta$ -naptoflavona (BNF) y dimetilbenzo- $\alpha$ -antraceno (DMBA) donde ocurrió una inducción en la expresión de Hsp70 en hígado y ovario y los autores lo interpretan como respuesta a estrés celular para evitar apoptosis en células ováricas.

La mayor variabilidad y actividad de Hsp70 en otoño puede ser, por sí misma, un síntoma de exposición a estrés ambiental en Ensenada del Pabellón y Estero de Urías, que se puede reflejar del registro histórico de contaminantes en sedimentos y organismos en dichos sistemas, entre los cuales se encuentran algunos PAHs, organoclorados (aroclor 1254, heptaclorobenceno), metales pesados (Cd, Cu, Ni) y plaguicidas (Álvarez, 1980; Izaguirre *et al.*, 1992; Páez-Osuna *et al.*, 1992; Galindo *et*

*al.*, 2003; Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000; Ruiz *et al.*, 2003), y que, pueden inducir la expresión de Hsp70 (Weber *et al.*, 2002; Deane y Woo, 2006).

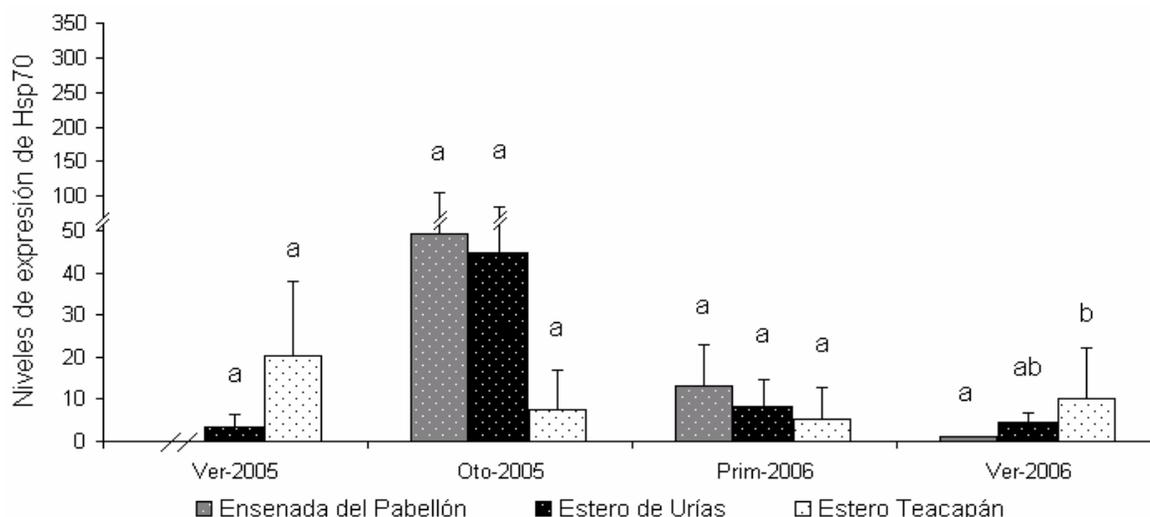


Figura 17. Comparación espacial de los niveles de expresión de Hsp70 en *Mugil curema* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre sitios. (//): no se dispuso de datos.

Lo anterior da una idea de las condiciones de exposición a las que pueden estar sometidas las poblaciones de dichos sistemas. Sin embargo, con los datos obtenidos hasta el momento, es difícil identificar las causas que lo provocan. Por otra parte, el análisis de algunos plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos en tejidos y sedimentos obtenidos en los sistemas estudiados, está actualmente siendo desarrollado y servirá para evaluar si existe correspondencia entre las concentraciones de los contaminantes y su efecto para las distintas respuestas.

#### 7.2.1.4. Correlación de biomarcadores en *M. curema*

La condición fisiológica de un organismo generalmente responde a su edad, condición nutricional, reproductiva o a cambios ambientales y ocasionalmente el organismo sufre cambios múltiples para mantener su homeostasis. En el presente estudio se analizaron las posibles interacciones entre los biomarcadores investigados en *M. curema*, así como con los parámetros ambientales registrados (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de Correlaciones de Pearson (r ; valor-p) para parámetros ambientales (n=4-5), Índices de condición biológica y biomarcadores moleculares de *Mugil curema* en los tres ecosistemas de estudio. (\*no se dispuso de suficientes datos para el análisis).

Ensenada del Pabellón						
	IGS hembras	IGS machos	IHS	FC	Hsp70	CYP1A
Temperatura	0.04; 0.96; 5	-0.065; 0.954	0.113; 0.887	-0.509; 0.491	-0.4; 0.738	-0.247; 0.841
Salinidad	-0.41; 0.96; 5	-0.631; 0.565	-0.32; 0.68	-0.914; 0.086	-0.378; 0.753	-0.224; 0.856
Ox. Dis.	-0.08; 0.947	n = 2*	-0.082; 0.95	-0.098; 0.938	n = 2*	n = 2*
IGS hembras	-	-	<b>0.827; 0.001</b>	0.147; 0.139	-0.139; 0.661	-0.197; 0.5
IGS machos	-	-	0.139; 0.684	<b>0.609; 0.047</b>	-	-
IHS	-	-	-	0.120; 0.204	-0.25; 0.389	-0.288; 0.318
FC	-	-	-	-	-0.033; 0.911	-0.094; 0.75
Hsp70	-	-	-	-	-	<b>0.978;&lt;0.001</b>

Estero de Urías						
	IGS hembras	IGS machos	IHS	FC	Hsp70	CYP1A
Temperatura	-0.116; 0.852	0.026; 0.967	0.674; 0.212	0.82; 0.089	-0.424; 0.576	-0.424; 0.576
Salinidad	-0.033; 0.959	-0.032; 0.96	-0.578; 0.31	-0.675; 0.211	0.075; 0.925	0.035; 0.965
Ox. Dis.	0.051; 0.949	-0.551; 0.449	-0.226; 0.77	-0.938; 0.062	-0.445; 0.707	-0.393; 0.743
IGS hembras	-	-	<b>0.63; 0.001</b>	-0.127; 0.191	-0.153; 0.533	-0.149; 0.542
IGS machos	-	-	<b>0.393; 0.032</b>	0.082; 0.667	-	-
IHS	-	-	-	0.058; 0.492	-0.257; 0.274	-0.264; 0.261
FC	-	-	-	-	-0.0171; 0.943	0.031; 0.898
Hsp70	-	-	-	-	-	<b>0.995;&lt;0.001</b>

Estero Teacapán						
	IGS hembras	IGS machos	IHS	FC	Hsp70	CYP1A
Temperatura	-0.332; 0.585	-0.287; 0.64	0.572; 0.314	0.687; 0.2	0.866; 0.134	0.579; 0.421
Salinidad	-0.099; 0.874	0.024; 0.97	0.513; 0.377	-0.466; 0.429	0.491; 0.509	0.004; 0.996
Ox. Dis.	-0.853; 0.147	-0.902; 0.098	-0.488; 0.51	-0.66; 0.34	0.983; 0.097	0.83; 0.376
IGS hembras	-	-	<b>0.431; 0.001</b>	-0.073; 0.413	0.379; 0.0995	<b>0.463; 0.039</b>
IGS machos	-	-	0.475; 0.034	-0.210; 0.374	-	-
IHS	-	-	-	-0.075; 0.360	0.283; 0.227	0.259; 0.269
FC	-	-	-	-	0.002; 0.994	0.098; 0.68
Hsp70	-	-	-	-	-	<b>0.966;&lt;0.001</b>

Es un hecho que los procesos reproductivos en muchas especies de peces y otros grupos taxonómicos están asociados a la temperatura, fotoperiodo y otros factores ambientales. En el presente estudio, sin embargo, la falta de correlaciones se puede deber a que las tres variables ambientales se determinaron puntualmente en cada estación del año (n = 5).

Las variables biológicas sí presentaron variaciones espaciales y temporales que registraron correspondencias ecotoxicológicas relevantes. Por ejemplo, la correlación positiva entre el IHS e IGS ( $r > 0.43$ ,  $p < 0.001$ ,  $n > 76$ ; Fig. 18), lo que manifiesta la interacción entre la condición fisiológica del hígado con los procesos reproductivos del organismo ya que este órgano actúa como una glándula que sintetiza vitelogenina para la formación de vitelo, lo cual explica la relación con el IGS en las hembras (Bromage y Cumaratunga, 1988; Fanta *et al.*, 2003). Sin embargo, debido al desarrollo gonadal y los cambios fisiológicos que experimentan el hígado y las gónadas en este proceso, el IHS e IGS no presentan una correlación lineal sino que en una primera fase el IHS aumenta durante la síntesis vitelogénica en el hígado, seguido de un aumento en el IGS durante la transferencia de reservas energéticas y crecimiento de los oocitos en la maduración ovárica (Berg, 2003).

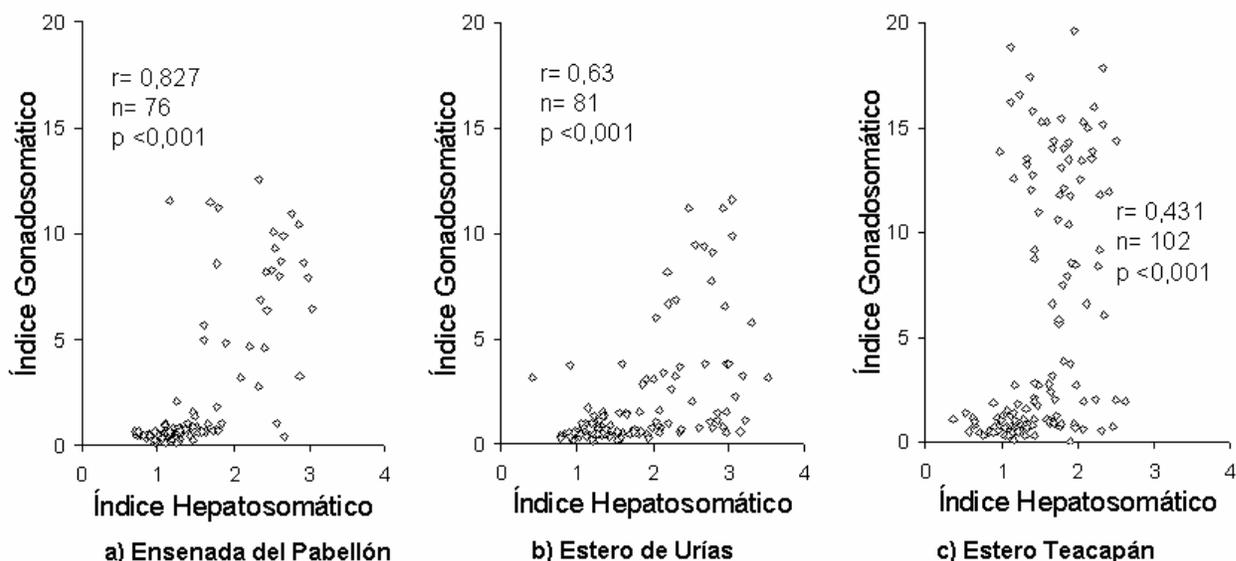


Figura 18. Correlación de Pearson entre el Índice Gonadosomático e Índice hepatosomático de hembras de *M. curema* de los tres ecosistemas durante el periodo de estudio.

La correlación positiva ( $r = 0.43$ ,  $p < 0.001$ ,  $n = 102$ ) entre el IGS e IHS de las lisas del Estero Teacapán presenta un comportamiento notoriamente diferente respecto a los otros sistemas (lo cual es evidente en la menor correlación) y refleja claramente un

mayor esfuerzo reproductivo que posiblemente puede ser traducido en una mayor fecundidad y, por lo tanto, viabilidad de su población.

El factor de condición en Ensenada del Pabellón registró los menores valores en el presente estudio, con un aumento atípico en primavera (Fig. 11) donde ocurrió el pico reproductivo, por lo que registró una correlación directa con el IGS en machos, sin embargo esta condición no se observó en las otras localidades, así como en un estudio previo de la especie donde fueron comparados dichos índices biológicos (Ríos-Sicairos, 2004).

Los niveles de expresión de Hsp70 y CYP1A presentaron una inducción similar en los organismos analizados en los tres ecosistemas durante el periodo de estudio, registrando una correlación directa ( $r=0.983$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 19). Es conocido que las Hsp70 juegan un papel importante en la integridad celular con efectos antiapoptóticos en respuesta a estresores (Guzhova *et al.*, 2001), además, la inducción de CYP1A participa en la excreción de compuestos y metabolitos xenotóxicos (Rocha-e-Silva *et al.*, 2004) los cuales forman ligandos con un receptor proteínico común (AhR) que actúa antagónicamente como factor de transcripción en estos dos grupos de genes (Backlund *et al.*, 1999) para mantener la integridad celular y finalmente las funciones vitales del organismo en un ambiente estresante.

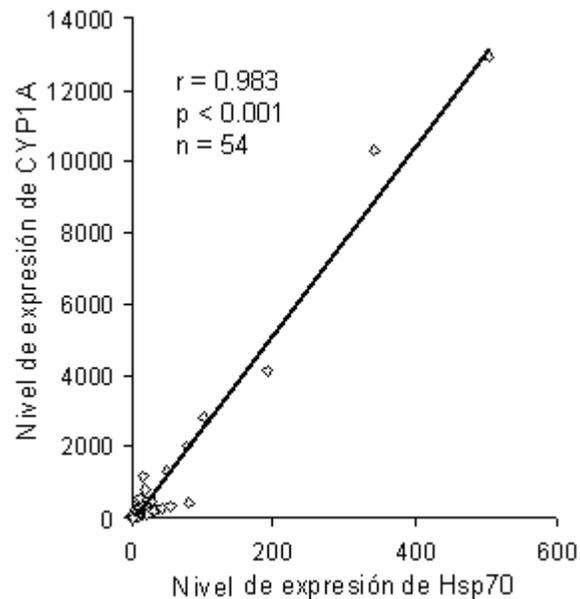


Figura 19. Correlación de Pearson entre el nivel de expresión de Hsp70 y CYP1A de *Mugil curema* de los tres ecosistemas durante el periodo de estudio.

## 7.2.2. *Mytella strigata*

### 7.2.2.1. Proporción de sexos de *M. strigata*

En un estudio paralelo, Leal Tarín (2007) identificó el sexo y estadios de maduración gonádicos de 521 organismos analizados en el presente estudio, de los cuales 181 fueron procedentes de Ensenada del Pabellón correspondiendo una proporción aproximada de 1:1 (H:M) en ambas estaciones. En el Estero de Urías fueron analizados 181 organismos de los cuales 89 fueron provenientes de la estación Juárez registrando una proporción de 0.82:1 (H:M). Por su parte, en la estación Sirena se analizaron 92 organismos y fue registrada una proporción de 1.5 hembras por cada macho registrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sexos tomando en cuenta que la proporción en bivalvos es generalmente 1:1 (H:M) (Rodríguez *et al.*, 2003). En el Estero Teacapán se analizaron 159 organismos de los cuales 70 fueron procedentes de la estación Boca registrando 1.9:1 (H:M) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y en la estación Cruces la proporción se mostró equilibrada en un total de 89 organismos analizados (Fig. 20).

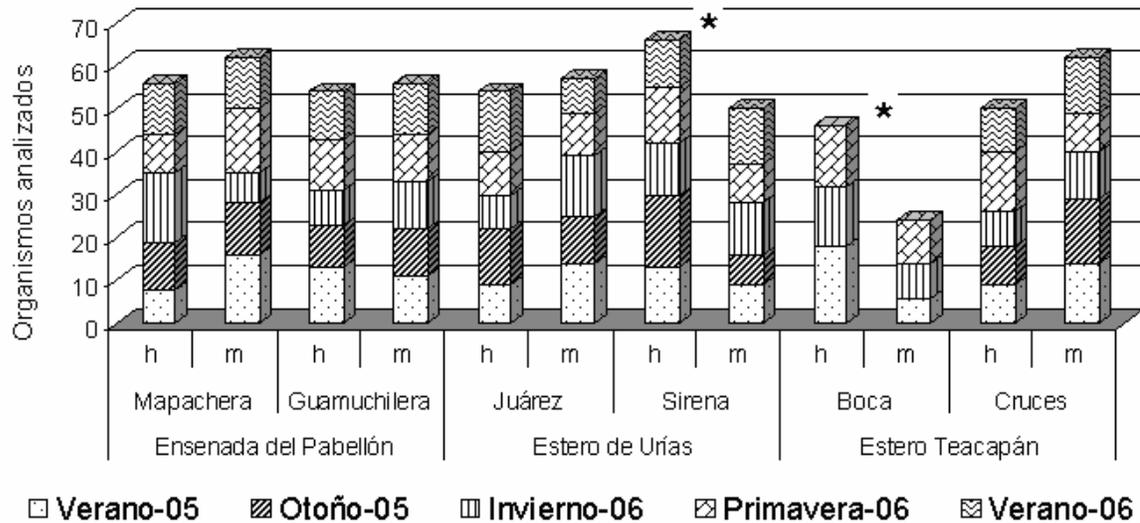


Figura 20. Comparación de la proporción de sexos de *Mytella strigata* de cada sitio de estudio. Prueba Z (\*) indica diferencias significativas ( $z \geq 1.971$ ,  $p \leq 0.049$ ) entre proporciones de sexos.

El desequilibrio en la proporción de sexos de una población puede afectar su abundancia o supervivencia en el sistema y por tanto puede representar cambios de alta relevancia ecológica. La proporción consistentemente mayor de hembras en la estación Sirena (Estero de Urías) posiblemente responde a estresores ambientales como compuestos que producen disfunción endocrina, principalmente estrógenos ambientales provenientes de mezclas de efluentes urbanos que afectan la diferenciación sexual de juveniles resultando más hembras que machos (Wang y Croll, 2004). En sitios cercanos a la estación Sirena se han detectado metales pesados como cadmio (Ruelas y Páez, 2000) el cual ha sido señalado por mimetizar los efectos del estradiol (Stoica *et al.*, 2007). Por otro lado, la estación Sirena se localiza cercana a los astilleros reparadores de barcos que probablemente son fuente de tributilestaño (TBT) y sus derivados contenidos como biocidas en pinturas de uso marino, los cuales causan alteraciones endocrinas en la biota; sin embargo han sido reportados en moluscos con efectos de masculinización (aparición de órganos masculinos en hembras) (Camillo *et al.*, 2004).

En el caso de la estación Boca en el Estero Teacapán, también se registraron diferencias significativas entre sexos, probablemente ligado a un factor de reclutamiento de hembras por ser una población joven relativamente pequeña en organismos y tallas donde ocurrió la desaparición de la población en otoño de 2005 y julio de 2006; posiblemente como consecuencia de estrés osmótica, ya que en otoño de 2005 se registró una salinidad de 19 ups en dicha estación.

### **7.2.2.2. Índices de condición biológica de *M. strigata***

#### **7.2.2.2.1. Índice Gonadosomático (IGS) de *M. strigata***

De acuerdo con los análisis histológicos de las gónadas, los organismos recolectados registraron una maduración gonadal con desoves múltiples en los tres ecosistemas tanto en hembras como en machos a lo largo del periodo de estudio (Leal-Tarín, 2007). Por otro lado, para el análisis de índices biológicos en *M. strigata* fueron requeridos organismos congelados y no se identificó el sexo histológicamente, por tanto ambos sexos fueron analizados juntos. El IGS es un indicador de la condición reproductiva (Rodríguez y Marañón, 1993) y refleja el desarrollo gonadal de los organismos. En el presente estudio el IGS registró variaciones a lo largo del tiempo de manera intermitente (excepto las estaciones Boca y Cruces), lo que indica que estas poblaciones tienen un ciclo reproductivo continuo con picos máximos en otoño de 2005 con diferencias significativas en Mapachera y Juárez ( $p < 0.05$ ) y primavera de 2006 con diferencias significativas en Mapachera, Guamuchilera, Juárez y Sirena ( $p < 0.05$ ) respecto a los periodos de reposo (Fig. 21). Este comportamiento fue similar a lo reportado por Báez *et al.* (2005) para *G. demissa* (Mytilidae) de ambientes tropicales donde el bivalvo registró dos periodos reproductivos delimitados en verano e invierno.

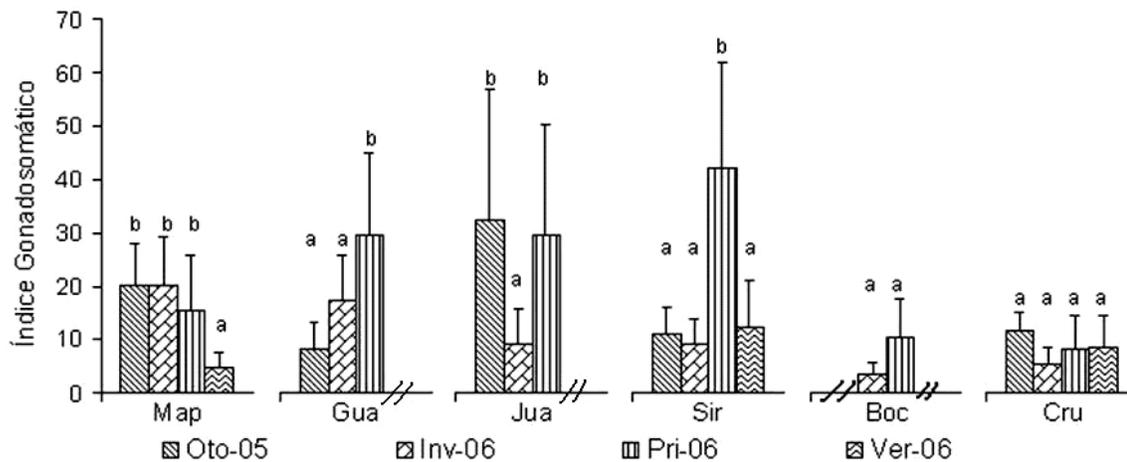


Figura 21. Comparación de la variación temporal del Índice Gonadosomático de *Mytella strigata* en cada sitio de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para cada sitio. (//): no se dispuso de datos.

En el caso de las estaciones del Estero Teacapán, probablemente la baja actividad reproductiva se deba a que los individuos pertenecían a una cohorte de organismos juveniles y de primera edad de maduración ya que se registraron mortalidades masivas en otoño de 2005 y verano de 2006 principalmente en la estación Boca. Es difícil determinar con certeza las causas de dichas mortalidades y posiblemente se deba a la interacción de condiciones particulares tales como la competencia por el alimento, salinidades bajas, contaminación y un estrés post-desove lo cual ha sido reportado en mortalidades masivas para otros mitílidos (Cartier *et al.*, 2004). La actividad reproductiva de *M. strigata* contrasta con la buena condición registrada en *M. curema* para dicho ecosistema, lo que resalta la importancia de realizar estudios de monitoreo con especies de diferentes niveles tróficos que aportan evidencia (aún contradictoria) de las condición ambiental del ecosistema.

Por otro lado, la mayor actividad reproductiva de las poblaciones de *M. strigata* se registró en primavera de 2006 donde el IGS de Guamuchilera, Juárez y Sirena fue mayor significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto al resto de las estaciones de estudio (Fig. 22). En otoño de 2005 la estación Juárez registró un IGS alto ( $p < 0.05$ ), así como en invierno la estación Mapachera registró elevado IGS ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de

las estaciones. En verano de 2006 se cuenta con registros de una estación por cada localidad y el IGS no registró diferencias ( $p>0.05$ ) entre sus poblaciones.

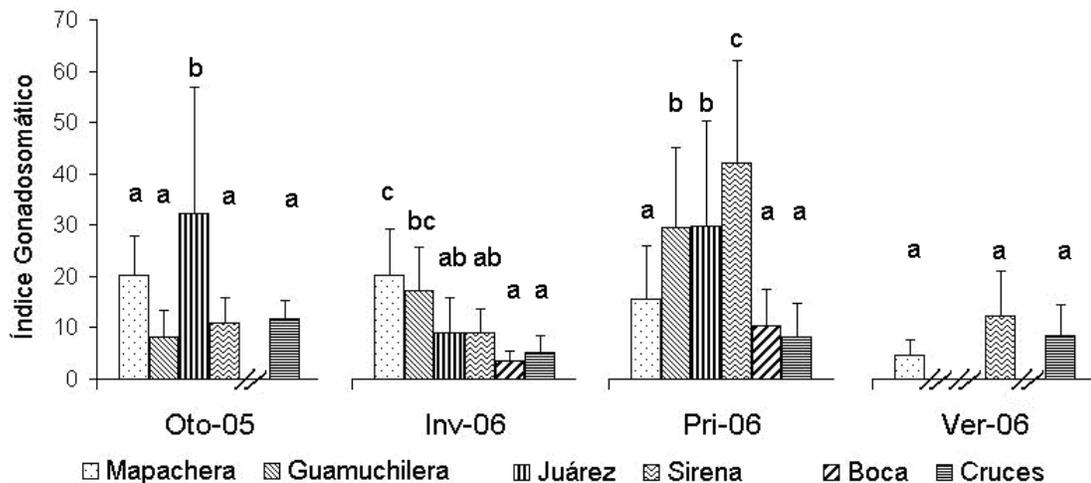


Figura 22. Comparación de la variación espacial del índice Gonadosomático de *Mytella strigata* en cada época de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre sitios para cada época. (//): no se dispuso de datos.

La maduración gonádica de muchas especies acuáticas y particularmente de moluscos, depende de factores ambientales como la temperatura, salinidad, fotoperiodo y disponibilidad de alimento (Báez *et al.*, 2005), así como la presencia de contaminantes o factores ambientales adversos que pueden limitar la reproducción y viabilidad de los ovocitos. En el Estero Teacapán es posible que las poblaciones estuvieran bajo condiciones de estrés principalmente por las bajas salinidades registradas en otoño de 2005 (Fig. 4) y una fuerte competencia por la disponibilidad de alimento donde ocurrió un reclutamiento de poblaciones juveniles que probablemente utilizan la conversión energética principalmente para el crecimiento (Reusch, 1998). En el caso del Estero de Urías, la estación Sirena registró el IGS más alto ( $p<0.05$ ) respecto al resto de las estaciones en primavera de 2006 y la estación Juárez registró el IGS elevado ( $p<0.05$ ) en otoño de 2005, observando en general el IGS mayor en las estaciones de Juárez y Sirena con un promedio de 23.66 y 18.59 respectivamente seguidas por Guamuchilera (18.35) y Mapachera (15.11) reflejando una considerable

actividad reproductiva debido principalmente a la disponibilidad de alimento por la elevada presencia de materia orgánica y nutrientes presentes en ambos ecosistemas que han sido asociados a actividades antropogénicas (Páez-Osuna *et al.*, 1998, Soto-Jiménez *et al.*, 2001). Sin embargo, en este estudio no fue determinada la calidad de los gametos y es posible que el incremento en el IGS sea una estrategia de compensación para un bajo éxito en la viabilidad de los embriones como ocurre en otras especies (Smith y Suthers, 1999).

#### **7.2.2.2.2. Índice de Glándula Digestiva (IGD) de *M. strigata***

El IGD en bivalvos ha sido utilizado para estudiar la calidad nutricional de los organismos y se ha considerado que participa en el ciclo gametogénico (Cartier *et al.*, 2004) por lo que puede ser un indicador de la condición nutricional del organismo. En Ensenada del Pabellón el IGD registró los valores mínimos durante el invierno y la primavera de 2006 sin detectar variaciones significativas ( $p > 0.05$ ) en Mapachera y Guamuchilera a través del periodo de estudio. En el Estero de Urías los valores mínimos también fueron detectados en invierno de 2006, registrando en Juárez diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de las épocas de estudio y en Sirena diferencias ( $p < 0.05$ ) significativas con respecto a primavera y verano de 2006. En el Estero Teacapán no se obtuvieron organismos en el sitio Boca en otoño de 2005 y verano de 2006 debido a una baja en sus poblaciones sin registrar diferencias ( $p > 0.05$ ) en el IGD entre el invierno y primavera de 2006. Sin embargo en Cruces el menor IGD se registró en primavera de 2006 mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a otoño 2005 e invierno de 2006 donde el IGD fue mayor (Fig.23).

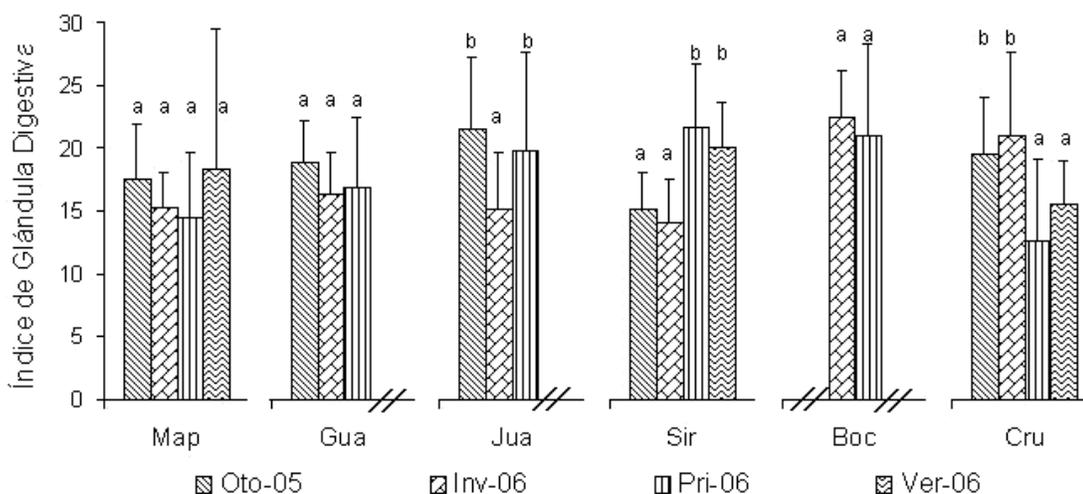


Figura 23. Comparación de la variación temporal del Índice de Glándula Digestiva de *Mytella strigata* en cada sitio de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para cada sitio. (//): no se dispuso de datos.

Es posible que durante los periodos de mayor actividad metabólica (temperaturas elevadas) junto a la abundante disponibilidad de alimento por la alta carga de materia orgánica, nutrientes y proliferación de organismos planctónicos en el Estero de Urías, ocurra una acumulación de reservas energéticas en el tejido de la glándula digestiva y tejido gonádico de *M. strigata* durante el otoño, primavera y verano, coincidiendo con los resultados obtenidos por Moreno *et al.* (1998) donde señalan que el incremento del IGD del molusco *Illex argentinus* se debe a cambios en la abundancia y composición de la dieta durante ciertos periodos del año. Ocurre algo similar con los organismos de Ensenada del Pabellón, sin embargo no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre épocas del año. Por el contrario, en el Estero Teacapán el elevado IGD en invierno puede reflejar un ritmo metabólico acelerado durante el desarrollo de organismos juveniles durante la repoblación posterior a las mortalidades masivas registradas en otoño de 2005.

Por otro lado, el IGD presentó variaciones entre sitios a través de las épocas del año, registrando en otoño de 2005 los sitios Juárez y Cruces con el mayor IGD, en Invierno de 2006 los sitios Boca y Cruces (Estero Teacapán) tuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de los sitios con menor IGD, mientras que en la

primavera de 2006 fueron mayores los IGD de Juárez, Sirena (Estero de Urías) y Boca (Estero Teacapán) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los otros sitios, por su parte en verano de 2006 la estación de Sirena (Estero de Urías) registró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el mayor IGD respecto al resto de los sitios de estudio (Fig. 24).

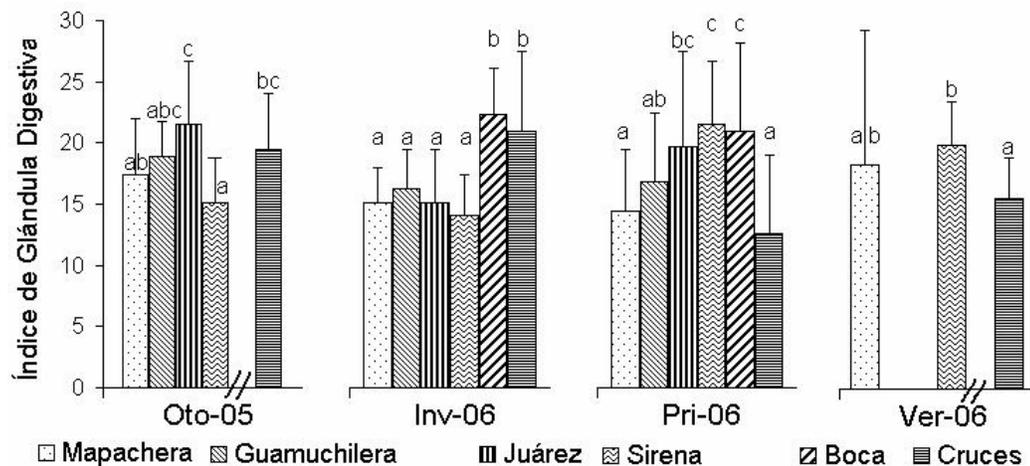


Figura 24. Comparación espacial del Índice de Glándula Digestiva de *Mytella strigata* en cada época de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sitios para cada época. (//): no se dispuso de datos.

La serie de variaciones anteriormente señaladas pueden estar sujetas a dos escenarios, englobando principalmente la condición de disponibilidad de alimento durante el otoño y la primavera en el caso del Estero de Urías y la continua actividad digestiva para el desarrollo de organismos juveniles en el caso del Estero Teacapán.

#### 7.2.2.2.3. Índice de Condición (IC) de *M. strigata*

El índice de condición (IC) de los organismos refleja el estado de bienestar o salud de acuerdo a la biomasa del individuo (Rainer y Mann, 1992). En el presente estudio se observaron variaciones a través del tiempo en las seis estaciones sin obtener un patrón definido por lo que cada sitio muestra condiciones particulares y

puntuales (Fig. 25). La estación Mapachera registró los ICs promedio más altos en verano de 2005 (13.41), otoño de 2005 (14.29) e invierno de 2006 (12.95) ( $p < 0.05$ ), por su parte los organismos de Guamuchilera registraron en otoño el promedio del IC mínimo (8.66) con valores máximos en verano de 2005 (12.69) y primavera (11.04). En Juárez los ICs con mayor promedio se observaron en verano (11.9) y otoño (11.53) de 2005 ( $p < 0.05$ ). En Sirena el IC mayor se registró en invierno (12.84), en Boca en invierno (20.38) y primavera (18.9) el IC fue mayor ( $p < 0.05$ ) y en cruces el IC mayor se registró en primavera (12.00) ( $p < 0.05$ ).

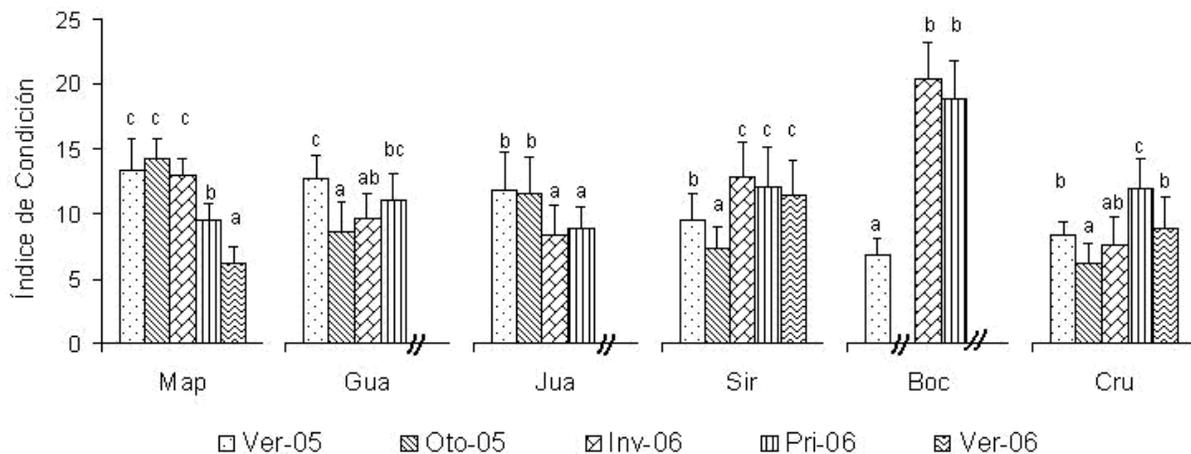


Figura 25. Comparación temporal de la variación del Índice de condición de *Mytella strigata* en cada sitio de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre épocas para cada sitio. (//): no se dispuso de datos.

Por su parte el IC promedio registrado en Boca en invierno (20.37) y primavera (18.9) de 2006 registró diferencias ( $p < 0.05$ ) respecto al resto de las estaciones, debido principalmente a que pertenecen a cohortes de organismos juveniles los cuales están constituidos por valvas relativamente delgadas por su reciente formación y acelerado crecimiento en biomasa (Fig. 26).

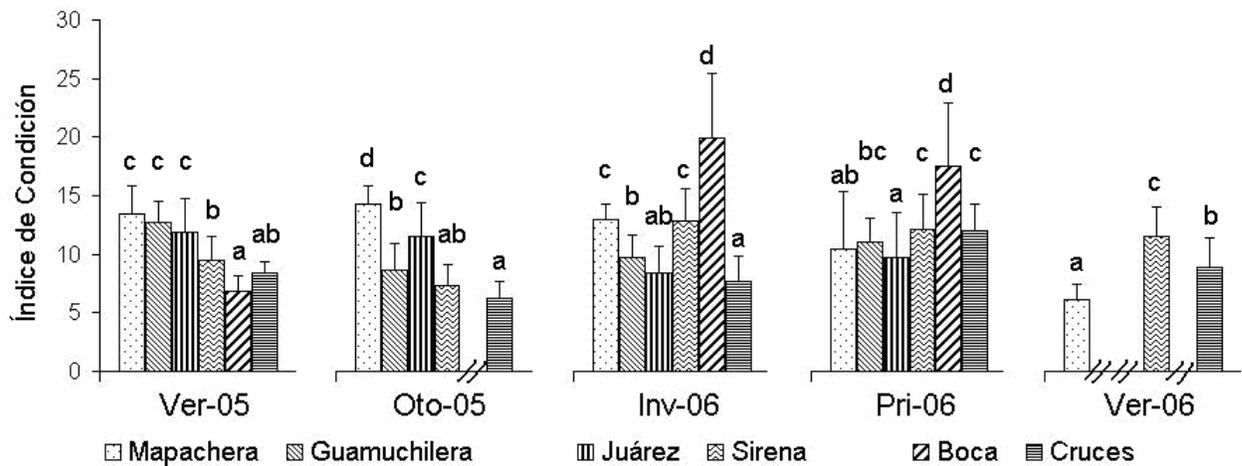


Figura 26. Comparación espacial de la variación del Índice de Condición de *Mytella strigata* en cada época de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre sitios para cada época. (//): no se dispuso de datos.

### 7.2.2.3. Análisis molecular de *M. strigata*

#### 7.2.2.3.1. Secuenciación y diseño de oligos de *M. strigata*

Las secuencias obtenidas para Hsp70 y CYP450 de *M. strigata* se muestran a continuación:

#### *Mytella strigata* HSP70, 270 bases

TGGTGAGGACTTTGACAACAGAATGGTCAACCACTTCATCCAGGAATTCAAACGAAAACA  
 CAAAAAAGACATTACTGATAACAAGAGGGCTGTCCGTCGTCTGAGAACAGCCTGTGAAAG  
 AGCCAAGAGAACAACCTTTCCTCCAGCACACAAGCCAGTGTAGAAATTGATTCATTGTACGA  
 AGGTATTGATTTCTACACAAGCATCACAAGAGCTAGATTTGAAGAATTGAATGCTGATCT  
 CTTTAGAGGGACCTTGGAACCAGTAGAAAA

#### *Mytella strigata* CYP4, 356 bases.

ATGTTTGAGGGGCACGACACAACCTGCTGCTGCGATGAGTTTTACCCTTCATTTAATTGGT  
 GCACATCCAGATGTACAGGATAAGGTCCATCAGGAACCTTGATGAGGTGTTTGGTGATAGC  
 AATAGAAGACCTACGATGAAGGACCTAAAGTCATTGAAGTATCTAGAATGTGTCATAAAG  
 GAGGCTTTGAGGCTTTTTCCGTCAGTACCTTTCTTCGGAAGAACGACAACAGAGGATTTG  
 GTCATCAATGATGTGACAATTCACGAGGCACGACATGTATACTGGTGACCTTTGCCTTG  
 CATATGGATCCTGAACAATTCCTGAGCCGGAGAAATTTGACCCAGATCGCTTCCC

## Diseño de oligos

Para *Mytella strigata* fueron diseñados oligos específicos para amplificar los genes Hsp70 y CYP4. Los productos de PCR son de 173 y 193 bases respectivamente.

Las secuencias de los oligos se muestran a continuación:

msHSP70-F GTC GTC TGA GAA CAG CCT GTG AAA  
msHSP70-R TTC TAC TGG TTC CAA GGT CCC TCT

msCYP4-F ATG TTT GAG GGG CAC GAC ACA  
msCYP4-R GCC TCA AAG CCT CCT TTA TGA CAC

Como control interno se utilizó el gen 18S rRNA, con los siguientes oligos:

ms18S-F CCT TGG TGC TCT TGA CTG AGT GTC  
ms18S-R GGC GAT CCA AGA ATT TCA CCT CTA

### 7.2.2.3.2. Expresión de Hsp70 en *M. strigata* (PCR en tiempo real)

Las proteínas de estrés (Hsp70) fundamentalmente reparan daños en la síntesis de proteínas que pueden ocurrir como consecuencia de múltiples estresores (Deane y Woo, 2006). Los niveles de expresión de Hsp70 analizados en 20 individuos de *M. strigata* de ambas estaciones de Ensenada del Pabellón (Mapachera y Guamuchilera) se mantuvieron relativamente en proporciones bajas al no rebasar por más de 5.2 veces el nivel promedio mínimo registrado en el presente estudio, el cual fue arbitrariamente tomado como nivel de comparación, tomando en cuenta que las proteínas de estrés presentan mayores niveles de expresión bajo la presencia de múltiples estresores ambientales y compuestos xenobióticos. Presentando en Mapachera una expresión promedio de  $4.35 \pm 1.04$  en otoño con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al nivel mínimo. La estación Guamuchilera registró mayor variabilidad de expresión y no se observaron diferencias ( $p > 0.05$ ) respecto al calibrador. En Juárez se registró el mayor nivel de expresión de Hsp70 ( $30.7 \pm 24.6$ ) en primavera ( $p < 0.05$ ), también observando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en verano de 2006. En la estación Sirena se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en

todas las épocas respecto a la expresión basal. En las estaciones del Estero Teacapán también se registró una elevada expresión ( $p < 0.05$ ) en los niveles de Hsp70 en todas las épocas a excepción de Cruces en primavera (Fig.27).

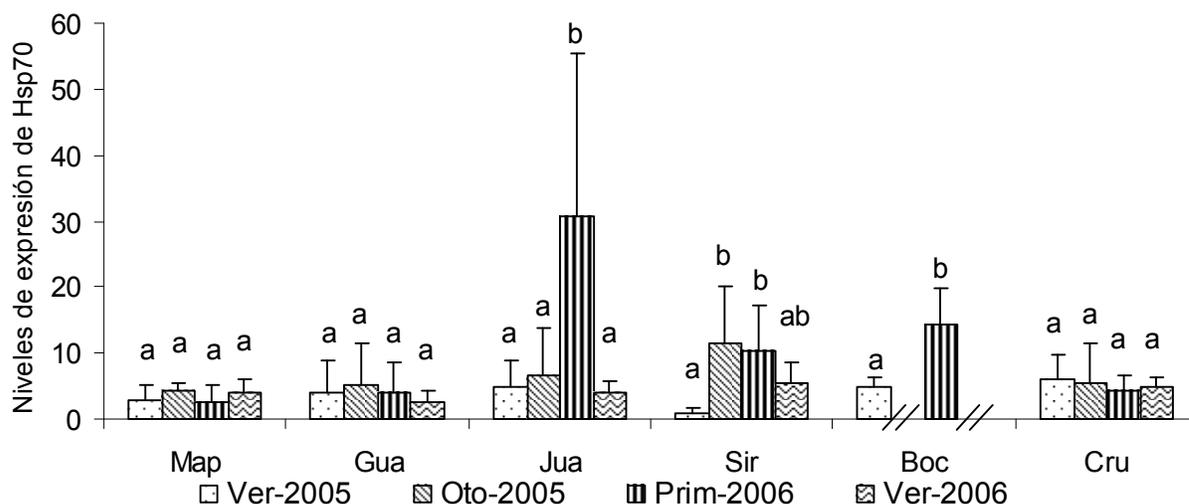


Figura 27. Comparación temporal de los niveles de expresión de Hsp70 en *Mytella strigata* durante el periodo de estudio (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre épocas del año. (//): no se dispuso de datos.

La baja expresión de Hsp70 en *M. strigata* de Ensenada del Pabellón puede indicar que los organismos no presentaron exposición crónica a estresores ambientales y/o antropogénicos, ya que la expresión del gen a nivel de mRNA responde a condiciones de exposición temprana, cuando el o los agentes inductores (estresores) interactúan con elementos reguladores del DNA y ocurre la transcripción y expresión del gen a nivel de mRNA (Stegeman y Hahn, 1994). Por otro lado, en el Estero de Urías se observó la mayor sobre expresión de Hsp70 en *M. strigata* con un promedio total de  $9.3 \pm 7.08$  y registrando en primavera de 2006 la estación Juárez con la expresión mayor a los demás sitios de estudio ( $p < 0.05$ ) (Fig. 28), lo que indica una posible exposición de organismos a estresores tales como sustancias tóxicas que pueden alterar las funciones celulares entre los cuales están metales pesados, TBT, PAHs, PCBs, y han sido relacionados con niveles altos en la expresión de Hsp70 (Steinert y Pickwell, 1993; Köhler *et al.*, 2000; Cruz y Chu, 2002; Olsson, 2005).

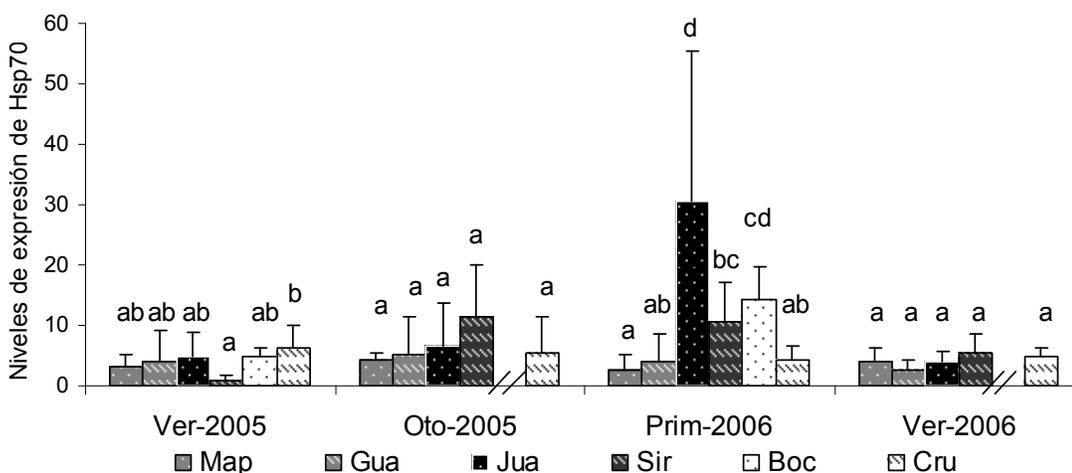


Figura 28. Comparación espacial de los niveles de expresión de Hsp70 en *Mytella strigata* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre sitios. (//): no se dispuso de datos.

#### 7.2.2.3.3. Expresión de CYP4 en *Mytella strigata* (PCR en tiempo real)

En los bivalvos a diferencias de peces y otros vertebrados, el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos presenta menor actividad debido a que en este grupo de organismos existen menor cantidad de complejos enzimáticos para realizar la oxidación y conjugación de sustancias por lo que la presencia de citocromos P450 es limitada y participa en funciones tales como el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga y se ha demostrado que se induce en presencia de PAHs, DEHP (Rewitz *et al.*, 2004; Chaty *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha descrito la inhibición de CYP4 en presencia de hidrocarburos como  $\beta$ -naftoflavona (BNF) (Snyder, 1998) por lo que en este caso es difícil identificar un nivel de comparación que indique una menor exposición a mezclas de contaminantes que alteren los niveles de expresión de CYP4 en *M. strigata*. Sin embargo las variaciones extremas en los niveles de expresión de CYP4 en *M. strigata* pueden indicar alteraciones metabólicas causadas por la presencia de compuestos xenotóxicos o estresores ambientales en los organismos.

Se analizaron los niveles de expresión de CYP4 en 20 organismos por cada sitio, siendo Mapachera y Guamuchilera los dos sitios con menores niveles de expresión ( $1.34 \pm 0.28$  y  $1.25 \pm 0.34$  respectivamente) sin reflejar variaciones significativas ( $p > 0.05$ )

excepto los organismos de Mapachera en otoño ( $p < 0.05$ ) con respecto al nivel mínimo de expresión del gen. En el caso de las estaciones Juárez, Sirena y Boca se registraron los niveles de expresión de CYP4 mayores en la primavera ( $p < 0.05$ ) respecto al nivel de expresión mínimo y en cruces se observó una expresión significativa ( $p < 0.05$ ) en verano de 2005 (Fig. 29). El mayor nivel de expresión de CYP4 en la estación Juárez en primavera 2006 pudiera estar relacionada a desechos de las plantas procesadoras de pescado, los cuales son ricos en aceites y ácidos grasos, sin embargo no se cuenta con datos que lo confirmen.

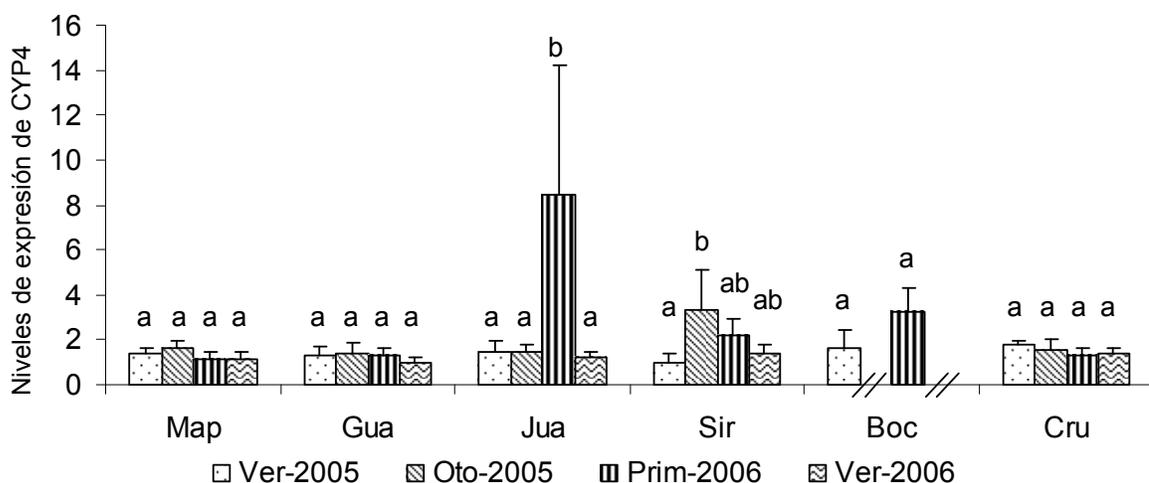


Figura 29. Comparación temporal de los niveles de expresión de CYP4 en *Mytella strigata* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre épocas del año. (//): no se dispuso de datos.

Por otro lado, al hacer comparaciones entre sitios de estudio en cada época del año, los organismos analizados no registraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en los niveles de expresión de CYP4 con excepción de una elevada expresión del gen en los organismos de la estación Juárez en primavera de 2006 donde se registraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de los sitios (Fig. 30).

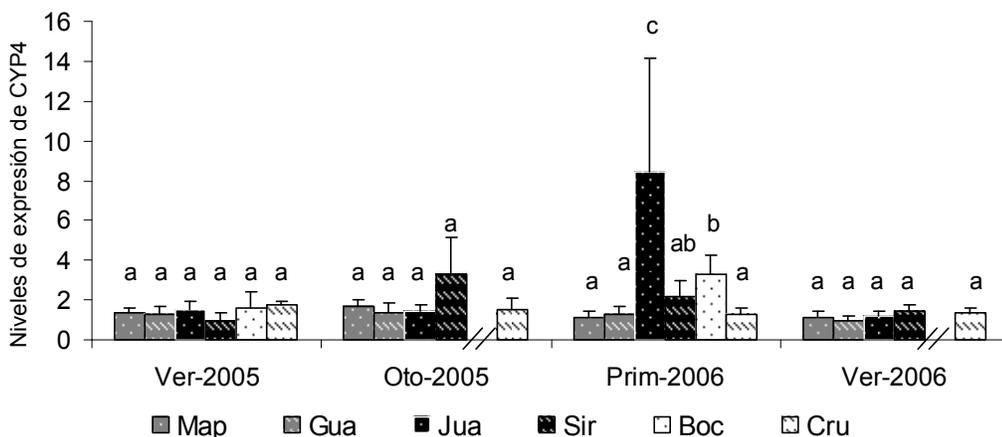


Figura 30. Comparación espacial de los niveles de expresión de CYP4 en *Mytella strigata* durante el periodo de estudio. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0.05$ ) entre sitios. (//): no se dispuso de datos.

Un comportamiento similar de observó en la expresión de Hsp70 por lo que posiblemente ambos genes participen en procesos fisiológicos tales como la reproducción y/o procesos de mantenimiento de la integridad celular ante agentes exógenos. El estudio de las isoformas de genes CYPs en invertebrados está limitado principalmente a ensayos experimentales por lo que aún muchos procesos son desconocidos (Chaty *et. al.*, 2004) y son necesarios estudios de caracterización y funcionalidad de estas enzimas ante compuestos endógenos y variables ambientales para ser usados como biomarcadores de estrés ambiental y hacer interpretaciones mas adecuadas.

#### 7.2.2.4. Correlación de biomarcadores de *M. strigata*

Las condiciones ambientales en conjunto, influyen en los procesos biológicos, actividades energéticas y de regulación del organismos con el medio (Spanopoulos *et al.*, 2005) por lo que es posible encontrar correspondencia entre las variables ambientales, los procesos biológicos y subcelulares. El IGS de *M. strigata* de las estaciones de estudio no registró correlación ( $p > 0.05$ ) con respecto a los parámetros ambientales de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto (Tabla 5), probablemente

porque la especie presenta desove de manera continua en diferentes épocas del año. Asimismo, el análisis presenta un número de muestra reducido debido a los registros puntuales de los parámetros ambientales.

Tabla 5. Matriz de Correlaciones de Pearson (r ; valor-p) para parámetros ambientales, Índices de condición biológica y biomarcadores moleculares de *Mytella strigata* en los tres ecosistemas de estudio.

Ensenada del Pabellón ( <b>Mapachera</b> )					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	-0.86 0.33	0.882; 0.312	-0.301; 0.699	0.168; 0.832	-0.06; 0.94
Salinidad	-0.808; 0.401	0.925; 0.249	-0.189; 0.811	0.174; 0.826	0.038; 0.962
Ox. Dis.	n = 2	n = 2	-0.6; 0.59	-0.729; 0.48	-0.87; 0.325
IGS	-	0.056; 0.615	<b>0.47; &lt;0.001</b>	0.053; 0.875	0.093; 0.774
IGD	-	-	-0.148; 0.179	0.317; 0.342	0.144; 0.655
IC	-	-	-	-0.005; 0.985	0.391; 0.121
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.776; &lt;0.001</b>
Ensenada del Pabellón ( <b>Guamuchilera</b> )					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	N = 2	n = 2	0.587; 0.6	0.227; 0.773	-0.188; 0.812
Salinidad	N = 2	n = 2	-0.996; 0.054	-0.368; 0.632	-0.639; 0.361
Ox. Dis.	N = 1	n = 1	n = 2	-0.635; 0.562	-0.409; 0.731
IGS	-	-0.157; 0.192	0.211; 0.078	-0.034; 0.925	-0.276; 0.44
IGD	-	-	0.210; 0.08	<b>-0.682; 0.03</b>	-0.139; 0.701
IC	-	-	-	-0.181; 0.518	0.109; 0.699
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.583; 0.007</b>
Estero de Urías ( <b>Juárez</b> )					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	N = 2	n = 2	0.825; 0.383	-0.803; 0.197	-0.763; 0.237
Salinidad	N = 2	n = 2	-0.764; 0.446	0.542; 0.458	0.506; 0.494
Ox. Dis.	N = 1	n = 1	n = 2	0.087; 0.945	0.849; 0.355
IGS	-	<b>0.337; 0.005</b>	0.075; 0.537	-0.22; 0.471	-0.223; 0.442
IGD	-	-	<b>0.477; &lt;0.001</b>	-0.251; 0.387	-0.312; 0.258
IC	-	-	-	-0.183; 0.454	-0.237; 0.314
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.973; &lt;0.001</b>
Estero de Urías ( <b>Sirena</b> )					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	-0.76; 0.45	-0.1; 0.936	-0.09; 0.905	-0.891; 0.109	-0.71; 0.29
Salinidad	0.535; 0.641	0.971; 0.155	0.861; 0.139	-0.596; 0.404	-0.882; 0.118
Ox. Dis.	n = 2	n = 2	0.104; 0.934	-0.863; 0.337	-0.692; 0.513
IGS	-	<b>0.33; 0.001</b>	0.044; 0.67	0.229; 0.431	0.027; 0.925
IGD	-	-	0.243; <b>0.017</b>	-0.104; 0.724	-0.05; 0.851
IC	-	-	-	-0.089; 0.726	-0.127; 0.605
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.927; &lt;0.001</b>

Estero Teacapán (Boca)					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	n = 1	n = 1	n = 2	n = 2	n = 2
Salinidad	n = 1	n = 1	n = 2	n = 2	n = 2
Ox. Dis.	n = 0	n = 0	n = 1	n = 1	n = 1
IGS	-	0.119; 0.436	<b>-0.598; &lt;0.001</b>	<b>0.962; 0.038</b>	0.907; 0.093
IGD	-	-	0.056; 0.711	0.831; 0.169	0.779; 0.221
IC	-	-	-	<b>0.867; 0.002</b>	<b>0.865; 0.003</b>
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.894; &lt;0.001</b>
Estero Teacapán (Cruces)					
	IGS	IGD	IC	Hsp70	CYP4
Temperatura	-0.394; 0.742	0.078; 0.95	-0.471; 0.529	0.791; 0.209	0.754; 0.246
Salinidad	-0.969; 0.16	-0.742; 0.468	0.245; 0.755	0.161; 0.839	0.207; 0.793
Ox. Dis.	n = 2	n = 2	0.069; 0.956	0.991; 0.085	<b>1.000; 0.013</b>
IGS	-	0.194; 0.062	0.143; 0.174	-0.025; 0.931	-0.019; 0.947
IGD	-	-	-0.166; 0.114	-0.269; 0.332	0.053; 0.851
IC	-	-	-	-0.175; 0.461	-0.219; 0.353
Hsp70	-	-	-	-	<b>0.839; &lt;0.001</b>

El IGD de *M. strigata* registró variaciones durante el periodo de estudio en las seis estaciones monitoreadas pero no registró correlación ( $p > 0.05$ ) con los parámetros ambientales de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto del agua. Esto se debe a que el IGD responde mayormente a cambios en la disponibilidad de alimento (Cartier *et al.*, 2004) por lo que es posible que presente una estrecha relación con la gametogénesis bajo condiciones favorables como se observó con el IGS en el Estero de Urías donde se registró una correlación positiva ( $p < 0.05$ ); sin embargo, cabe mencionar que dicha correlación solo explica el 33 % de la relación entre variables (Fig. 31) y bajo esas consideraciones es posible mencionar que dicho sistema registró las estaciones con mejor esfuerzo reproductivo.

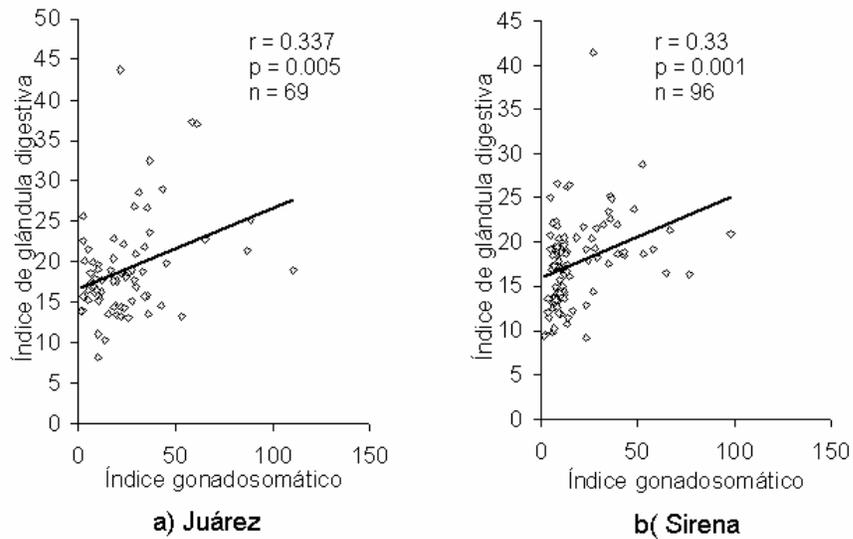


Figura 31. Correlación de Pearson entre el Índice gonadosomático y el índice de glándula digestiva de *M. strigata* en a) Juárez y b) Sirena durante el periodo de estudio.

El índice de condición (IC) no registró correlación ( $p > 0.05$ ) con los parámetros ambientales. Por otro lado, se observó una correlación positiva con el IGS de la estación de Mapachera ( $r = 0.319$ ;  $< 0.001$ ) y una correlación negativa con la estación de Boca ( $r = -0.598$ ;  $< 0.001$ ), donde ambas correlaciones corresponden a escenarios diferentes teniendo en el estero de Mapachera organismos adultos con actividad gonádica y abundancia de materia orgánica y nutrientes logrando mantener su biomasa durante la reproducción, mientras que en el estero de Boca los organismos son juveniles sujetos a condiciones poco favorables que al destinar el gasto energético al crecimiento sacrifican su reproducción y viceversa (Fig. 32).

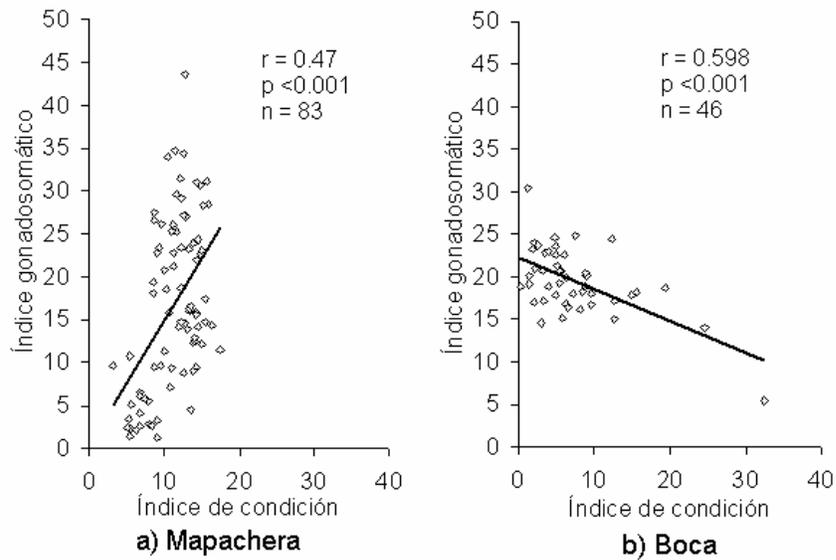


Figura 32. Correlación de Pearson entre el Índice de condición y el índice gonadosomático de *M. strigata* en a) Mapachera y b) Boca durante el periodo de estudio.

En cuanto al Estero de Urías, la disponibilidad de alimento se reflejan en los altos ICs de *M. strigata* y se observó una correlación positiva ( $p < 0.05$ ) con el IGD de las dos estaciones estudiadas en el ecosistema (Fig. 33), posiblemente relacionado a que la glándula digestiva gana peso durante periodos de disponibilidad de alimento.

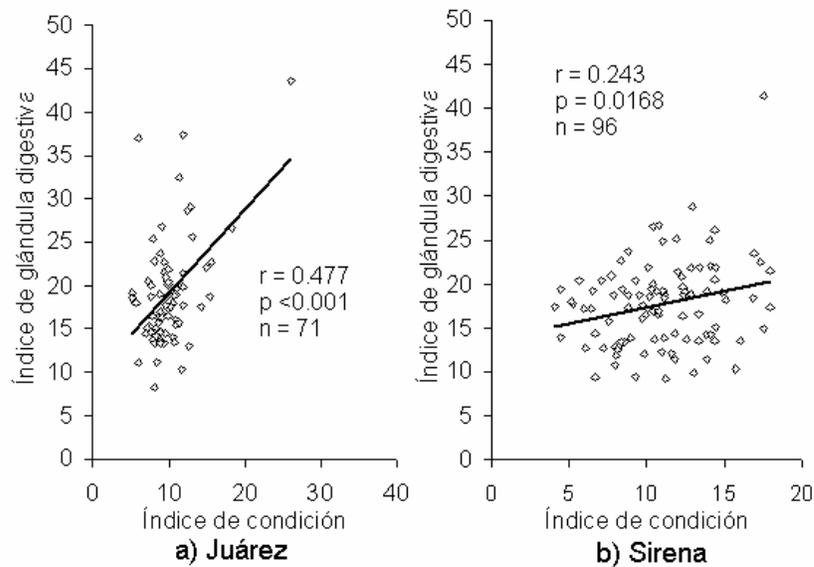


Figura 33. Correlación de Pearson entre el Índice de glándula digestiva y el índice de condición de *M. strigata* en a) Juárez y b) Sirena durante el periodo de estudio.

Los niveles de expresión de Hsp70 en *M. strigata* no registraron correlación con los parámetros de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto ( $p > 0.05$ ), así como con los índices de condición biológica (IGS, IGD e IC) excepto con el IGD en la estación Guamuchilera observando correlación negativa ( $r = -0.682$ ,  $p = 0.03$ ) y el IGS en la estación Boca ( $r = 0.962$ ,  $p = 0.038$ ). Una correlación negativa entre la expresión de Hsp70 y el IGD (Fig. 34a) puede indicar la presencia de contaminantes que converjan en la activación de Hsp70 y alteren la asimilación de nutrientes como pueden ser algunos plaguicidas organofosforados y carbamatos neurotóxicos que actúan sobre neurotransmisores (colinesterasas) inhibiendo la tasa de alimentación de los organismos (Satapornvanit, 2006). Por su parte, una correlación positiva entre la expresión de Hsp70 y el IGS (Fig. 34b) indica la participación de las proteínas de estrés en la integridad de las células gonádicas donde actúa como agente antiapoptótico (Zeng *et al.*, 2004); además, se han identificado como chaperones durante la división mitótica bajo condiciones normales y de estrés en grupos de vertebrados e invertebrados (Debec y Marcaillou, 1997; Dragon y Baumann, 2001).

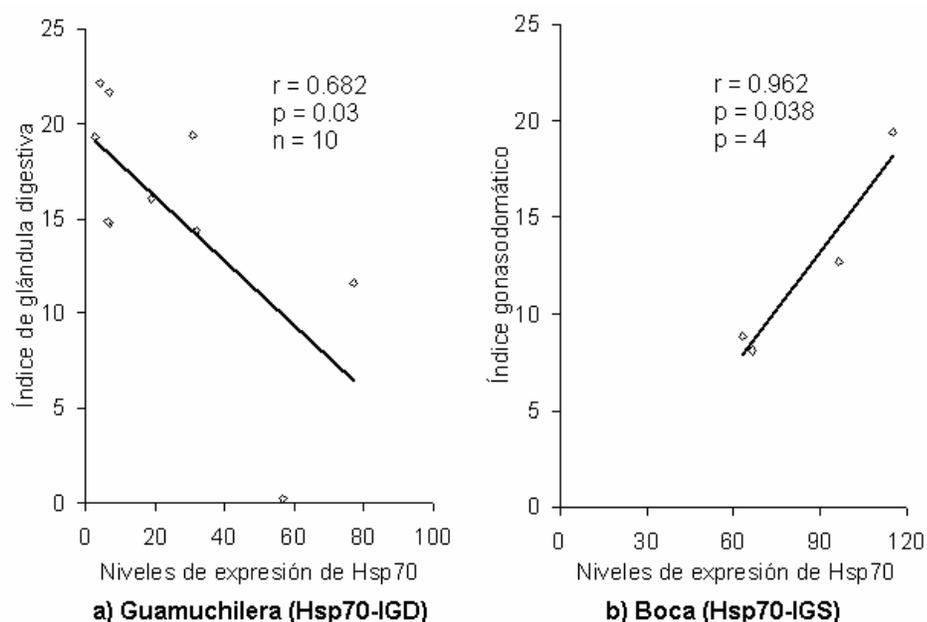


Figura 34. a) Correlación de Pearson negativa entre el Índice de glándula digestiva y los Niveles de expresión de HSp70 de *M. strigata* en Guamuchilera, b) Correlación positiva entre el Índice gonadosomático y los Niveles de expresión de HSp70 de *M. strigata* en Boca.

Por otro lado, no se encontró correlación entre los niveles de expresión de CYP4 de *M. strigata* con los parámetros ambientales e índices de condición biológica ( $p > 0.05$ ) (tabla 5) con excepción del IC con una correlación positiva en Boca ( $r = 0.865$ ,  $p = 0.003$ ) y el oxígeno disuelto con una correlación positiva en Cruces ( $r = 1.0$ ,  $p = 0.013$ ) (Fig. 29). Históricamente en el Estero Teacapán se han realizado relativamente pocos estudios de contaminación ambiental y se ha identificado la presencia de algunos metales pesados y plaguicidas (Rodríguez-Preciado, 2004; Galindo-Reyes *et al.*, 1992); sin embargo, se ha considerado como un ecosistema con mínimo impacto antropogénico lo que se refleja en el IC de *M. strigata*, lo cual da un indicativo de las condiciones de salud de los organismos en la estación Boca pese a observar una repoblación por mortalidades previas.

Asimismo, la expresión de CYP4 en los organismos con IC altos refleja que la expresión del gen no es inhibida en los organismos de mejor condición ya que participa (en condiciones normales) en el metabolismo de ácidos biliares, hormonas, ácidos grasos, entre otros procesos (Simpson, 1997); además, se ha asociado su inhibición con algunos hidrocarburos como BNF y ftalato lo que ha hecho considerar que la expresión de este gen se inhibe bajo estrés ambiental por contaminación antropogénica (Snyder, 1998; Chaty *et al.*, 2004). Sin embargo, CYP4 también se ha inducido en respuesta a otros contaminantes como aroclor 1254 (Jonson *et al.*, 2004) por lo que son necesarios mayores estudios para la caracterización del mismo en distintos grupos de animales y su comportamiento ante estresores químicos.

Por su parte, las condiciones de oxígeno disuelto del agua en la estación Cruces (Teacapán) parecen aumentar o disminuir la actividad metabólica de compuestos endógenos en *M. strigata*, infortunadamente la correlación está basada en un número reducido de datos (Fig. 35b). En contraparte, Mastuyugin *et al.* (1999) han reportado que bajo condiciones de hipoxia ocurre la inducción de una isoforma de CYP4 del epitelio de la córnea en humanos, por lo que es posible que las respuestas del gen a distintos estresores varíen de acuerdo a cada especie por lo que son necesarios estudios más detallados al respecto.

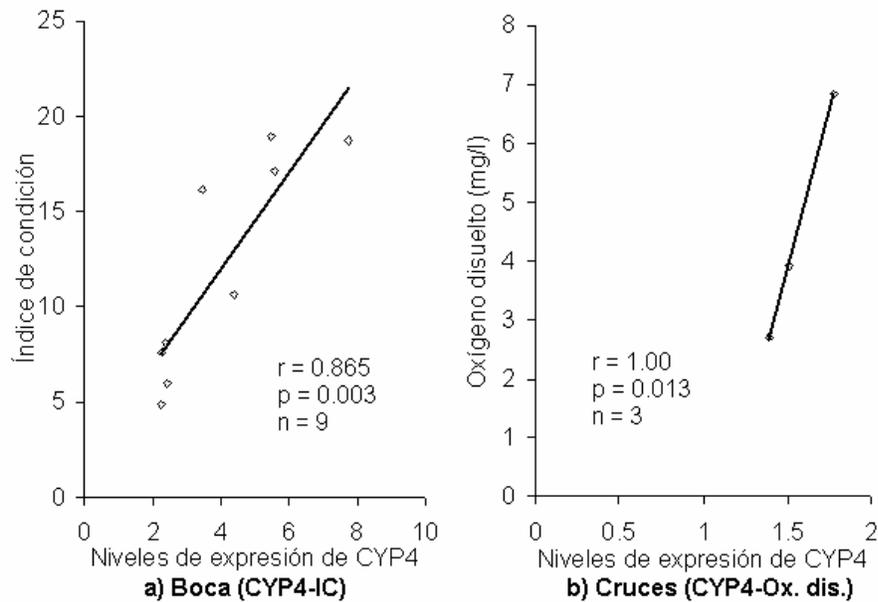


Figura 35. a) Correlación de Pearson entre el Índice de condición y los Niveles de expresión de CYP4 de *M. strigata* en Boca, b) Correlación entre concentración de oxígeno disuelto y los Niveles de expresión de HSp70 de *M. strigata* en Cruces.

Finalmente los niveles de expresión de Hsp70 y CYP4 en *M. strigata* presentaron un patrón similar en los organismos analizados en los tres ecosistemas durante el periodo de estudio, registrando una correlación directa ( $r=0.944$ ,  $p<0.001$ ) entre las dos variables (Fig. 36) lo que sugiere que ambos genes presentan un factor desencadenante común en respuesta a procesos de origen endógeno como la reproducción (Guzhova *et al.*, 2001) o para el mantenimiento de la integridad celular en respuesta a estresores químicos, sin embargo Snyder *et al.* (2001) en un ensayo de exposición de dos especies de bivalvos con aceite crudo observaron una correlación negativa entre la expresión de Hsp70 y CYP4, recomendando principalmente a Hsp70 como biomarcador en estudios de biomonitorio para exposición a hidrocarburos.

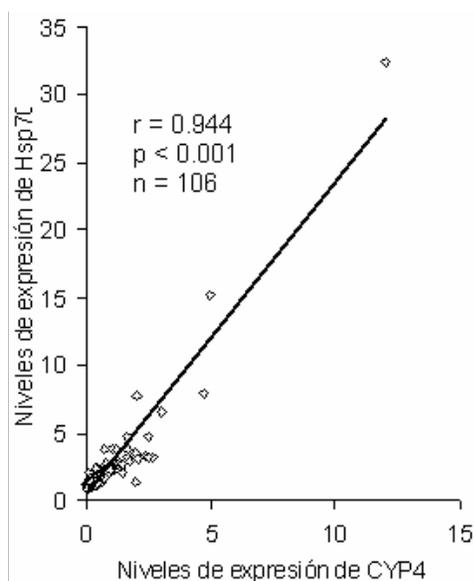


Figura 36. Correlación de Pearson entre el nivel de expresión promedio de Hsp70 y CYP4 de *M. strigata* durante el periodo de estudio.

### 7.2.3. *Mugil curema* y *Mytella strigata* como bioindicadores de estrés ambiental

Las especies con diferentes escenarios de exposición a contaminantes dentro de un mismo ecosistema, utilizadas como bioindicadores de estrés ambiental pueden dar cuenta del grado de impacto general y algunos escenarios particulares del mismo. Los peces y moluscos son grupos taxonómicos que reaccionan de manera diferente ante alteraciones ambientales, biológicas y/o composición química y es posible a través de ellas inferir cambios significativos en el ambiente (Lam y Wu, 2003).

En el presente estudio fueron analizados una serie de biomarcadores tanto en *Mugil curema* como en *Mytella strigata* y es posible discutir los escenarios en los que cada especie integra mejor información como bioindicador de las condiciones ambientales que las rodean.

De acuerdo con cada biomacador utilizado, por un lado, los índices de condición biológica dan cuenta de la situación nutricional, reproductiva y de salud general de los organismos donde *M. curema* por ser una especie neotónica, residente del ecosistema, de fácil manejo e identificación de sus órganos y con un ciclo de vida relativamente largo presentó un comportamiento mejor definido de acuerdo a las condiciones

ambientales de cada época del año con respecto a *M. strigata*, la cual al ser una especie de carácter sésil con ciclo de vida corto, está sujeta a las condiciones de un entorno reducido del ecosistema que pueden o no, reflejar las condiciones reales del bienestar del ecosistema; sin embargo, el índice reproductivo del bivalvo puede indicar condiciones favorables o desfavorables para la estabilidad de sus poblaciones en periodos cortos de tiempo. Bajo estos escenarios de comparación, la adecuada utilización de los índices biológicos de una u otra especie depende de cual sea el nivel espacial o temporal que se pretende monitorear, siendo mayormente utilizados los peces en estudios a mediano y largo plazo que reflejen la condición general de un ecosistema.

Por otro lado, los biomarcadores moleculares como Hsp70 y citocromo P450 están mejor caracterizados en peces que en moluscos, sin embargo el comportamiento de los niveles de expresión de Hsp70 en ambas especies fue similar debido a que es una familia de proteínas que realizan una función común en ambos grupos taxonómicos al mantener la integridad de las funciones celulares en los organismos y ambas especies dan cuenta de manera general de un grado de exposición a distintas mezclas de contaminantes y/o estresores ambientales donde el carácter sésil de *M. strigata* podría ser un mejor candidato para el monitoreo de sitios estratégicos como puede ser la identificación de efluentes o descargas puntuales de contaminantes en un ecosistema. En el caso de la utilización de los niveles de expresión de CYPs como biomarcador molecular general a mezclas de contaminantes, es evidente la falta de información respecto a la caracterización de genes relacionados con el metabolismo de desintoxicación en moluscos y son necesarios nuevos estudios al respecto, por lo que los peces generan información de mayor valía respecto a biomarcadores de éste tipo.

En el presente estudio fueron seleccionadas dos especies de grupos taxonómicos y escenarios de exposición diferentes para evaluar las respuestas de una batería de biomarcadores comunes, encontrando que la utilización de peces como bioindicadores refleja de mejor manera las condiciones generales del ecosistema por sus características de movilidad y exposición a diversos xenobióticos vía gástrica y respiratoria principalmente, tanto en la utilización de biomarcadores de condición

biológica como en biomarcadores de respuesta molecular, específicamente los niveles de expresión de proteínas de estrés Hsp70 y niveles de expresión de citocromos P450 como respuesta general a mezclas de contaminantes. Los índices de condición biológica y los niveles de expresión de proteínas de estrés Hsp70 como biomarcadores de exposición a mezclas de contaminantes y otros estresores ambientales en moluscos pueden ser utilizados como excelentes sentinelas en sitios estratégicos para identificar focos de contaminación y es potencial candidato para representar condiciones puntuales en el ecosistema (Lam y Wu, 2003); sin embargo, específicamente la utilización de los niveles de expresión de citocromos P450 en este grupo taxonómico actualmente no está bien definida como un buen biomarcador de estrés ambiental.

En resumen, los ecosistemas con mayores indicadores de estrés ambiental fueron el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón, reflejado principalmente en los elevados niveles de expresión de Hsp70 y citocromo P450 en ambas especies durante la mayor parte del ciclo de estudio, lo cual indica una exposición temprana a estresores ambientales, probablemente de origen orgánico y de fuentes de emisión antropogénicas. Por otra parte, los índices de condición son indicadores de escenarios diferentes en ambas especies; por un lado, en *M. strigata*, los índices de condición elevados en el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón probablemente son indicadores de la presencia de materia orgánica y enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas; por otro lado, en *M. curema*, el índice hepatosomático mayormente elevado en los sistemas antes mencionados, aporta evidencia de una exposición crónica a sustancias tóxicas, mientras que los bajos índices, gonadosomático y de condición reflejaron efectos negativos en la reproducción y condiciones nutricionales de los peces, resultado de la exposición a estresores ambientales. El ecosistema con menos indicadores de exposición y efectos por estrés ambiental fue el Estero Teacapán, con los menores niveles de expresión de Hsp70 y citocromo P450 en ambas especies, así como índices de condición que en su conjunto, dan evidencia de un sistema con bajo impacto en los organismos por efectos de estrés ambiental; sin embargo, los cambios en las condiciones de salinidad provocaron efectos negativos en

las poblaciones de *M. strigata*, lo cual es considerado como un factor de estrés ambiental.

De acuerdo con la información analizada en los tres ecosistemas y las dos especies de estudio durante un periodo anual; es relevante destacar que, a pesar de las similitudes biogeográficas de los tres sistemas lagunares-estuarinos, el impacto de las diferentes actividades antropogénicas desarrolladas en sus márgenes, ya registra alteraciones a distintos niveles de organización en especies residentes y de diferentes niveles tróficos; señalando en orden descendente de estrés ambiental, al Estero de Urías, Ensenada del Pabellón y Estero Teacapán respectivamente, mediante biomarcadores de exposición y efecto que proporcionaron evidencias y permitieron diferenciar la calidad y salud de los ecosistemas.

## 8. CONCLUSIONES

1. La proporción de sexos en *M. curema* fue constante y significativamente mayor para hembras de los tres ecosistemas lo que podría estar relacionado con alteraciones ambientales.
2. La población de *M. curema* del Estero Teacapán presentó la mejor condición reproductiva, menor estrés hepático y mejor condición general reflejados en los índices biológicos, por el contrario, los sistemas de Ensenada del Pabellón y Estero de Urías indican efectos negativos en la salud poblacional probablemente por la presencia de estresores ambientales de origen antropogénico.
3. Los índices de condición biológica en *M. strigata* fueron indicadores principalmente de la presencia de materia orgánica y enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas, sobresaliendo el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón.
4. La correlación positiva entre Hsp70 y CYP450 sugiere que ambos genes responden de manera similar a estresores en los tres ecosistemas y pueden considerarse como buenos biomarcadores de estrés ambiental.
5. Las especies con diferentes escenarios de exposición a contaminantes dentro de un mismo ecosistema, utilizadas como bioindicadores de estrés ambiental pueden dar cuenta del grado de impacto general como es el caso de *M. curema* por su carácter nectónico y algunos escenarios particulares o puntuales dentro del mismo como es el caso de especies sésiles como *M. strigata*. De esta manera, ambas especies podrían ser consideradas candidatas a estudios de biomonitoreo ambiental que de manera complementaria muestran condiciones particulares y generales de la salud de un ecosistema.
6. Integrando la información obtenida en términos de **estrés ambiental**, los resultados del presente trabajo se podrían compendiar de la siguiente manera: Estero de Urías > Ensenada del Pabellón > Estero de Teacapán.

## 9. RECOMENDACIONES

- ◇ Aumentar el tamaño de muestra hasta obtener un número aceptable de machos (en caso de *M. curema*) que permitan el análisis adecuado de los biomarcadores y determinar posibles diferencias entre sexos.
- ◇ Monitorear el área de estudio de manera continua y en periodos cortos de tiempo los principales parámetros ambientales y físico-químicos que puedan ser correlacionados con cambios en los biomarcadores.
- ◇ Realizar bioensayos de exposición de las especies bioindicadoras con los principales estresores ambientales y químicos identificados en los ecosistemas de estudio que sirvan de apoyo para determinar los biomarcadores adecuados en futuros estudios de biomonitoreo.
- ◇ En la utilización de moluscos como bioindicadores es recomendable determinar el contenido de materia orgánica, nutrientes (N y P) y clorofila en la columna de agua ya que las condiciones nutricionales podrían influir en la resistencia de los organismos a los contaminantes.
- ◇ Incluir biomarcadores reproductivos para conocer el esfuerzo y viabilidad gonádica (índice gonádico, tamaño de ovocitos, índice de fecundidad, etc.) de las especies y determinar el éxito reproductivo bajo condiciones adversas.
- ◇ Realizar estudios que generen información sobre la caracterización de CYP4 en *M. strigata* y determinar su relevancia como biomarcador en distintos escenarios de múltiples estresores.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adam A., R. Bártfai, Z. Lele, P. H. Krone y L. Orbán. 2000. Heat-Inducible Expression of a Reporter Gene Detected by Transient Assay in Zebrafish. *Exp. Cell Res.* 256: 282–290
- Álvarez-Cadena J. N., M. A. Aquino, F. Alonzo, J. G. Millán y F. Torres. 1984. Composición y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar Huizache-Caimanero. Parte I Agua Dulce 1978. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.* 11(1): 163-180.
- Álvarez-León, R. 1980. Hidrología y zooplancton de tres esteros adyacentes a Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón, México.* 7(1): 177-195.
- Amjad S. y J. S. Gray. 1983. Use of the nematode: copepod ratio as an index of organic pollution. *Mar. Poll. Bull.* 14(5): 178-181.
- Arinç E. y A. Şen. 1999. Hepatic cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in mullet and common sole as a indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay, Turkey. *Mar. Env. Res.* 48: 147-160.
- Arinç E., A. Şen y A. Bozcaarmutlu. 2000. Cytochrome P4501A and associated mixedfunction oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure Appl. Chem.* 72(6): 985–994.
- Arinç E., S. Kocabiyik y E. Su. 2001. Induced CYP1A mRNA, protein and catalytic activity in the liver of feral fish, leaping mullet, *Liza saliens*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 128: 281-290.
- Backlund M., L. Weidolf y M. Ingelman-Sundberg. 1999. Structural and mechanistic of transcriptional induction of cytochrome P450 1A1 by benzimidazole derivatives in rat hepatoma H4IIE cells. *Eur. J. Biochem.* 261: 66-71.

- Báez M., Y.G. Severeyn y H. Severeyn. 2005. Reproductive cycle of *Geukensia demissa* (Bivalvia: Mytilidae) on a beach at Nazaret, El Moján, Zulia state, Venezuela. *Cienc. Mar.* 31(1A): 111-118.
- Barber D.S., A.J. McNally, N. García-Reyero y N.D. Denslow. 2007. Exposure to *p,p'*-DDE or dieldrin during the reproductive season alters hepatic CYP expression in large mouth bass (*Microphterus salmoides*). *Aquat. Toxicol.* 81: 27-35.
- Battaglin W. y J. Fairchild. 2002. Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms. *Water Sci. and Tech.* 45(9): 95-103.
- Beliaeff B. y T. Burgeot. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6): 1316-1322.
- Belpaeme, K., K. Cooreman y M. Kirsch-Volders. 1998. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mut. Res.* 415:167-184.
- Berg, H. 2003. Teleost reproduction: Aspects of the arctic char (*Salvelinus alpinus*) oocyte growth and maturation. Tesis. Univ. Umea. Umea, Suecia. 45 pp
- Berlanga, C. 1999. Evaluación de las condiciones actuales y del cambio en los paisajes de humedales de la costa sur de Sinaloa, México: una aproximación con el uso de datos provenientes de sensores remotos. Tesis de Maestría, Univ. Nal. Autón. Méx. 111 pp
- Bernet D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm y T. Wahli. 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22: 25-32.
- Briones-Ávila E., P. Fuentes-Mata y J.I. Fernández-Méndez. 2002. La pesquería de Lisa del Pacífico. En: Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo 1999-2000. SAGARPA/INP. pp: 275-294.
- Bromage N. and R. Cumaranatunga. 1988. Egg Production in the Rainbow Trout. pp. 63-138. In: Muir J. F. and R. J. Roberts. Recent advances in aquaculture Volume 3. Croom Helm Ltd. London & Sydney. 420 p.

- Burgeot, T., G. Bocquéné, P. Truquet, L.L. Dean y F. Galgani. 1994. Induction of EROD activity in red mullet (*Mullet barbatus*) along the French Mediterranean coasts. *Sc. Total Environ.* 142: 213-220.
- Busacker G.P., I.R. Adelman y E.M. Goolish. 1990. Chapter 11: Growth. pp. 363-387. *in:* Shreck C. B. y P. B. Moyle (Eds.). *Methods for fish biology.* American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. 684 p.
- Cajaraville, M.P; M.J. Bebianno, J.B. Cinta-Porte, C. Sarasquete y A. Viarengo. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.* 247 (2-3): 295-311.
- Cartier S., J. Pellerin, M. Fournier, E. Tamigneaux, L. Gilault y N. Lemaire. 2004. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites. *Aquaculture.* 241(1-4): 633-654.
- Castro-Aguirre, J.L., H.S. Espinosa-Pérez y J.J. Schmitter-Soto. 1999. Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Colección Textos Politécnicos. Ser. Biotech. México. 711 p.
- Chapman P.M. y F. Wang. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 3-22.
- Chaty S., F. Rodius y P. Vasseur. 2004. A comparative study of the expresión of *CYP1A* and *CYP4* genes in aquatic invertebrates (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrates (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic. Toxicol.* 69: 81-93.
- Chen M.H. y C.Y. Chen. 1999. Bioaccumulation of sediment-bound heavy metals en grey mullet, *Lisa macrolepis*. *Mar. Poll. Bull.* 39(1-12): 239-244.
- Ching E.W.K., W.H.L. Siu, P.K.S. Lam, L. Xu, Y. Zhang, B.J. Richardson y R.S.S. Wu. 2001. DNA adducts formation and DNA strand breaks in green-lipped mussel (*Perna viridis*) exposed to benzo-a-pirene: dose- and time-dependent relationships. *Mar. Poll. Bull.* 42(7): 603-610.

- CNA. 2005. Análisis mensual de precipitación por entidad federativa. Red climatológica de tiempo real. En la web: smn.cna.gob.mx.
- Collins M.R. 1985. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida). White Mullet. U.S. Fish Wild. Ser. Biol. Rep. 82: 11-39.
- Contreras E.F. 1993. Los ecosistemas costeros Mexicanos. CONABIO/UAM. 413 p.
- Couillard C.M., P.J. Williams, S.C. Courtenay y G.P. Rawn. 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. Aquatic. Toxicol. 44: 263-278.
- Cuevas-Guevara, C.A. 1978. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, C. palmula Carpenter y *C. iridescens* Hanley, de San Blas, Nayarit, México (bivalvia: ostreidae). An. Cen. Cienc. Mar y Limnol.
- Davis W.P 1995. Evidence for developmental and skeletal responses as potential signals of endocrine disrupting compounds in fishes. In: Rolland R. M., M. Gilbertson y R. E. Peterson. Chemically induced alteration in functional development and reproduction of fishes. SETAC. Tech. Pub. Ser. pp. 61-72.
- De Metro G., A. Corriero, S. Desantis, D. Suban, F. Cirillo, M. Deflorio, C.R. Bridges, J. Eikkler, J.M. de la Serna, P. Megalofonou y D.E. Kime. 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L). Mar. Poll. Bull. 46(3): 358-361.
- Deane E.E. y Y.S. Woo. 2006. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea dream fibroblasts. Aquatic. Toxicol. 79: 9-15.
- Debec A. y C. Marcaillou. 1997. Structural alterations of the mitotic apparatus induced by the heat shock response in *Drosophila* cells. Biol. Cell. 89: 67-78.
- DEEE, Dirección de Estadísticas y Estudios Económicos. 1985. Síntesis monográfica: Municipio de Culiacán, Gobierno del Estado de Sinaloa. 1-248.

- Devlin R.H y Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191-364.
- Dragon S. y R. Baumann. 2001. Erythroid carbonic anhydrase and Hsp70 expression in chick embryonic development: role of cAMP and hypoxia. *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.* 280: 870-878.
- Facey D.E., V.S. Blazer, M.M. Gasper y C.L. Turcotte. 2005. Using fish biomarkers to monitor improvements in environmental quality. *J. Aq. Anim. Health.* 17: 263-266.
- Fajer-Ávila E.J., A. García-Vázquez, H. Plascencia-González, J. Ríos-Sicairos, L.M. García-de la Parra y M. Betancourt-Lozano. 2006. Copepods and larvae of nematodos parasiting the white Mullet *Mugil curema* (Valenciennes, 1836): Indicators of anthropogenic impacts en tropical coastal lagoons?. *Environ. Mon. Assess.* 122: 221-237.
- Fanta E.F., S.A. Ríos, S. Romao, A.C. Casagrande-Vianna y S. Freiburger. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 119-130.
- Fent, K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology.* 205: 223-240.
- Froese, R. and D. Pauly. 2003. Editors. FishBase. World Wide Web electronic publication. En la web: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), versión abril 2004.
- Galindo, J. 2000. Condiciones ambientales y de contaminación en los ecosistemas costeros. SEMARNAP. Univ. Autón. Sin. 1-149.
- Galindo-Reyes G., J. Montes-Verdugo, D. Bassin y R. Carvajal. 2003. Pollution by polichlorinated biphenyls in an estuary of the Gulf of California. Their toxicity and bioaccumulation in shrimp *Litopenaeus vannameii*. *Mar. Poll. Bull.* 46: 959-963.
- Galindo-Reyes J.G., M.A. Guerrero-Ibarra, G. Villagrana-Lizárraga, L.G. Quesada-Urenda y S. Angulo-Escalante. 1992. Contaminación por plaguicidas en agua, sedimentos, camarón y almeja, de dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. *Trop. Ecol.* 33(2): 172-180.

- Galindo-Reyes J.G., C. Villagrana L. y G. Lazcano-Álvarez. 1999. Environmental conditions and pesticide pollution of two coastal ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotox. Environ. Saf.* 44: 280-286.
- García-Gasca S.A., J. Ríos-Sicairos, R. Hernández-Cornejo, P.V. Estañol, H. Plascencia, L.M. García de la Parra y M. Betancourt-Lozano. Vitellogenin transcription and reproduction in white mullet (*Mugil curema*) from two estuaries in northwest Mexico. *Ecol. Environ. Saf.* (en prep.).
- González-López, Y. 2005. Inducción de CYP1A en lisa *Mugil curema* de dos esteros del Noroeste de México. Reporte final de residencia profesional. Inst. Tecnol. Mar, Maz., Sin. 1-38.
- Green-Ruiz C.R. y Páez-Osuna F. 2001. Heavy metal anomalies in lagoon sediments related to intensive agriculture in Altata-Ensenada del Pabellón coastal system (SE Gulf of California). *Environ. Intern.* 26: 265-273.
- Gutiérrez-Rivera J.N. 2002. Clonación y expresión de un receptor de hormona glicoproteíco en el ovario del botete *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán.
- Guzhova I.K. Kislyacova, O. Moskaliyova, I. Fridlanskaya, M. Tytell, M. Cheetham y B. Margulis. 2001. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res.* 914: 66-73.
- Hall J.A., C.L. Frid y M.E. Gill. 1997. The response of estuarine fish and benthos to an increasing discharge of sewage effluent. *Mar. Poll. Bull.* 34(7): 527-535.
- Hamdoun A.M.m D.P. Cheney y G.N. Cherr. 2003. Phenotypic plasticity of Hsp70 and Hsp70 gene expression in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 205: 160-169.
- Harrison, I.J. 1995. Mugilidae: 1293-1298. *in*: Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem (Redactores Técnicos). Guía FAO para la

identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. III. Vertebrados-Parte 2: 1201-1813.

Hendrickx, M.E. 1983. An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. 10: 187-194.

Hume D. 2001. Environmental monitoring and fluctuating asymmetry. Study design, DOC. Science internal series 4. Dep. of Cons, Wellington. 1-20.

Iwama G.K., M.M. Vijayan, R.B. Forsyth y P.A. Ackerman. 1999. Heat shock protein and physiological stress in fish. Amer. Zool. 39: 901-909.

Innes D.A. y L.E. Haley. 1977. Genetic aspects of larval growth under reduced salinity in *Mytilus edulis*. Biol. Bull. 153: 312-321.

Jans, D.M., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R. & van der Kraak, G. 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. Toxicol. Appl. Pharmacol. 147: 391-398.

Jonsson H., K.V. Sandnes, D. Chiedek, R. Schneider, B.E. Grosvik y A. Goksoyr. 2004. Development of two novel CYP-antibodies and their use in a PCB exposure experiment with *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 58: 655-658.

Kammann U., S. Biselli, H. Hühnerfuss, N. Reineke, N. Theobald, M. Vobach y W. Wosniok. 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environ. Pollut. 132: 279-287.

Khan, R.A. y J.F. Payne. 2002. Some factors influencing EROD activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) exposed to effluent from a pulp and paper mill. Chemosphere. 46: 235-239.

Kirby M. F., B. P. Lyons, M. J. Waldock, R. J. Woodhead, F. Goodsir, R. J. Law, P. Matthiessen, P. Neall, C. Stewart, J. T. Thain, T. Tylor y S. W. Feist. 2000. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish and their application in marine monitoring. Sci. Ser. Tech. Rep. CEFAS. Lowestoft. 110: 1-30.

- Köhler H.R., M. Zanger, H. Eckwert and I. Einfeldt. 2000. Selection favours low Hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *J. Evol. Biol.* 13: 569–582.
- Kopecka J., K.K. Lehtonen, J. Barsiene, K. Broeg, P. Vuorinen, J. Gercken y J. Pempkowiak. 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (Southern Baltic). *Mar. Poll. Bull.* 53: 406-421.
- Kültz D. 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67(13): 1-33.
- Lagler, K. F. 1978. Freshwater fishery biology. W.M. C. Brown, Dubuque, Iowa. 421 p. *in*: Valles R. M. E., G. C. Ruiz y L. S. Galavíz. 2000. Presencia e intensidad parasitaria en *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae), del Río Colorado, Baja California, México. *Rev. Biol. Trop.* 48(2/3): 495-591.
- Lam P.K.S. y R.S.S. Wu. 2003. Use of biomarkers in environmental monitoring. STAP/GEF y Min. Environ. Gov. of Japan. 1-79.
- Lamshead P. J.D. 1986. Sub-catastrophic sewage and industrial waste contamination as revealed by marine nematode faunal analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 29: 247-260.
- Lankford R.R. 1977. Coastal lagoons of México. Their origin and classification. UNESCO y Centro Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. Méx. México, D. F. 182-215.
- Laroche J., L. Quiniou, G. Juhel, M. Auffret y D. Moraga. 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(12) 2705-2712.
- Leal-Tarín, B.A. 2007. Análisis de la condición reproductiva del mejillón de mangle, *Mytella strigata*, en sistemas costeros de Sinaloa con diferentes escenarios de contaminación. Tesis de Maestría. CIAD, A.C. U. Maz. 1-96.

- Leatherland J.L., J.S. Ballantine y G. van der Kraak. 1998. Diagnostic assessment of as sentinel organisms for environmental studies. pp. 335-366. *In*: Leatherland J. L. y P. T. K. Woo. Fish diseases and disorders. Vol. 2: Non- Infections disorders. University of Guelph, Welph, Ontario, Canada. 1-400.
- Lee C.S. 1981. Factors affecting eggs characteristics in the fish *Sillago sihama*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 4: 361-363.
- Lee J.S. y J.S. Seo. 2002. Differential expression of two stress-inducible hsp70 genes by various stressors. Exp. Mol. Med. 34(2): 131-136.
- Lenhardt M. y C. Predrag, 2000. A comparative toxicological study of the Pike (*Exos lucius* L.) from two localities in the river Danube whit different levels of pollution. Inst. Biol. Res. Belgrade, Yugoslavia. 19-28.
- Lester R.J. T., C. Thomson, H. Moss y S.C. Barker. 2001. Movement and stock structure of narrow-barred Spanish mackerel as indicated by parasites. J. Fish Biology. 59: 833-842.
- Lewis D.F.V., M.N. Jacobs, M. Dickins y B. G. Lake. 2002. Quantitative structure–activity relationships for inducers of cytochromes P450 and nuclear receptor ligands involved in P450 regulation within the CYP1, CYP2, CYP3 and CYP4 Families. Toxicology. 176: 51–57.
- Luna L.G. 1960. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Mc Graw-Hill, New York. 5-38.
- Luna L.G. 1968. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissues artifacts. 507-509.
- Lyons, B.P., C. Stewart y M.F. Kirby. 1999. The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder *Platichthys flesus*/collected from the River Tyne Estuary. Mut. Res. 446:111–119

- Macdowell-Capuzzo J., M.N. Moore y J. Widdows. 1988. Effects of toxic chemicals in the marine environment: prediction of impacts from laboratory studies. *Aquat. Toxicol.* 11: 303-311.
- Mackenzie K. 1999. Viewpoint. Parasites as pollution indicators in marine ecosystems: a proposed early warning system. *Mar. Poll. Bull.* 38(11): 955-959.
- McCarthy J.F. & L.R. Shugart. 1990. Biomarkers of environmental contamination. J.F. McCarthy & L.R. Shugart (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 1-475.
- Malmström C.M., S. Miettinen y G. Bylund. 2000. DNA adducts in liver and leukocytes of flounder (*Platichthys flesus*) experimentally exposed to benzo[*a*]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 48: 177-184.
- Mastyugin V., El Aversa, A. Bonazzi, C. Vafaes, P. Mieyal y M.L. Schwartzman. 1999. Hypoxia-induced production of 12-hydroxyeicosanoids in the corneal epithelium: Involvement of a cytochrome P-4504B1 isoform. *J. Pharm. Exp. Therap.* 289: 1611-1619.
- Medina, M. 1980. El factor de condición múltiple (Km) y su importancia en el manejo de poblaciones de carpa Israel (*Cyprinus carpio specularis*). In: Manuales técnicos de acuicultura. 1: 5-10.
- Mendez-Ubach, N. y F. Páez-Osuna. 1998. Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlan Bay: effect of body size on concentrations. *Environ. Pollut.* 102: 279-285.
- Mendez-Ubach. N. 2002. Annelid assemblages in soft bottoms subjected to human impact in the Urías estuary (Sinaloa, México). *Oceanol. Act.* 25:139-147.
- Merson R.R., C.S. Casey, C. Martínez, B. Soffientino, M. Chandlee y J. L. Speaker. 2000. Oocytes development en summer flounder: seasonal changes and steroids correlates. *J. Fish Biol.* 57: 182-196.
- Mihelic D., A. Slavica, V. Gjurcevic-Kantura, Z. Janicki y K. Babic. 1999. The influence of sea pollution on the histoenzymatic activity in the gills and some other organs of

- the digestive system in mullet (*Mugil cephalus*) and coast crab (*Carcinus aestuari* Nardo). Veterinarski Archiv. 69(3): 115-124.
- Mitchelmore, C.L. y J.K. Chipman. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mut. Res. 399: 135–147.
- Moles A. y B.L. Norcross. 1998. Effects of oil-laden sediments on growth and health of juvenile flatfish. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55: 605-610.
- Munkittrick, K.R., M.E. McMaster, G. Van Der Kraak, C. Portt, W.N. Gibbons y A. Farwell. 2000. Development of methods for effects-driven cumulative effects assessment using fish populations: Moose River project, SETAC Technical Publication Series. Pensacola, Florida: SETAC.
- Narendra, P.S. 2000. RAPID COMMUNICATION: A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. Exp. Cell Res. 256: 328–337.
- Narendra P.S., C.H. Muller y R.E. Berger. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertility and Sterility. 80 (6): 1420-1430.
- National Research Council, 1987. Committee on biological markers. Environ. Health Persp. 74: 3-9.
- Neuer A., S.D. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks y S.S. Witkin. 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. Human Reprod. Update. 6(2): 149-159.
- Nicolas J.M. 1999. Review. Vitellogenesis in fish and the effects of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. Aq. Toxicol. 45: 77-90.
- Nigro M., F. Frenzilli, V. Scarcelli, S. Gorbi, F. Regoli. 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. Mar. Environ. Res. 54: 517–520.
- Odum H.T. 1988. Environmental Systems and Public Policy. Part II. Types of Ecosystems, Estuaries. Univ. Fl, Gainesville, USA.

- Olsson P.E. 1998. Disorders associated with heavy metal pollution. pp. 101-131. *In*: Leatherland J. L. y P. T. K. Woo. Fish diseases and disorders. Vol. 2: Non-Infections disorders. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 1-400.
- Orellana M.T. y V.T. Guajardo. 2004. Actividad de citocromo P450 y sus alteraciones en diversas patologías. *Rev. Med. Chile.* 132: 85-94.
- Osuna-López, I., H. Zazueta-Padilla, G. López-López, G. Izaguirre-Fierro y M. Frías-Espiricueta. 2001. Plaguicidas organofosforados en sedimentos de lagunas costeras con importancia ecológica pesquera de Sinaloa. Primer Foro Estatal de Ciencia y Tecnología. CECyT. 251-263.
- Páez-Osuna F., S.R. Guerrero-Galván y A.C. Ruiz-Fernandez. 1998. The environmental impact of shrimp aquaculture and the coastal pollution in México. *Mar. Poll. Bull.* 36: 65-75.
- Páez-Osuna F. y J.I. Osuna-López. 1990. Distribución de metales pesados en fracciones geoquímicas de sedimentos superficiales del Bajo Golfo de California. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.* 17(2): 287-298.
- Páez-Osuna F. y L. Tron-Mayen. 1996. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of wild and farmed shrimp *Penaeus vannamei* from the north-west coast of Mexico. *Environ. Int.* 22(4): 443-450.
- Pathiratne A. y S. George. 1996. Comparison of xenobiotic metabolizing enzymes of *Tilapia* with those of other fish species and interspecies relationship between gene families. *Mar. Environ. Res.* 42(1-4): 293-296.
- Porte C., E. Escartín, L.M. García de la Parra, X. Biosca, J. Albaigés. 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 235: 205–216.
- Raffaelli D.G. y C.F. Mason. 1981. Pollution monitoring with meiofauna using the ratio of nematodes to copepods. *Mar. Poll. Bull.* 12(5): 158-163.

- Rainer J.S. y R. Mann. 1992. Comparison of methods for calculating condition index in eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). J. Shell. Res. 11(1): 55-58.
- Reusch T.B. 1998. Differing effects of eelgrass *Zostera marina* on recruitment and growth of associated blue mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 167: 149-153.
- Rewitz K.F., C. Kjellerup, A. Jorgensen, C. Petersen y O. Andersen. 2004. Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. 138: 89-96.
- Riba I., E. García-Luque, J. Blasco y T.A. DelValls. 2003. Bioavailability of heavy metals bound to estuarine sediments as a function of pH and salinity values. Chem. Spec. Bioav. 15(4): 101-114.
- Ricker, W. 1975. Handbook of computations for biological statistic of fish population. Fish. Res. Bd. Canada Bull. 119: 1-300.
- Ríos-Sicairos J. 2004. Análisis comparativo de la condición biológica de la lisa blanca (*Mugil curema* VALENCIENNES, 1836) como indicador de estrés ambiental en dos sistemas lagunar estuarinos de la costa sureste del Golfo de California. Tesis licenciatura. Esc. Biól. Univ. Autón. Sin. 1-88.
- Rocha-e-Silva T.A., F.T. Rantin, J.E. Matsumura-Tundisi, T. Matsumura-Tundisi, J.G. Tundisi e I.A. Degterev. 2004. Dynamics of cytochrome P450 inducers in polluted sites of Sao Paulo City reservoirs. Ecotox. Environ. 59: 109-115.
- Rodríguez-Gutiérrez M. y S. Marañon-Herrera. 1993. Relación del factor de condición múltiple con la reproducción de machos en la carpa *Cyprinus carpio*. An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. 20(1): 105-113.
- Rodríguez-Preciado A. 2004. Bioacumulación de mercurio (Hg) en tejido muscular de la lisa *Mugil curema* (Valenciennes, 1938) de los esteros Urías y Teacapán, Sinaloa. Tesis licenciatura. Fac. Ing. Pesq. Univ. Autón. Nayarit. San Blas, Nayarit.

- Rodríguez-Rúa A., M.A. Prado, Z. Romero y M. Bruzón. 2003. The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir estuary (Cádiz, SW Spain). *Aquaculture*. 217 (1-4): 157-166.
- Rogers P. y A. García-Cubas. 1980. Evolución gonádica a nivel histológico del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) del sistema fluvio lagunar Atasta-Pom, laguna de Términos, Campeche, México. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*.
- Rosales-Hoz M.T.L. 1979. Sobre la dispersión de compuestos organoclorados en el medio ambiente marino: Nota científica. *An. Centro Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México*. 6(1): 33-36.
- Roy L.A., J.L. Armstrong, K. Sakamoto, S. Steirnert, E. Perkins, D.P. Lomax, L.L. Johnson y D. Schilenk. 2003. The relationships of biochemical endpoints to histopathology and pollution metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater out falloff Orange County, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(6):1309-1317.
- Ruelas-Inzunza J.R y F. Páez-Osuna. 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder in a subtropical coastal environment (Southeast Gulf of California). *Environ. Pollut.* 107: 437-444.
- Ruiz-Fernandez A.C, F. Páez-Osuna, M. Soto-Jimenez, C. Hillaire-Marcel y B Ghaleb. 2003. The loading history of trace metals and nutrients in Altata-Ensenada del Pabellón, lagoon complex, northwestern Mexico. *J. Environ. Rad.* 69: 129-143.
- Sanderson T. y M. van den Verg. 2003. Interaction of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl. Chem.* 75(11-12): 1957-1971.
- Santos, H.B., E. Rizzo, N. Bazzoli, Y. Sato y L. Moro. 2005. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lütken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *J. Fish Biol.* 67: 1446-1459.

- Satapornvanit K. 2006. Feeding behaviour of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* as an indicator of pesticide contamination in tropical freshwater. Tesis Doctoral. Univ. Stirl. Inst. Aquac. 1-255.
- Schlenk D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessment. Mar. Pollut. Bull. 39, 48-53.
- Schmitt, C.J. y G.M. Dethloff. 2000. Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems. Information and Technology Report . U.S.A. Geol. Surv. Biol. Res. Div. 1-81.
- Simpson A.E.C.M. 1997. Review: The cytochrome P450 4 (CYP4) family. Gen. Pharmac. 28(3): 351-359.
- Siroká Z y J. Drastichová. 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination—Cytochrome P450 in fish. A review. Act. Vet. BRNO. 73: 123-132.
- Sleiderink H.M. y J.P. Boon. 1995. Cytochrome P450 1A response in North Sea Dab, *Limanda limanda*, from Offshore and Coastal Sites. Mar. Poll. Bull. 30(10): 660-666.
- Smith A.K. e I.M. Suthers. 1999. Effects of sewage effluent discharge on the abundance, condition and mortality of hulafish, *Thachinops taeniatus* (Plesiopidae). J. Environ. Pollut. 106: 97-106.
- Snyder M.J. 1998. Identification of a new cytochrome P450 family, CYP45, from the lobster, *Homarus americanus*, and expression following hormone and xenobiótico exposures. Arch. Biochem. Biophys. 358(2): 271-276.
- Snyder J.M., E. Girvetz y E.P. Mulder. 2001. Induction of marine molluscs stress proteins by chemical or physical stress. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 22-29.
- Sorensen P.W., H.L. Schoenfuss, I.R. Adelman y D.L. Swackhamer. 2001. Assessing the effects of endocrine disruptors (EDCs) from a St. Paul sewage treatment plant

- on sperm viability and testicular development in fish: Adding a new dimension to an existing project. WCR Research. 35-37.
- Soto-Jiménez M. y F. Páez-Osuna. 2001. Cd, Cu, Pb and Zn in lagoonal sediments from Mazatlán Harbor (SE Gulf of California): Bioavailability and Geochemical fractioning. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66: 350-356.
- Soto-Jiménez M. y F. Páez-Osuna. 2001. Distribution and normalization of heavy metal concentrations in mangrove and lagoonal sediments from Mazatlan Harbor (SE Gulf of California). Est. Coast. Shelf Sc. 53: 259-274.
- Soto-Jiménez M., F. Páez-Osuna y F. Morales-Hernández. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from the discharge zone of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (southeast Gulf of California): chemical fraction and bioaccumulation factors. Environ. Pollut. 114: 357-370.
- Spanopoulos-Hernández M., C.A. Martínez-Palacios, R.C. Vanegas-Pérez, C. Rosas y L.G. Ross. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). Aquaculture. 244: 341-348.
- Steinert S.A. y G.V. Pickwell. 1993. Induction of Hsp70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. Mar. Environ. Res. 35(1-2): 89-93.
- Stegeman J.J. 2000. Cytochrome P450 gene diversity and function in marine animals: past, present, and future. Mar. Environ. Res. 50: 61-81.
- Stegeman, J.J. y M.E. Hahn. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., G.K. Ostrander (Ed.). Aquat. Toxicol. Boca Raton: Lewis Publishers. pp. 87-203.
- Stoica A., B.S. Katsenellenbogen y M.B. Martin. 2007. Activation of estrogen receptor- $\alpha$  by the heavy metal cadmium. Mol. Endo. 14(4): 545-553.

- Triebkorn R., S. Adam, H. Casper, W. Honnen, M. Pawert, M. Schramm, J. Schwaiger y H.R. Köhler. 2002. Biomarker as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology*. 11: 451-465.
- Tyler C.R. y J. Roudledge. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appli. Chem.* 70(9): 1735-1804.
- van der Oost R., J. Beyer, N.P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13: 57-149.
- van der Ven L.T.M., P.W. Wester y J.G. Vos. 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22(4): 908-913.
- van Veld P.A., D.J. Westbrook, B.R. Goodin, R.C. Hale, C.L. Smith, R.J. Huggett y J.J. Stegeman. 1990. Induced Cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquat. Toxicol.* 17: 119-132.
- Vethaak, A.D., D. Bucke, T. Lang, P.W. Wester J. Jol y M. Carr. 1992. Fish disease monitoring along a pollution transect: a case study using dab *Limanda limanda* in the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 173-192.
- Villanueva S.F. y A.V. Botello. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Rev. Env. Cont. Tox.* 157: 53-94.
- Vollestad L.A., E. Fjeld, T. Haugen y S.A. Oxnevad. 1998. Developmental instability in gray ling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis. *Environ. Pollut.* 101: 349-354.
- Wang C. y R.P. Croll. 2004. Effects of sex steroids of gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*. 238: 483-498.

- Waxman D.J. 1999. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369(1): 11–23.
- Weber L.P., S.L. Diamond, S.M. Bandiera y D.M. Janz. 2002. Expresión de Hsp70 and CYP1A protein in ovary and liver of juvenile rainbow trout exposed to  $\beta$ -naphthoflavone. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 131: 387-394.
- Weber L.P. y D.M. Janz. 2001. Effect of *B*-naphthoflavone and dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene on apoptosis and Hsp70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquat. Toxicol.* 54: 39-50.
- Weis J.S. y P. Weis. 1994. Impacts of xenobiotics on estuarine ecosystems. In: Cockerham LG y S Shane (eds). *Basic environmental toxicology*. Boca Raton, Florida, USA. 384-408.
- West J., S. O'Neill, D. Lomax y L. Johnson. 2001. Implications for reproductive health in rockfish (*Sebastes* spp) from Puget Sound exposed to polychlorinated biphenyls. Puget Sound Research. En la web [www.psat.wa.gov/](http://www.psat.wa.gov/)
- Williams T.D., K. Gensberg, S.D. Minchin, J.K. Chipman. 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquat. Toxicol.* 65: 141- 157.
- Yáñez-Arancibia A. 1976. Observaciones sobre *Mugil curema* Valenciennes en áreas naturales de crianza, México. Alimentación, crecimiento, madurez y relaciones ecológicas. *An. Centro Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.* 3(1): 92-124.
- Zar J. H. 1999. *Biostatistical análisis*. Cuarta edición. Ed. Interactive Composition Corporation. Upper Sadole River, New Jersey. 1-663.
- Zeng X.C., S. Bhasin, X. Wu, J.G. Lee, S. Maffi, C.J. Nichols, K.J. Lee, J.P. Taylor, L.E. Greene y E. Eisenberg. 2004. Hsp70 dynamics in vivo: Effect of heat shock and protein aggregation. *J. Cell. Sci.* 117: 4991-5000.

Zikic R. V., A. S. Stajn, S. Z. Pavlovic, B. I. Ognjanovic y Z. S. Saicic. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 50: 105-111.