

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Tesis

**Para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológico
Agropecuarias en el Área de Ciencias Ambientales**

**EFEECTO DE NAFTALENO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL DE OSTIÓN (*Crassostrea corteziensis*)**

PRESENTA:

Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz

Director:

Dr. Manuel Iván Girón Pérez

Co-Director:

M en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos

Noviembre 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tepic Nayarit México, a 20 de Noviembre de 2013

Dr. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis de la estudiante de Maestría Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz, titulada "Efecto de naftaleno sobre la respuesta inmune humoral del ostión (*Crassostrea corteziensis*)", ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que la estudiante puede continuar con los trámites para solicita fecha de examen de grado.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Manuel Iván Girón Pérez

M en C. Carlos Alberto Romero Barrios

Dra. María de Lourdes Robledo Marengo

Dr. Emilio Peña Messina

Dr. Leonardo Martínez Cárdenas

Cop. ArchivoMIGP



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/375/13

Xalisco, Nayarit; 22 de noviembre de 2013

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
P r e s e n t e.

Con base al oficio de fecha 20 de noviembre de 2013, enviado por los CC. Dr. Manuel Iván Girón Pérez, M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos, Dra. María de Lourdes Robledo Marenco y Dr. Emilio Peña Messina, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la C. Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.-Expediente.

JDGP/ref.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunotoxicología de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección del Dr. Manuel Iván Girón Pérez y la Co-dirección del M.C. Carlos Alberto Romero Bañuelos. El proyecto fue financiado por el fondo FOMIX-Nayarit 2009-C02-131614.

Durante los estudios de Maestría la autora del trabajo de investigación recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario: 421519

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Manuel Iván Girón Pérez

Mi Director de tesis, por todos los conocimientos y experiencia que compartió conmigo, y por su valioso tiempo dedicado para la realización de esta tesis. Pero sobre todo gracias por su confianza y consejos.

Al M.C. Carlos Alberto Romero Bañuelos

Mi Co-Director de tesis por sus consejos y sobre todo por sus aportaciones en la finalización de esta tesis.

A mis Sinodales

Dra. María de Lourdes Robledo Marengo, Dr. Emilio Peña Messina y Dr. Leonardo Martínez Cárdenas por sus aportaciones en la finalización de este trabajo.

Dr. Armando Vega López

Y al personal del laboratorio de Toxicología Ambiental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por las facilidades que se otorgaron para la determinación de hidrocarburos.

A CONACYT

Por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Dr. Juan Diego García Paredes

Por el apoyo que siempre me brindo, pero sobre todo gracias por su confianza

Cristian Carrillo y Xavi Casillas

Por su valiosa ayuda en la realización experimental de esta tesis. Gracias..

A mis Amigas

Brenda, Paloma, Gladys, Mercedes, Dalia y Paty por todos esos momentos que pasamos juntas, por su apoyo incondicional y porque han estado conmigo siempre. Gracias.. siempre las llevare en mi corazón

Dedicatorias

A mi hijo John Alejandro por la alegría que me brindas día a día, pero sobre todo gracias por ser el motor que me impulsa a seguir adelante Te Amo...

A mis padres Bertha Alicia Resendiz Ornelas y Antonio Diaz Renteria por su apoyo incondicional en todo momento, pero sobre todo gracias por enseñarme a cumplir mis metas y lograr ser quien soy. Mami gracias por siempre impulsarme a salir adelante y Papi gracias por estar siempre conmigo cuando más te necesito. Los Amo

A mis hermanos y sobrinos por brindarme su cariño pero sobre todo gracias por confiar en mí, por sus consejos y por ayudarme a salir adelante. Los quiero

A Jonhy Barba y a Rosalina Gonzales por su apoyo, pero sobre todo gracias por su comprensión

Y a toda mi familia por el cariño entregado, por apoyarme, por creer en mí y por guiarme en todo momento. Gracias...

*Xarina Janice Guadalupe
Diaz Resendiz*

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	I
	I
INDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades y fisiología del ostión	1
1.2. Mecanismos de defensa de moluscos bivalvos	3
1.2.1. Hemocitos y Fagocitosis	3
1.2.2. Lisozima	4
1.2.3. Sistema fenoloxidasa	6
1.2.4. Óxido nítrico	8
1.3. Acuicultura de bivalvos en el mundo, México y Nayarit: Estadísticas y problemáticas	9
1.3.1. Contaminación en ecosistemas estuarinos como problema en acuicultura de bivalvos	11
1.3.2. Características fisicoquímicas de los PAHs	12
1.3.2.1. Naftaleno	13
1.4. Los PAHs como contaminantes de ecosistemas acuáticos	15
1.5. Efectos tóxicos de los PAHs	17
1.6. Efecto de los PAHs sobre sistema inmune de moluscos	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
4. HIPÓTESIS	22

5. MATERIAL Y METODOS	23
5.1. Organismos experimentales	23
5.2. Grupos experimentales	24
5.3. Determinación de naftaleno en tejido de ostión	25
5.4. Determinación de naftaleno en Agua	25
5.5. Actividad de Lisozima	25
5.6. Actividad de FO	26
5.7. Concentración de ON	27
5.8. Determinación de la concentración de proteína	27
5.9. Análisis estadístico	27
6. RESULTADOS	28
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	45
9. LITERATURA CITADA	46
10. ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Producción de ostión en México, durante el periodo 2002-2011	10
Tabla 2.	Características físico-químicas del naftaleno	14
Tabla 3.	Efectos inmunotóxicos de PAHs en moluscos	19
Tabla 4.	Concentración de naftaleno en tejido de ostión <i>C. corteziensis</i>	28
Tabla 5.	Concentración de naftaleno en tejido de ostión <i>C. corteziensis</i> expuestos a 1, 20 y 50 µg/L del hidrocarburo durante 1, 3, 5 y 7 días	29
Tabla 6.	Determinación de naftaleno en agua expuesta a 1, 20 y 50 µg/L del naftaleno durante 1, 3, 5 y 7 días	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología externa del ostión	2
Figura 2.	Morfología y anatomía interna del ostión	2
Figura 3.	Mecanismo de acción de lisozima	5
Figura 4.	Sistema fenoloxidasa	7
Figura 5.	Generación de óxido nítrico	8
Figura 6.	Estructuras química de PAHs	13
Figura 7.	Estructura química del naftaleno	14
Figura 8.	Sistema de recirculación instalado en el laboratorio	23
Figura 9.	Concentración de proteína en glándula digestiva de ostión	30

Figura 10	Concentración de proteína en hemolinfa de ostión	31
Figura 11.	Actividad de lisozima en glándula digestiva de ostiones expuestos a naftaleno y ostiones control: agua de mar y acetona	32
Figura 12.	Actividad de lisozima en glándula digestiva de ostiones expuestos a naftaleno a 1, 3 5 y 7 días	33
Figura 13.	Curva tipo de la degradación de L-DOPA	34
Figura 14.	Actividad de fenoloxidasa de ostiones expuestos a naftaleno y ostiones control: agua de mar y acetona	35
Figura 15.	Actividad de fenoloxidasa en ostiones expuestos a naftaleno a 1, 3 5 y 7 días	36
Figura 16.	Concentración de óxido nítrico de ostiones expuestos a naftaleno y ostiones control: agua de mar y acetona	37
Figura 17.	Concentración de óxido nítrico en hemolinfa de ostiones expuestos a naftaleno a 1, 3 5 y 7 días	38
Figura 18.	Efecto de naftaleno en los mecanismos de defensa de <i>C. corfeziensis</i> con respecto al tiempo	39

RESUMEN

El naftaleno es uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) más abundantes en los ecosistemas acuáticos y puede causar alteraciones en sistemas fisiológicos como el sistema inmune de organismos expuestos a este xenobiótico. El ostión de Cortéz (*Crassostrea corteziensis*) es una especie de molusco nativa del Pacífico tropical oriental, que además de su importancia ecológica, es explotado de manera comercial en la región noroccidental de México. Sin embargo, al ser los ostiones organismos sésiles y con alta tasa de filtración de agua, son blanco del efecto de contaminantes presentes en el agua, lo que puede afectar la salud de estos organismos y la productividad acuícola. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la exposición subaguda a naftaleno sobre mecanismos de la respuesta inmune humoral (concentración de óxido nítrico, actividad de fenol oxidasa y lisozima) del ostión (*C. corteziensis*). Ostiones ($n=30$) se colocaron en peceras con 5 L de agua de mar filtrada y se expusieron a naftaleno (1, 20 y 50 $\mu\text{g/L}$) por un periodo de 1, 3, 5 y 7 días. Posteriormente, se extrajo hemolinfa del músculo aductor para determinar la concentración de óxido nítrico (ON), mediante la reacción de Griess. Por otra parte en glándula digestiva se determinó la actividad de fenoloxidasa (FO) y lisozima, mediante la determinación de la oxidación de L-DOPA y el método turbidimétrico, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que el naftaleno, en las condiciones evaluadas, desreguló de manera significativa los parámetros evaluados; sin embargo no se observó un patrón (incremento/decremento) de alteración dosis o tiempo dependiente. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición subaguda de esta especie de molusco al hidrocarburo puede provocar mayor susceptibilidad a infecciones y por ende afectar la producción ostrícola.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades y fisiología del ostión.

Los ostiones son invertebrados que pertenecen al Phylum Mollusca de la clase bivalvia. Existen dos géneros de ostras *Ostrea* y *Crassostrea*, de las cuales, *Crassostrea* posee las dos conchas rugosas y es más resistente a factores como temperatura y salinidad, en comparación con el género *Ostrea* (Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1984; Cabrera *et al.*, 2008).

En general los moluscos bivalvos, son organismos de hábitos bentónicos (del griego *benthos*, "fondo marino"), de simetría bilateral provistos de una concha externa (exoesqueleto) formada por dos piezas o valvas (Figura 1) unidas por un ligamento (ligamento de la charnela), las cuales se abren y cierran por acción del músculo aductor. Además está constituido de tejido y órganos internos entre los que destacan: 1) manto, con función sensorial; 2) branquias o ctenidios, que participan en la respiración y alimentación; 3) sistema digestivo, el cual es sencillo y junto con numerosos ductos primarios y secundarios forman la glándula digestiva; 4) corazón, donde la sangre es impulsada desde el ventrículo hasta las branquias para oxigenarse y volver a las aurículas y 6) gónada, que junto con una serie de túbulos o folículos a cada lado del cuerpo constituyen el aparato reproductivo (Figura 2) (Rodríguez de la Rúa *et al.*, 2002, López y Urcuyo, 2008).

El sistema circulatorio de los ostiones es un sistema abierto, es decir la hemolinfa y los hemocitos no se encuentran sólo en el interior del corazón y vasos, sino que se encuentran en senos y tejidos (Rodríguez de la Rúa *et al.*, 2002). La alimentación de estos organismos se lleva a cabo por filtración de agua y es favorecida por secreciones mucoides del manto, cuya composición depende del tipo de partícula a transportar, este hábito alimenticio permite concentrar sólidos disueltos en agua y xenobióticos en los tejidos blandos (Parra-Laca *et al.*, 2010, Girón-Pérez y Barrón-Vibanco, 2010).



Figura 1. Morfología externa del ostión. Concha externa rugosa (exoesqueleto): la superficie externa de las valvas está constituida por la sobreposición de finas láminas dispuestas concéntricamente que dan lugar a la formación de anillos o estrias de crecimiento (Tomado de López y Uricoy, 2008)

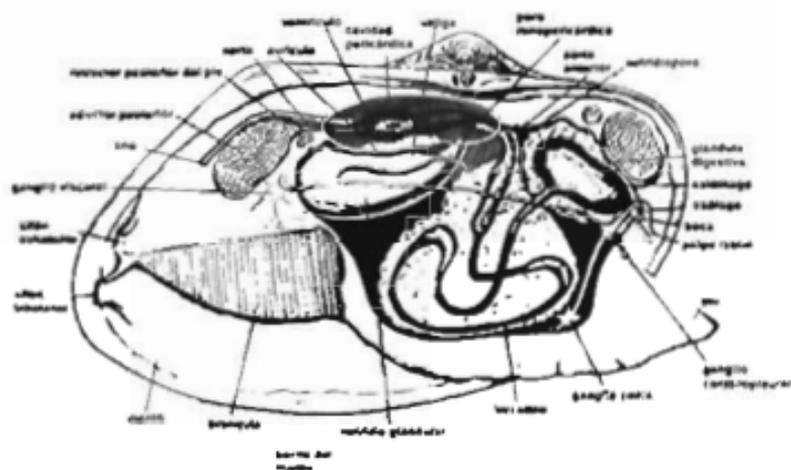


Figura 2. Morfología y anatomía interna del ostión. En la imagen se muestra la ubicación del manto, aparato digestivo y sistema circulatorio en moluscos (Tomado de López y Uricoy, 2008)

1.2. Mecanismos de defensa de moluscos bivalvos

El sistema inmune es uno de los principales sistemas fisiológicos en los organismos acuáticos, está compuesto por mecanismos celulares y humorales que los protegen contra patógenos (Vargas-Albores y Barracco, 2001; Girón-Pérez, 2010). Al igual que en vertebrados, los moluscos bivalvos presentan barreras físicas y químicas, las cuales son las primeras barreras que deben de atravesar los patógenos para acceder al interior de un organismo. En el caso de los ostiones las barreras se encuentran formadas por la concha y por el mucus, el cual a su vez posee componentes humorales (Galloway y Depledge, 2001); una vez superadas estas barreras físicas y químicas, los componentes celulares y humorales logran la eliminación o neutralización del antígeno extraño. En el ostión, los mecanismos de defensa humorales están compuestos por proteínas que se encuentran disueltas en la hemolinfa, como lectinas, lisozima, fenoloxidasas y péptidos antimicrobianos (Sauvé *et al.*, 2002); mientras que el componente de la inmunidad celular está mediado por los hemocitos, que son las células circulantes presentes en fluidos extrapaleales y en hemolinfa (Shöderhal, 2010).

1.2.1. Hemocitos y Fagocitosis

El término hemocito fue acuñado por Farley (1968) para denominar a las células sanguíneas de los moluscos bivalvos. Los hemocitos se encargan de eliminar los antígenos y partículas extrañas mediante fagocitosis a través de mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Los primeros implican la producción de metabolitos reactivos de oxígeno como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico (ON); además de compuestos intermedios con actividad bactericida como el peroxinitrito (ONOO⁻) (Cajaraville y Pal, 1995; Sauvé *et al.*, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005). Mientras que los mecanismos independientes de oxígeno incluyen a hidrolasas lisosomales (lisozima, fosfatasa, esterasa, proteinasa y glicosidasas) así como péptidos y proteínas microbicidas. Por otra

parte, los hemocitos, además de la función inmune, están implicados en otras funciones fisiológicas como: reparación de heridas y de la concha, funciones digestivas y transporte de nutrientes (Anderson, 1996; Chu, 2000; Roberts *et al.*, 2009; Shoderhal, 2010).

1.2.2. Lisozima

La lisozima (E.C.3.2.1.17) fue descubierta en 1921 por Alexander Fleming, es una enzima que hidroliza el enlace β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina (Figura 3) presente en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, con una mayor actividad microbicida contra bacterias Gram positivas (McDade y Tripp, 1967). La lisozima se almacena en el interior de los lisosomas de los hemocitos y su liberación al medio extracelular se estimula por los procesos de fagocitosis (Cheng, 1975; Mohandas *et al.*, 1985). El mecanismo de liberación de esta enzima a la hemolinfa, se lleva a cabo a través del proceso de desgranulación (Cheng, 1975; Cheng, 1983). Además de su función de defensa, la lisozima tiene funciones digestivas. En algunas especies de moluscos como *Mytilus edulis*, *Modiolus modiolus*, *Chlamys opercularis* y *Tellina tenuis*, se ha detectado una mayor concentración de esta enzima en los tejidos asociados con procesos digestivos (McHenery *et al.*, 1979). La actividad lítica de la lisozima se ha demostrado en varias especies de bivalvos, como la ostra americana, *Crassostrea virginica* (Xue *et al.*, 2004; Itoh y Takahashi, 2007; Xue *et al.*, 2007) y la ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (Matsumoto *et al.*, 2006; Itoh y Takahashi, 2007).

A la fecha, se han descrito dos tipos de lisozimas en *Crassostrea* spp. la "tipo i" (tipo invertebrado) y la "tipo g" (tipo ganso); del primer tipo se han descrito tres isoformas para *C. virginica* (Cv-iLys1, Cv-iLys2 y Cv-iLys3) y tres para *C. gigas* (Cg-iLys1, Cg-iLys2 y Cg-iLys3) las cuales difieren en su función, propiedades moleculares y bioquímicas. (Itoh y Takahashi, 2007; Xue *et al.*, 2007; Xue *et al.*,

2010); y del segundo tipo de isoforma se ha descrito solo para *C. gigas* (Itoh y Takahashi, 2009).

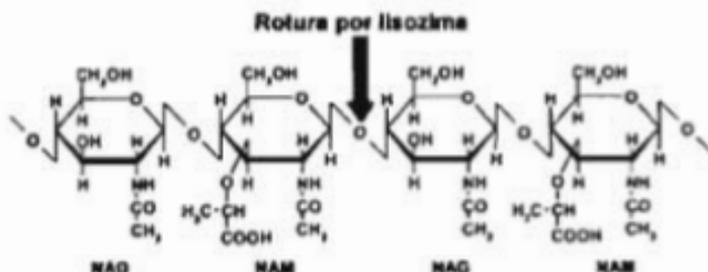


Figura 3. Mecanismo de acción de lisozima. Ruptura del enlace glicosídico β -1,4, característico de los peptidoglicanos bacterianos cuyo disacárido constitutivo es N-acetil-glucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) (Tomado de Voet-Donald *et al.*, 2007).

La función de cada isoforma "tipo i" de lisozima depende de su sitio de localización en el ostión. Por ejemplo en *Crassostrea virginica* la isoforma Cv-iLys1 se encuentra principalmente en los palpos labiales, el manto y en menor cantidad en las branquias, saco del estilete, intestino medio, glándula digestiva y gónadas; en este sentido, debido a que el epitelio de estos órganos están expuestos al ambiente y a estímulos antigénicos exógenos, se propone que la principal función de Cv-iLys1 es de defensa (Xue *et al.*, 2007). Mientras que la isoforma Cv-iLys2 se encuentra en la glándula digestiva y en menor cantidad en el estilete cristalino, además de expresarse en células basófilas de los túbulos digestivos, por lo que su función es digestiva (Xue *et al.*, 2007). Por otra parte, la lisozima Cv-iLys3 de acuerdo a sus características bioquímicas, comparte características funcionales y fisicoquímicas con la lisozima Cv-iLys1 y Cv-iLys2, por lo que, posiblemente esta isoforma tiene una función dual, tanto de defensa como en la digestión (Xue *et al.*, 2010).

En *C. gigas* también se han descrito tres tipos de isoformas de lisozima tipo i (Cg-iLys1, Cg-iLys2 y Cg-iLys3-) (Matsumoto *et al.*, 2006; Itoh y Takahashi, 2007; Itoh *et al.*, 2010). Cg-iLys2 sólo se detectó en las células del túbulos digestivos, lo que

sugiere una función digestiva (Itoh y Takahashi, 2007). Por su parte Cg-iLys1 y Cg iLys3, se encuentran en el manto y su función está implicada en la defensa y su actividad está en relación con las variaciones del ambiente (Matsumoto *et al.*, 2006; Itoh *et al.*, 2010).

1.2.3. Sistema fenoloxidasa

La fenoloxidasa (FO) es una enzima dependiente de cobre, que cataliza la reacción que convierte sustancias fenólicas (3,4-dihidroxifenilalanina o L-DOPA) a quinonas inestables (dopaquinona). Estas son sustancias que continúan su transformación por vía no enzimática hasta llegar a la melanina (Figura 4), la cual tiene actividad fungistática (Nappi y Vass, 1993). La enzima FO se presenta inicialmente de manera inactiva en forma de pro-fenoloxidasa (proFO), la cual se activa debido a estímulos como la presencia de componentes de pared celular de levaduras y bacterias (β -glucanos, lipopolisacaridos o peptidoglicanos) (Ratcliffe *et al.*, 1991). El paso precursor de proFO a la forma activa FO, requiere de una cascada de señales mediadas por serín-proteasas, para generar como producto final la melanina (Figura 4) (Söderhall y Smith, 1986). La activación de FO en invertebrados como los moluscos, se debe a una cascada de acontecimientos semejantes a los que activan a las proteínas del complemento en los vertebrados (Danilova, 2006). La existencia del sistema proFO se ha demostrado en varios tipos celulares pertenecientes a diferentes especies de moluscos, incluido *Crassostrea* spp. (Hellio *et al.*, 2007) y su principal papel se centra en los procesos de melanización y en la síntesis de adrenalina (Coles y Pipe, 1994), además la FO puede activar diferentes procesos inmunes como la fagocitosis y la encapsulación (Söderhall y Smith, 1986).

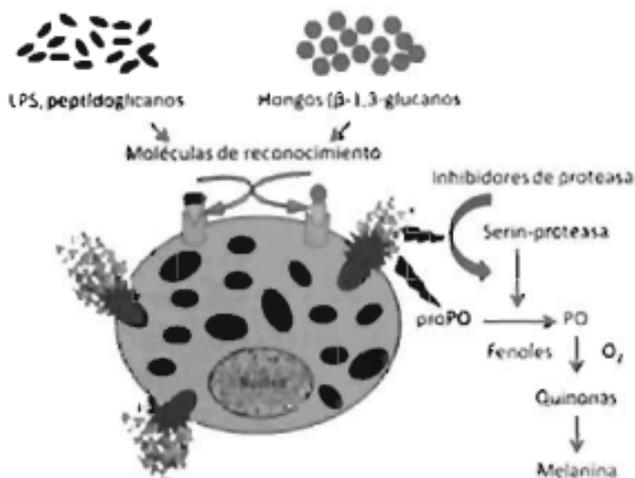


Figura 4. Sistema fenoloxidasa. Activación del sistema profenoloxidasa, desencadenada por componentes de la superficie de microorganismos (Tomado de Soderhall y Cerenius 1998)

En moluscos existen tres tipos de FO: 1) tirosinasa (EC 1.10.3.1), 2) catecolasa (EC 1.10.3.1) y 3) lacasa (EC 1.10.3.2). Los tres tipos de FOs tienen como sustrato o-difenoles, tales como L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA; actividad catecolasa). Sin embargo, entre estas tres enzimas solamente las tirosinásas pueden hidroxilar monofenoles, tales como L-tirosina (actividad monofenoloxidasa), y sólo lacasas pueden oxidar m- y p-difenoles, o compuestos aromáticos que contienen grupos amina, tales como p-fenilendiamina o PPD (actividad lacasa) (Thurston, 1994; Solomon *et al.*, 1996). En tejidos de *Crassostrea* spp., como hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquias, se han identificado sólo dos tipos de FOs, catecolasa y lacasa (Helliö *et al.*, 2007; Luna-Acosta *et al.*, 2010; Luna-Acosta *et al.*, 2011a, y Luna-Acosta *et al.*, 2011b).

1.2.4. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un mediador químico endógeno y se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), su vida media y acción biológica es muy corta, por lo que es rápidamente oxidado a metabolitos estables como el nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) (Figura 5) (Gorocica *et al.*, 1999). En moluscos como *Crassostrea* spp. el ON es producido por los hemocitos, en respuesta a estímulos antigénicos (Arunugan *et al.*, 2000; Villamil *et al.* 2007). No obstante, los mecanismos moleculares que regulan la producción de ON en estas células es poco conocido (Nakayama y Maruyama, 1998; Torreilles y Romestand, 2001). El ON tiene numerosas funciones, entre ellas la regulación del tono vascular, la señalización celular y la eliminación de patógenos en respuesta inmune inespecífica (Moncada *et al.*, 1991; Sánchez Hernández, 2003); además de actuar como una molécula altamente citotóxica y microbicida (MacMicking *et al.*, 1997; Rivero, 2006). Debido a su naturaleza no polar, el ON puede atravesar fácilmente las membranas de patógenos, lo que provoca daño al DNA, proteínas, lípidos y enzimas. El ON también reacciona con el anión superóxido (O_2^-), generado durante el estallido respiratorio, para producir peroxinitro (ONOO^-), un compuesto con mayor toxicidad y con actividad antibacteriana y antiviral (Fang, 2004).

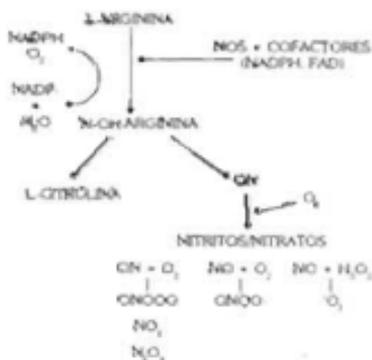


Figura 5. Generación de óxido nítrico. Participación de la enzima óxido nítrico sintetasa y la formación de sus metabolitos estables, nitritos y nitratos (Tomado de Gorocica *et al.*, 1999).

1.3. Acuicultura de bivalvos en el mundo, México y Nayarit: Estadísticas y problemáticas

El término acuicultura se refiere al cultivo de organismos acuáticos: peces, reptiles, anfibios, crustáceos, moluscos, plantas y algas para la producción de alimento o algún otro propósito por parte del humano (FAO, 2010). En el año 2010, la producción mundial de organismos a través de la acuicultura, estuvo conformada por peces de agua dulce (56.4%), moluscos (23.6%), crustáceos (9.6%), peces diádomos (6.0%), peces marinos (3.1%) y otros animales acuáticos (1.4%). Producción que representó ganancias estimadas en 119,400 millones de dólares americanos (FAO, 2010).

En el marco de la acuicultura mundial, el cultivo de moluscos es la segunda actividad en importancia con una producción de 14.2 millones de ton/año (FAO, 2010), de los cuales 4.5 millones ton/año corresponden a ostras (FAO, 2010). Particularmente en México se producen cerca de 50,000 ton/año de este tipo de moluscos (CONAPESCA, 2013) y de acuerdo al Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2011) de México, de la producción pesquera nacional el 91% del ostión es generado a través de la ostricultura (CONAPESCA, 2011). En este contexto, el ostión del Pacífico (*C. gigas*) es una de las principales especies. Sin embargo, otras especies que destacan en nuestro país son: ostión americano (*C. virginica*), cultivado principalmente en el Golfo de México y el ostión de Cortéz (*C. corteziensis*) cultivado en el Pacífico (Polanco, 2002).

En México, dentro de las actividades pesqueras y acuícolas la producción de ostión ocupa el sexto lugar siendo Veracruz el estado con mayor producción de este molusco (27,298 ton/año), seguido de Tabasco (12,998 ton/año) y Nayarit (2,071 ton/año). En el Pacífico mexicano la principal especie que se explota es el ostión Cortéz (*Crassostrea corteziensis*) con una producción aproximada de 1,500 ton/año. De esta manera, el estado de Nayarit, ocupa el primer lugar de

producción de ostión en esta zona (Tabla 1), con una derrama económica aproximada de \$ 18.5 millones de pesos (CONAPESCA, 2011).

Tabla 1. Producción de ostión en México, durante el periodo 2002-2011

SERIE HISTÓRICA DE LA PRODUCCIÓN DE OSTIÓN PESO VIVO EN TONELADAS 2002-2011										
ENTIDAD	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
TOTAL	51,328	50,218	48,293	46,108	45,762	50,204	45,432	42,259	50,710	46,831
VERACRUZ	24,877	24,451	21,853	24,382	21,385	24,108	21,758	19,942	26,328	27,268
TABASCO	20,814	20,789	21,456	18,391	19,800	20,053	17,173	16,171	18,908	12,998
NAYARIT	1,259	763	4	907	605	1,120	1,423	1,418	1,085	2,071
TAMALULPAS	1,251	1,031	789	640	2,047	1,154	1,214	1,885	1,865	1,478
BAJA CALIFORNIA	306	810	878	968	719	932	1,077	1,005	1,633	1,157
BAJA CALIFORNIA SUR	600	488	817	583	591	737	812	638	816	573
GUERRERO	125	238	-	184	183	149	233	290	417	482
CAMPECHE	1,160	1,009	560	971	687	544	325	317	479	349
OAXACA	122	51	1,270	91	60	138	104	115	94	182
OTRAS*	909	744	585	410	589	1,241	532	488	1,085	282

Tomada del Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2011.

El ostión *C. corteziensis* es una especie nativa que se distribuye desde el Golfo de California hasta Panamá, siendo muy abundante, desde Sonora hasta Nayarit (Mazón-Suastegui, 1996). Esta especie tiene una posición importante en el mercado regional y nacional por su alto valor nutricional, excelente sabor y por ser una fuente de empleo, además de tener un gran potencial para la acuicultura debido a su rápido crecimiento y aceptación (Cáceres-Puig *et al.*, 2007).

No obstante al éxito de la ostricultura, en la actualidad esta actividad se ha visto limitada por problemas diversos en los sitios de cultivo, con un impacto negativo y sustancial en la producción de este molusco. Entre los principales problemas se encuentran: 1) producción inconsistente de semilla (calidad y cantidad), 2) enfermedades emergentes provocadas por microorganismos, como OsHV-1 y *Perkinsus marinus* (Vázquez-Juárez, 2006; Cáceres-Martínez, 2008; Enríquez-Espinoza, *et al.*, 2010), 3) variación sustancial en factores ambientales de los sitios de cultivo (temperatura, salinidad, oxígeno, concentración de clorofila o séston) (Mazón-Suastegui *et al.*, 2009; Chávez-Villaiba *et al.*, 2010) y 4) mareas rojas y contaminantes, como metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos (FAO, 2012)

En particular, el problema de la contaminación ha recibido especial atención debido a que puede provocar efectos sobre las funciones metabólicas y mecanismos de detoxificación, causando mortandad masiva de estos organismos. Además, la exposición crónica a contaminantes puede alterar los mecanismos de defensa del ostión, haciéndolo más vulnerable a infecciones por parásitos y bacterias (Gómez-Mandikute y Cajaraville, 2003; Gagnaire *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2009; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; FAO, 2012).

1.3.1. Contaminación en ecosistemas estuarinos como problema en acuicultura de bivalvos

Los ecosistemas estuarinos son sistemas fluvio-marinos sometidos a la influencia de las mareas, caracterizados por procesos de ingreso y mezcla de agua marina con aportes de agua continental, corrientes que son variables en el espacio y en el tiempo (Ibañez *et al.*, 2009). Estos ecosistemas son el receptáculo final de contaminantes de origen antropogénico, lo que implica consecuencias ecológicas (Gagnaire *et al.*, 2006), ya que no sólo ponen en peligro a las especies que habitan esa zona, sino también a la producción pesquera y por lo tanto la economía (Páez-Osuna, 1999; Boonyatumanond *et al.* 2006).

En los ecosistemas estuarinos se presentan cambios atribuibles a la contaminación de aguas con materia orgánica y productos químicos, debido a la acción humana y por ciclos naturales del ambiente (Morales-Bojórquez, 2009). En cuanto al efecto de las actividades humanas, los ecosistemas acuáticos tradicionalmente han sido el vehículo y depósito final de un sinnúmero de contaminantes (microorganismos, metales, plaguicidas e hidrocarburos) que ingresan por diferentes vías, tales como: efluentes domésticos e industriales, aportes de agua de lluvia y de riego agrícola, o como resultado de derrames accidentales (Girón-Pérez y Barrón-Vibanco, 2010).

Uno de los principales contaminantes de ecosistemas estuarinos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) que son moléculas moderadamente estables, cuya presencia ha sido atribuida principalmente a derrames de combustibles fósiles. No obstante, los desechos municipales e industriales son también fuentes de aporte de estos contaminantes (Douben, 2003). Los PAHs pueden causar efectos en la morbilidad y mortalidad de especies acuáticas con importancia económica, por lo que el estudio de estos contaminantes debe ser atendido. En este contexto, los bivalvos marinos como los ostiones son frecuentemente blanco de este tipo de sustancias, debido a que son organismos sedentarios, están ampliamente distribuidos y poseen alta tasa de filtración. Estos factores favorecen la captación y bioacumulación de los PAHs (Girón-Pérez y Barrón-Vibanco, 2010; Campa-Córdova *et al.*, 2011); lo que compromete el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de estos organismos (Gagnaire *et al.*, 2007).

1.3.2. Características fisicoquímicas de los PAHs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos formados por dos o más anillos aromáticos fusionados entre sí, constituidos por átomos de carbono e hidrógeno (Figura 6) (Douben, 2003; Mastandrea *et al.*, 2005). En general los PAHs tienen baja solubilidad en agua, son poco volátiles, altamente lipofílicos y se ha establecido que en organismos acuáticos como peces y crustáceos el factor de bioconcentración de estos compuestos es proporcional a su peso molecular (ATSDR, 1995; Douben, 2003).

Los PAHs se forman principalmente durante la combustión incompleta del carbón, petróleo, gas, madera, basura o cualquier otra sustancia que contenga alguna cantidad de materia orgánica. Pueden encontrarse en el asfalto utilizado en la construcción de caminos, en sustancias como aceite crudo, carbón y alquitrán de

carbón entre otros. Usualmente están presentes casi en cualquier sustrato de la naturaleza, incluido el agua costera (ATSDR, 1995)

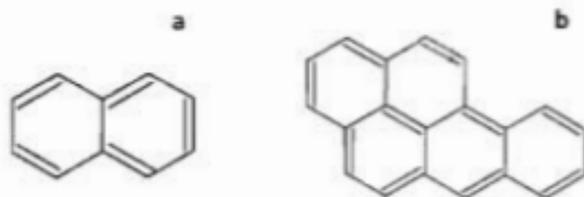


Figura 6. Estructuras químicas de PAHs: a) Naftaleno, el PAHs con estructura más sencilla formado por dos anillos bencénicos y b) Benzo[a]pireno, formado por cinco anillos bencénicos (Tomado de ATSDR, 1995).

En ecosistemas acuáticos, uno de los PAHs más abundante es el naftaleno, el cual está presente en las fracciones solubles de los aceites petrogénicos (Hansen *et al.*, 2007), la cual constituye una de las fracciones más tóxicas del petróleo para la vida marina (Vijayavel *et al.*, 2004).

1.3.2.1. Naftaleno

El naftaleno, también llamado naftalina es el hidrocarburo aromático policíclico más sencillo, su estructura química está compuesta de dos anillos bencénicos unidos entre sí (Figura 7). Es un sólido blanco que se evapora fácilmente, es poco soluble en agua y se produce naturalmente cuando se queman combustibles, tabaco o madera (Medina *et al.*, 2006). Además, junto con sus derivados metilados (metilnaftalenos), el naftaleno es uno de los PAHs más dominantes en los combustibles y petróleo crudo (Iniesa y Blanco, 2005). De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EE.UU, el naftaleno es identificado como uno de los 16 PAHs más importantes por su toxicidad para mamíferos y organismos acuáticos (EPA 1987).

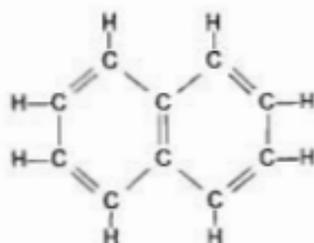


Figura 7. Estructura química del naftaleno (Tomado de Medina et al., 2006)

En agua, el naftaleno comparado con otros PAHs, es más soluble ($\log Kow < 5$) y se encuentra en mayor biodisponibilidad para los organismos acuáticos (Iniesa y Blanco, 2005). En bivalvos, el naftaleno se incorporan preferentemente en forma disuelta, debido a sus características fisicoquímicas (Tabla 2) (Meador, 2003).

Tabla 2. Características físico-químicas del Naftaleno

Características	Naftaleno	
Sinónimo	Alquitrán de alcanfor, naftaleno, bolas de naftalina, mothflakes, alquitrán blanco, y otros	
Peso molecular	128.19	
Formula química	$C_{10}H_8$	
Color	Blanco	
Estado físico	Sólido	
Punto de fusión	80.5°C	
Punto de ebullición	218°C	
Densidad	1.145 g/mL a 20°C	
Olor	Fuerte (alquitrán o bolas de naftalina)	
Solubilidad en agua	31.7 mg/L	
Solubilidad en solventes orgánicos	Soluble en benceno, alcohol, éter y acetona	
Coeficiente de partición	Log Kow	3.29
	Log Koc	2.97
Presión de vapor	0.087 mmHg	
Constante de Henry	$4.6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$	

Tomado de: ATSDR, 1995

El naftaleno tiene una distribución diferenciada entre los tejidos de bivalvos, de esta manera se ha reportado que en glándula digestiva se acumula el 35%, en manto 12%, en branquias 10% y en riñón 5%; mientras que en el resto de los tejidos se ha detectado, en conjunto, un porcentaje cercano al 40% de este

hidrocarburo. El patrón de distribución de este xenobiótico está asociado al contenido lipídico de cada tejido, ya que la glándula digestiva y manto tienen aproximadamente un 6% más lípidos que el resto de los tejidos de los bivalvos (Widdows *et al.*, 1983).

La eliminación del naftaleno en bivalvos tiene lugar en pocos días y se debe principalmente a dos procesos: difusión pasiva y excreción. Los tiempos de vida media para el naftaleno y metilnaftaleno están en función de la K_{ow} (3.3), y oscilan entre las 5 horas y 1 día respectivamente (Farrington *et al.*, 1982; Widdows *et al.*, 1983; Bjork y Gilek, 1996).

1.4. Los PAHs como contaminantes de ecosistemas acuáticos

La presencia de PAHs en sistemas acuáticos se ha atribuido principalmente a fenómenos como: 1) derrames procedentes del transporte marítimo, 2) residuos urbanos, 3) combustión incompleta de combustibles fósiles y 4) deposición atmosférica (Perugini *et al.*, 2007). Una vez en los ecosistemas acuáticos, los PAHs pueden entrar a los organismos marinos a través de la cadena alimentaria (Jonsson *et al.*, 2004), ya que son compuestos de baja solubilidad y tienden a adsorberse a los materiales en suspensión en el agua, los cuales pueden llegar a depositarse en los sedimentos. Además debido a su lipofiliidad, son compuestos que atraviesan con facilidad las membranas lipídicas acumulándose en los organismos acuáticos (Billard *et al.*, 2002).

Existen estudios que muestran la presencia de PAHs en diversos ecosistemas acuáticos, donde las concentraciones de estos contaminantes pueden variar considerablemente dependiendo de la cercanía de las fuentes emisoras. Las concentraciones más altas de PAHs se han encontrado en zonas costeras, como resultado de entrada de aguas terrestres y transporte marítimo (UNEP, 2003). De esta manera, datos reportados por el Programa Ambiental de las Naciones Unidas

(UNEP), indican que en muestras de agua tomadas en diferentes puntos del Océano Atlántico, se han detectado concentraciones de PAHs desde 0.001 a 0.3 ng/L; mientras que en muestras de agua de zonas costeras y estuarios influenciados por este océano, las concentraciones de PAHs totales en esta matriz ambiental, varían desde niveles no detectables hasta 8,500 ng/L. Por otra parte, en agua del mar Egeo, Jónico y Mediterráneo occidental, se han detectado estos contaminantes en concentraciones de 10 a 30 ng/L, 0.02 a 40 µg/L y 200 a 750 ng/L, respectivamente. Por su parte, en agua de las regiones ártica de Rusia y Asia Oriental, se han reportado concentraciones de 10 a 69 y 25.9 a 10, 197 ng/L, respectivamente (UNEP, 2003).

En lo que respecta a la presencia de PAHs en sedimentos marinos y estuarinos, estos compuestos se han detectado en concentraciones relativamente altas, comparadas con otras sustancias tóxicas persistentes (plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados y dioxinas). En muestras de sedimentos tomadas al sur del Mar Báltico, las concentraciones de PAHs han sido hasta de 35.2 µg/kg en peso seco. Mientras que en el este del Golfo de Finlandia y norte del Golfo de Botnia, se han detectado concentraciones de 17.0 y 20.9 µg/kg, respectivamente. Reportes realizados a partir de muestreos en el Golfo Pérsico, han mostrado la presencia de estos contaminantes en Kuwait (30.4 µg/kg), Arabia Saudita (36.4 a 761 µg/kg), Bahrein (47.5 a 97.5 µg/kg), Emiratos Árabes Unidos (10.9 a 21.8 µg/kg) y Omán (4.5 a 36.5 µg/kg). Por otra parte, en sedimentos tomados en la zona costera de este golfo, influenciada por efluentes industriales, se han reportado concentraciones de hidrocarburos, desde 5.6 hasta 1,334 µg/kg de peso seco (UNEP, 2003).

En América, la mayoría de los reportes corresponden a estudios realizados en sedimentos cercanos a puertos marítimos. Los resultados han mostrado una amplia variabilidad en la concentración de PAHs, desde 0.1 a 286,000 µg/kg. Las áreas más afectadas corresponden a zonas portuarias con influencia de ríos (Paraná, Uruguay y Río de la Plata) (UNEP, 2003). Sin embargo, recientemente

Ramdine *et al.* (2012), reportaron la presencia de hidrocarburos en una isla del mar Caribe (Isla Guadalupe), donde encontraron altas concentraciones de estos contaminantes en sedimento (40-1,065 ng/g) y en tejido de ostión (66-961 ng/g).

En México, también se han encontrado este tipo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, tal como lo muestran Botello *et al.* (2002), al encontrar niveles de hidrocarburos en moluscos recolectados de diferentes sitios en la costa norte del Océano Pacífico mexicano y reportaron en la ostra *C. palmula* (22.86 µg/g) en la bahía de Pichilingue en Baja California Sur; en mejillón *Mytella strigata* (18.16 µg/g) en la laguna de Mexcaltitán, Nayarit; en la ostra *C. corteziensis* (13.19 µg/g) en Ohuira Sinaloa; y en la ostra *C. iridescens* (10.24 µg/g) en Puerto Vallarta, Jalisco. Recientemente otro estudio realizado por Girón-Pérez *et al.*, (2013), demostró la presencia de PAHs en agua del estero Boca de Camichín Nayarit, en concentraciones significativamente altas de naftaleno (409 ± 208 ug/L), seguido de pireno (25.5 ± 13.6 ug/L) y el benzo[a]pireno (1.13 ± 0.3 ug/L), lo anterior demuestra que los ecosistemas acuáticos de México, al igual que el resto del mundo, no están exentos de esta clase de contaminantes, lo que pone en peligro a las especies que habitan estas zonas.

1.5. Efectos tóxicos de los PAHs

Los contaminantes químicos en el medio marino tienen efectos negativos, en mayor o menor medida, en función de las concentraciones existentes en el medio, y éstos pueden ser desde daños para la biota marina, hasta daños para el consumidor (Soriano-Sanz, 2009).

Aunque la toxicidad aguda de muchos PAHs en animales de experimentación suele ser baja, por sus efectos tóxicos a mediano y largo plazo, los niveles de estos compuestos son habitualmente objeto de estudio en el ambiente marino. Las diferentes propiedades físico-químicas (solubilidad, toxicidad y comportamiento en

el ambiente acuático) están en función de su peso molecular. Los PAHs de bajo peso molecular (de dos a tres anillos aromáticos) son en general moderadamente tóxicos, aunque pueden serlo directamente para los organismos marinos. Por otro lado, muchos PAHs de elevado peso molecular (que contienen cuatro o más anillos aromáticos) son mutagénicos y teratogénicos, además los metabolitos de estos PAHs son potenciales carcinógenos para los animales y humanos, como es el caso del benzo[a]pireno (Soriano-Sanz, 2009).

1.6. Efecto de los PAHs sobre sistema inmune de moluscos

Uno de los sistemas fisiológicos de moluscos más alterados por los PAHs, es el inmune. El cual contribuye a la homeostasis mediante la eliminación de partículas extrañas (virus, bacterias o parásitos), destrucción de células anormales y rechazo de componentes abióticos extraños (Girón-Pérez, 2010). Los PAHs pueden interactuar con los componentes del sistema inmune e interferir con las funciones de protección, lo cual podría inducir inmunosupresión o estimulación, así como la disminución de la resistencia a enfermedades (Tabla 3).

Existen estudios en donde diversos moluscos tales como, *C. gigas*, *Mytilus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Cerastoderma edule*, *Ensis siliqua*, *Pecten maximus*, *Haliotis diversicolor* y *C. virginica* expuestos a PAHs, sufren una desregulación en los parámetros inmunes, por ejemplo el benzo[a]pireno, induce incremento en el porcentaje de granulocitos, concentración de óxido nítrico (ON), y producción de anión superóxido, pero disminuye la mortalidad celular, el número total de hemocitos, actividad fagocítica, estabilidad membranal y capacidad de adhesión, además de la actividad de lisozima (Gómez-Mandikute y Cajaraville, 2003; Gagnaire *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2009; Gopalakrishnan *et al.*, 2011; Croxton *et al.*, 2012).

Al igual que el benzo[a]pireno, el fluoreno y el pireno también disminuyen la mortalidad de hemocitos y la actividad fagocítica; en cambio, el fenantreno incrementa la mortalidad y el número de hemocitos, pero disminuye la actividad fagocítica y la estabilidad membranal, además de la generación de superóxido (Wootton *et al.*, 2003; Gagnaire *et al.*, 2006; Bado-Nilles *et al.*, 2008; Hannam *et al.*, 2010.) Por otra parte el benzo[b]fluoranteno incrementa la actividad de fenoloxidasa (Bado-Nilles *et al.*, 2008).

Tabla 3. Efectos inmunotóxicos de PAHs en moluscos.

PAHs	[]	Tiempo de exposición	Efecto	Especie	Referencia
Benzo[a]pireno, y fenantreno	200 nmoil	7 días	% de granulocitos ↑ Mortalidad celular y enzimas lisosomales ↓	<i>Crassostrea gigas</i>	Gagnaire <i>et al.</i> , 2006
	300 nmoil	7 días			
Benzo[a]pireno	200 nmoil	7 días	Producción de anión superóxido ↓ Actividad de lisozima ↓	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Gómez-Mandute y Cajaraville, 2003
Benzo[a]pireno	0.5 mg/L	7 días y 12 días	Actividad fagocítica ↓ Capacidad de adhesión ↓	<i>Chamelea gallina</i>	Malozzo <i>et al.</i> , 2009
fenantreno	400 mg/L	14 días	Mortalidad de hemocitos ↓	<i>Cerastoderma edule</i>	Wootton <i>et al.</i> , 2003
	100 y 200 µg/L	14 días	Células fagocíticas ↓ Generación de superóxido ↓		
	400 mg/L	7 días	Mortalidad de hemocitos ↑		
Fenantreno	100 y 200 mg/L	7 días	Número de hemocitos ↓	<i>Pecten maximus</i>	Hannam <i>et al.</i> , 2010
	200 mg/L	7 días	Estabilidad de la membrana celular ↓ Actividad fagocítica ↓		
fluoreno y pireno	10 ² mg/ml	24 h	Mortalidad de hemocitos ↓ Actividad fagocítica ↓	<i>Crassostrea gigas</i>	Bado-Nilles <i>et al.</i> , 2008
benzo[b]fluoranteno	10 ³ y 10 ⁴ mg/ml	24 h	Actividad PO ↑		

Benzo[a]pireno	0.05 mg/L BaP	0, 1, 3, 7, días	↓ Conteo total de hemocitos ↓ Actividad fagocítica ↑ NO a 14 y 21 días ↓ estabilidad de la membrana lisosomal ↓ Actividad de lisozima	<i>Halofis diversicolor</i>	Gopalakrishnan et al., 2011
Benzo[a]pireno	0.1 y 1.0 µg/L	3 días	↓ % de hemocitos granulares	<i>Crassostrea virginica</i>	Crofton et al., 2012

Simbolos: ↓ decremento; ↑ incremento

Los reportes referidos en la tabla anterior, muestran que los PAHs tienen efectos variables sobre la respuesta inmune en bivalvos. Sin embargo no existen estudios en la especie *C. corteziensis*, donde se evaluó el potencial inmunotóxico de estas sustancias.

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, los moluscos representan el segundo lugar de la producción de organismos a través de la acuicultura, actividad que puede ser afectada por la presencia de contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos.

La presencia de PAHs en ecosistemas acuáticos ha incrementado en los últimos años; uno de los hidrocarburos frecuentemente detectado en estos sistemas es el naftaleno. Esta sustancia puede provocar alteraciones en los mecanismos de defensa de moluscos bivalvos, como los ostiones y puede incrementar la susceptibilidad a infecciones, morbilidad y mortalidad de estos organismos.

El ostión *C. corteziensis* es una especie nativa del Pacífico mexicano con importancia económica. Sin embargo en la literatura científica no existen estudios donde se evalué el potencial inmunotóxico de naftaleno sobre esta especie. Por lo que es necesario realizar investigaciones que coadyuven a conocer el efecto potencial de este hidrocarburo sobre la salud y mecanismos de defensa de esta especie de molusco.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición subaguda a naftaleno sobre mecanismos humorales de la respuesta inmune del ostión *Crassostrea corteziensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la concentración de naftaleno en muestras de tejido de ostión y agua, previo y posterior a los bioensayos.
- Determinar el efecto de la exposición subaguda a concentraciones subletales de naftaleno sobre la concentración de proteína y óxido nítrico en hemolinfa de ostión (*C. corteziensis*).
- Determinar la concentración de proteína y el efecto sobre la actividad de fenol oxidasa y lisozima presentes en glándula digestiva de ostión (*C. corteziensis*), expuesto de manera subaguda a concentraciones subletales de naftaleno.

4. HIPÓTESIS

La exposición subaguda del ostión (*Crassostrea corteziensis*) a concentraciones subletales de naftaleno afecta negativamente la respuesta inmune de este molusco.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Organismos experimentales

Ostiones *C. corteziensis* con talla de 8 ± 2 cm y peso 70 ± 30 g, adquiridos en un mercado local del estado de Nayarit México, fueron depurados por un periodo de 30 días en agua de mar filtrada (salinidad 26 ± 2 ‰, pH 8.7 ± 0.2 , temperatura $25-28$ °C y ciclos de luz 12/12) en un sistema de recirculación (50 L) con un caudal de retorno de 150 mL/min y aireación constante (Figura 8). Los ostiones fueron alimentados diariamente con 8.55 mg/L de alga spirulina deshidratada disuelta en agua de mar filtrada (Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1984).



Figura 8. Sistema de recirculación: con llaves de paso para salida de agua colocadas en una bomba sumergible con un caudal de retorno de 150 mL/min y aireación constante, cada sistema posee filtros para la retención de partículas. Los sistemas constan de tres tanques de 11.7 l, cada uno.

5.2. Grupos experimentales

Pasado el periodo de depuración, los ostiones ($n=10$) se colocaron en peceras con 5 L de agua de mar filtrada (salinidad 26 ± 2 ‰, pH 8.7 ± 0.2 , temperatura $25-28$ °C y ciclos de luz 12:12) durante un periodo de 24 h (sin alimento) para su aclimatación, posteriormente los organismos se expusieron a concentraciones subletales de naftaleno (1, 20 y 50 $\mu\text{g/L}$). El naftaleno (Sigma-Aldrich, 99%) fue tomado a partir de una solución stock (0.5 g/L), mediante la utilización de acetona como disolvente en una proporción 1:2 (hidrocarburo:acetona). Las condiciones experimentales (mantenimiento de los organismos y concentraciones del hidrocarburo), fueron determinadas con base a las fluctuación de parámetros fisicoquímicos de zonas estuarinas del Pacífico mexicano y estudios previos en esta zona (Girón-Pérez, 2009; Castillo-Duran *et al.*, 2010; Toledo-Ibarra, 2012; Zambrano-Soria, 2012; Girón-Pérez *et al.*, 2013).

Para cada experimento se utilizaron tres grupos experimentales ($n=30$) por tratamiento. Grupo experimental I: ostiones en agua de mar; grupo experimental II: ostiones en agua de mar con acetona; y grupo experimental III: ostiones en agua de mar con naftaleno. Los ostiones se expusieron al hidrocarburo durante 1, 3, 5 y 7 días, con recambios diarios de agua para cada pecera. Durante el experimento los ostiones se alimentaron diariamente con alga *spirulina*.

Transcurrido el tiempo del bioensayo se extrajo la glándula digestiva de cada organismo y se determinó la actividad de lisozima, fenol oxidasa (FO) y concentración de proteína. Por otra parte, se obtuvo hemolinfa del músculo aductor y se determinó la concentración de proteína y óxido nítrico (ON).

5.3. Determinación de naftaleno en tejido de ostión

Previo a la determinación de naftaleno en tejido de ostión, la glándula digestiva y branquias de cada ostión fueron pesadas y homogeneizadas con 1 mL de diclorometano; cada homogeneizado se agitó en vortex por 5 min y se centrifugó a 3500 rpm/15 min. El sobrenadante de cada muestra se colectó en un frasco de vidrio ámbar, los cuales se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración hasta que el diclorometano se evaporó. La muestra se reconstituyó con 1 mL de metanol, posteriormente una alícuota de la muestra se colocó en una placa de 96-pozos y se leyó mediante espectroscopia de fluorescencia a una longitud de excitación y emisión de 273 y 360 nm, respectivamente (Livingstone *et al.*, 1993).

5.4. Determinación de naftaleno en Agua

En un embudo de separación se colocaron 50 mL de agua junto con 5 mL de diclorometano, posteriormente la mezcla se agitó y se dejó reposar hasta que se separaron las fases. La fase que contenía el disolvente se recolectó en frascos ámbar, los cuales se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración hasta evaporación del diclorometano. La muestra se reconstituyó con 1 mL de metanol, posteriormente una alícuota de la muestra se colocó en una placa de 96-pozos y se leyó a una longitud de excitación y emisión de 273 y 360 nm, respectivamente, por espectroscopia de fluorescencia (Livingstone *et al.*, 1993).

5.5. Actividad de Lisozima

Para determinar la actividad de lisozima, se utilizó el método turbidimétrico descrito por Demers y Bayne (1997). Previo a la determinación de la actividad de lisozima en glándula digestiva, se realizó una curva estándar de lisozima de huevo de gallina (HEL) de 41.800 U/g (Anexo 1a). Para esto, se preparó una solución

stock de HEL a una concentración de 0.5 g/mL en buffer KH_2PO_4 100 mM, pH 5.9. A partir de la cual se hicieron diluciones seriadas, con una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* al 0.15% en buffer PBS 0.1 M, pH 5.9. Inmediatamente (tiempo 0), se determinó la densidad óptica (OD) de cada muestra a 450 nm; después de 15 min (tiempo 15) se determinó nuevamente la OD y posteriormente, se calculó el cambio de absorbancia (Abs T0 - Abs T15).

Previo a la determinación de la actividad de lisozima, la glándula digestiva se homogeneizó en buffer al 20% (p/v) de KH_2PO_4 100 mM, pH 5.9. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm/10 min a 25 °C. Posteriormente, en una placa de poliestireno de 96-pozos, se colocaron 25 μL del sobrenadante y se mezclaron con 175 μL de *Micrococcus lysodeikticus* al 0.15%. La OD de la mezcla se determinó inmediatamente (tiempo 0) y a los 15 min y el cambio de absorbancia se interpoló en una curva realizada *ex professo*.

5.6. Actividad de FO

Previo a la determinación de la actividad de FO, la glándula digestiva se homogeneizó en 1 mL de PBS 0.1 M, pH 7.4. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm/15 min a 25 °C y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Un volumen de 100 μL (6 mg/mL de proteína), se colocó en una placa de poliestireno de 96-pozos y se mezcló con 100 μL de L-DOPA (4mg/mL de L-dihidroxifenilalanina) como sustrato, para así determinar la actividad de FO. La densidad óptica de la mezcla se determinó a 450 nm, inmediatamente (tiempo 0) y después de 5 h. A partir de la diferencia en la OD se calculó la actividad de FO, la cual se corrigió con la concentración de proteína de la muestra. Para determinar la degradación máxima de L-DOPA en glándula digestiva de ostión, se realizó una curva de oxidación de L-DOPA con respecto al tiempo. La oxidación espontánea del sustrato se restó en cada muestra analizada (Bado-Nilles *et al.*, 2008).

5.7. Concentración de ON

La concentración de óxido nítrico fue evaluada mediante la reacción de Griess, la cual cuantifica nitritos (NO_2^-) presentes en la hemolinfa. 50 μL de hemolinfa se mezclaron con 50 μL de sulfanilamida al 1% y 50 μL de N-(1-naftil) etilenediamina 0.1%. La mezcla se incubó por 10 min a temperatura ambiente en una placa de 96-pozos. La absorbancia de las muestras fue medida a 545 nm en un lector de placas. La concentración molar de nitritos de cada muestra se determinó mediante una curva de referencia estándar de NaNO_2 (10-100 mM) (Anexo 1b) y como blanco se utilizó PBS junto con sulfanilamida y N-(1-naftil) etilenediamina (Tafalla *et al.*, 2002). La concentración de nitritos se corrigió por proteína, realizada por el método de Bradford (1976).

5.8. Determinación de la concentración de proteína

La concentración total de proteínas se midió a través del método de Bradford (1976). La muestra (50 μL) se adicionó en una placa de 96-pozos junto con 250 μL de reactivo de Bradford. La placa se incubó a temperatura ambiente por 10 min y la absorbancia se determinó a 545 nm en un lector de placas. Una concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) (0.25-5.0 mg/mL) se utilizó para realizar una curva de referencia estándar (Anexo 1c).

5.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Sigma Stat 3.5. Se determinó la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos (prueba Kolmogorov-Smirnov y F de Levene). Para datos con distribución normal, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la subprueba de Bonferroni. Para datos no paramétricos se usó la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación múltiple tipo-Tukey. La diferencia estadística se determinó con nivel de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Previo a la determinación de los parámetros inmunológicos evaluados en el presente estudio, se realizó la determinación de naftaleno en tejido de ostión, mediante espectrofluorometría. La determinación de naftaleno se realizó en branquias y glándula digestiva de ostiones recién comprados en un mercado local (no depurados) y en organismos mantenidos en agua de mar filtrada en el sistema de recirculación por un periodo de 30 días (depurados). Los resultados mostraron que las branquias de ostiones no depurados presentaron una concentración de $0.733 \pm 0.657 \mu\text{g/g}$ de naftaleno, en contraste a los organismos depurados donde no se detectó el hidrocarburo (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de naftaleno en tejido de ostión *C. corteziensis* (n=5)

<i>C. corteziensis</i>	Concentración de Naftaleno ($\mu\text{g/g}$)	
	No depurados	Depurados
Branquia	0.733 ± 0.657	ND
Glándula digestiva	ND	ND

Los datos son representados como la $X \pm \text{DE}$. ND: no detectable

La Tabla 5 muestra que en organismos expuestos a $1 \mu\text{g/L}$ de naftaleno, sólo se detectó el hidrocarburo en branquia después de 1 día de exposición, mientras que en glándula digestiva fue después de 1 y 7 días. Por otra parte, ostiones expuestos a $20 \mu\text{g/L}$ de naftaleno mostraron que en branquia se detectó el hidrocarburo después de 1 y 3 días post-exposición, mientras que en glándula digestiva después de 3, 5 y 7 días. Además, en organismos expuestos a $50 \mu\text{g/L}$, el naftaleno se detectó en branquia después de 1, 3 y 7 días, mientras que en glándula digestiva sólo después de 7 días.

Tabla 5. Concentración de naftaleno en tejido de ostión *C. corteziensis* (n=5) expuestos a 1, 20 y 50 µg/g del hidrocarburo durante 1, 3, 5 y 7 días.

Tiempo Días	<i>C. corteziensis</i> Tejido	Concentración de Naftaleno (µg/g)		
		1	20	50
1	Branquia	2.502 ± 2.385	2.838 ± 3.193	1.930 ± 3.145
	Glándula digestiva	0.374 ± 0.675	ND	ND
3	Branquia	ND	0.111 ± 1.195	0.814 ± 1.960
	Glándula digestiva	ND	0.256 ± 0.704	ND
5	Branquia	ND	ND	ND
	Glándula digestiva	ND	0.119 ± 0.167	ND
7	Branquia	ND	ND	0.841 ± 1.654
	Glándula digestiva	1.589 ± 1.195	0.568 ± 0.535	0.265 ± 0.739

Los datos son representados como la X±DE. ND: no detectable.

Los resultados de la determinación de naftaleno en el agua de mar filtrada utilizada en los bioensayos, previo a la exposición a naftaleno, indican que en ésta no se detectó la presencia del hidrocarburo, mientras que en agua de mar a la que se adicionó 1 µg/L de naftaleno, se detectó en promedio 0.006 ± 0.003 µg/L del hidrocarburo. Por otra parte, en agua de mar a la que se adicionó 20 y 50 µg/L de naftaleno, se detectó en promedio 0.008 ± 0.007 y 0.0052 ± 0.0043 µg/L, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Determinación de naftaleno en agua expuesta a 1, 20 y 50 µg/L del naftaleno durante 1, 3, 5 y 7 días.

Tiempo días	PE	Concentración de naftaleno en agua (µg/L)		
		1	20	50
1	ND	0.0092	0.0015	0.0054
3	ND	0.0043	0.0043	ND
5	ND	0.0021	0.0184	0.0107
7	ND	0.0083	0.0081	0.0050

ND: no detectable; PE: Agua previa exposición.

Previo a la determinación de la concentración de proteína en glándula digestiva y hemolinfa, se realizó una curva de absorbancia vs concentración de BSA (Anexo 1a). Los resultados obtenidos indicaron, que la concentración de proteína en glándula digestiva de ostiones expuestos a 1 µg/L de naftaleno, durante 1 y 3 días, se incrementó significativamente con respecto al control (Figura 9a). Por otra parte, la exposición a 20 µg/L de naftaleno, no modificó significativamente la

concentración de proteína en este tejido (Figura 9b). En cuanto a los ostiones expuestos 50 $\mu\text{g/L}$ del hidrocarburo, se observó una disminución en este parámetro con respecto al control después de 1 día de exposición, sin embargo, la concentración de proteínas aumentó a los 3 días post-exposición (Figura 9c).

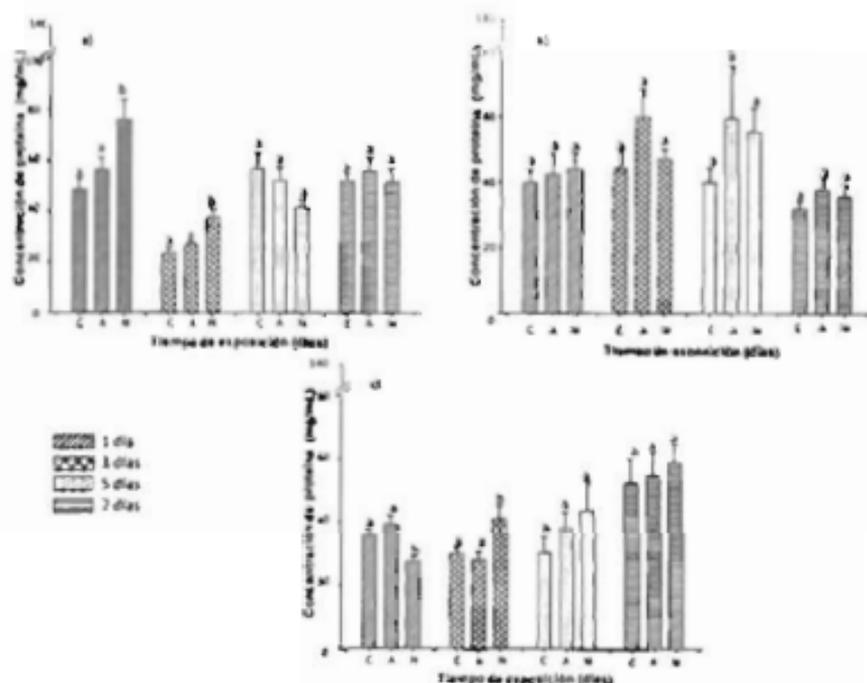


Figura 9. Concentración de proteína: en glándula digestiva de ostión *C. corteziensis* ($n = 10$) expuesta a concentraciones subletales a) 1 $\mu\text{g/L}$, b) 20 $\mu\text{g/L}$ y c) 50 $\mu\text{g/L}$ de naftaleno (N) durante 1, 3, 5 y 7 días y ostiones control: acetona (A) y agua de mar (C). Los datos son representados como la $\bar{X} \pm \text{EE}$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Respecto a la concentración de proteína en hemolinfa, ésta se incrementó significativamente cuando los organismos se expusieron a 1 y 20 $\mu\text{g/L}$ del hidrocarburo durante 5 y 7 días respectivamente (Figura 10 a y b). Mientras que los ostiones expuestos durante 5 días a 20 $\mu\text{g/L}$, mostraron una disminución de este parámetro (Figura 10b). Por otra parte, los resultados indican que la

concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ de este hidrocarburo no afectó significativamente la concentración de proteínas en las condiciones evaluadas (Figura 10c)

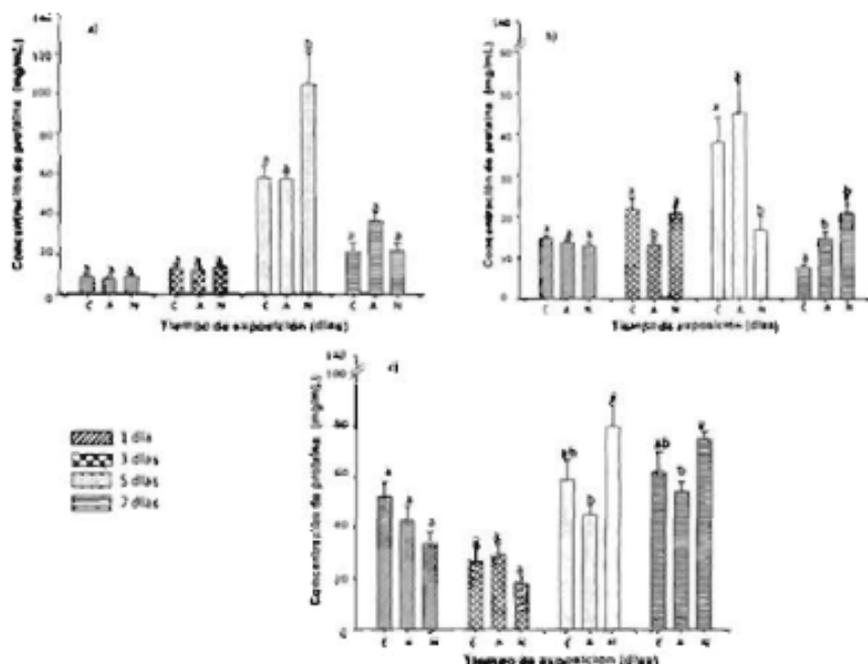


Figura 10. Concentración de proteína; en hemolinfa de ostión *C. corteziensis* (n = 10) expuestos a naftaleno a) 1 $\mu\text{g/L}$, b) 20 $\mu\text{g/L}$, c) 50 $\mu\text{g/L}$, durante 1, 3, 5 y 7 días. Controles; acetona y agua de mar. Los datos son representados como la $\bar{X} \pm \text{EE}$. Los (*) indican diferencia significativa ($p < 0.005$). ** $p < 0.001$) entre los ostiones expuestos a naftaleno vs control.

Para calcular la actividad de lisozima, los datos obtenidos se interpolaron en una curva realizada *ex profeso*, con lisozima de huevo de gallina (0.041-0.25 U/g) (Anexo 1b) La exposición a 1 $\mu\text{g/L}$ de naftaleno durante 3, 5 y 7 días, disminuyó significativamente la actividad de lisozima en los ostiones (Figura 11a). Mientras que la concentraciones de 20 del hidrocarburo indujo un incremento en la actividad de la enzima a 5 días (Figura 11b). Al exponer los ostiones a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de este hidrocarburo, se observó un incremento en la actividad de este parámetro a 5 y 7 días y 50 $\mu\text{g/L}$ (Figura 11 c)

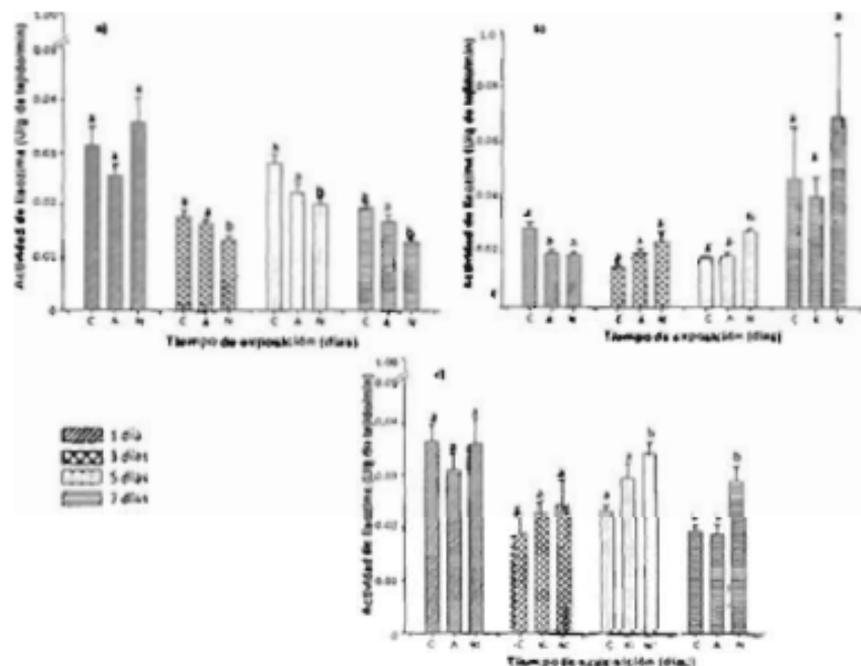


Figura 11. Actividad de lisozima: en glándula digestiva de ostión ($n=10$) expuesta a concentraciones subletales a) $1 \mu\text{L}$, b) $20 \mu\text{g/L}$ y c) $50 \mu\text{g/L}$ de naftaleno (N) durante 1, 3, 5 y 7 días y ostiones control: acetona (A) y agua de mar (C). Los datos son representados como la $\bar{X} \pm \text{EE}$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 12, se compara el efecto de naftaleno entre las tres concentraciones evaluadas. De manera general se observa un mayor aumento de este parámetro en los ostiones expuestos a 20 y $50 \mu\text{g/L}$ vs los expuestos a $1 \mu\text{g/L}$.

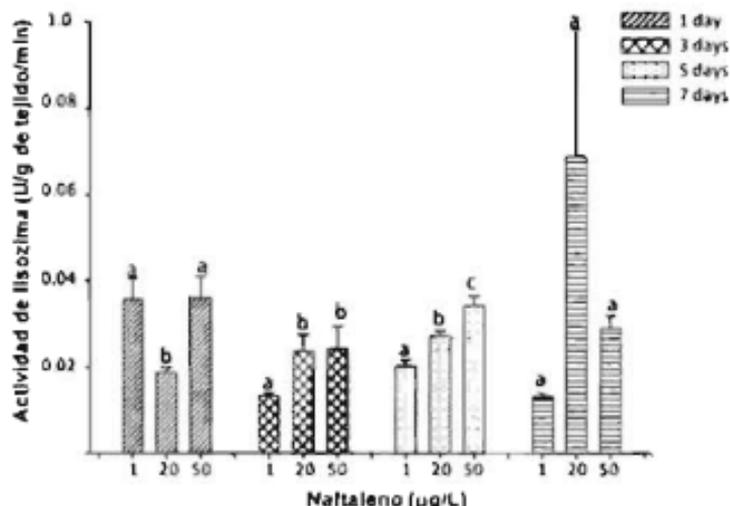


Figura 12. Actividad de lisozima: en glándula digestiva de ostión *C.* ($n = 10$) expuestos a concentraciones subletales de naftaleno durante 1, 3, 5 y 7 días. Los datos son representados como $\bar{X} \pm EE$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

La actividad de fenoloxidasas (FO), presente en glándula digestiva de ostiones expuestos a naftaleno, fue evaluada mediante oxidación de L-DOPA. En general se observó que la oxidación de L-DOPA es proporcional a la concentración de proteína, con una degradación máxima a las 5 h. En la Figura 13 se muestra una curva tipo de la degradación de L-DOPA en el tiempo, con diferentes concentraciones de proteína.

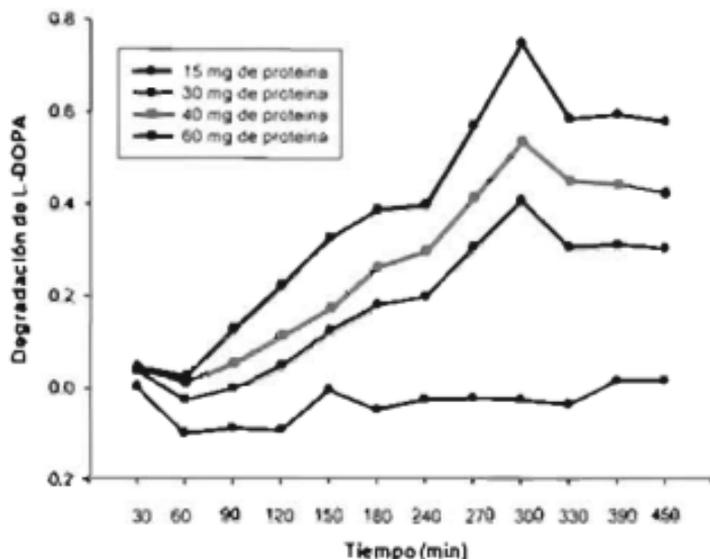


Figura 13. Curva tipo. Degradación de L-DOPA en 15, 30, 40 y 60 mg de proteína en glándula digestiva

Los resultados en la actividad de FO en *C. corteziensis* expuestos a 1 $\mu\text{g/L}$ de naftaleno mostraron un incremento significativo al día 1 y 5 con respecto al control (Figura 14a); este incremento también se observó cuando los ostiones se expusieron a 50 $\mu\text{g/L}$ del hidrocarburo durante 1 y 5 días (Figura 14c). Por otra parte, se observó una disminución en este parámetro, tras la exposición a naftaleno a 20 $\mu\text{g/L}$ durante 1 y 3 días (Figura 14b), así como posterior a la exposición de 1 $\mu\text{g/L}$ durante 3 días.

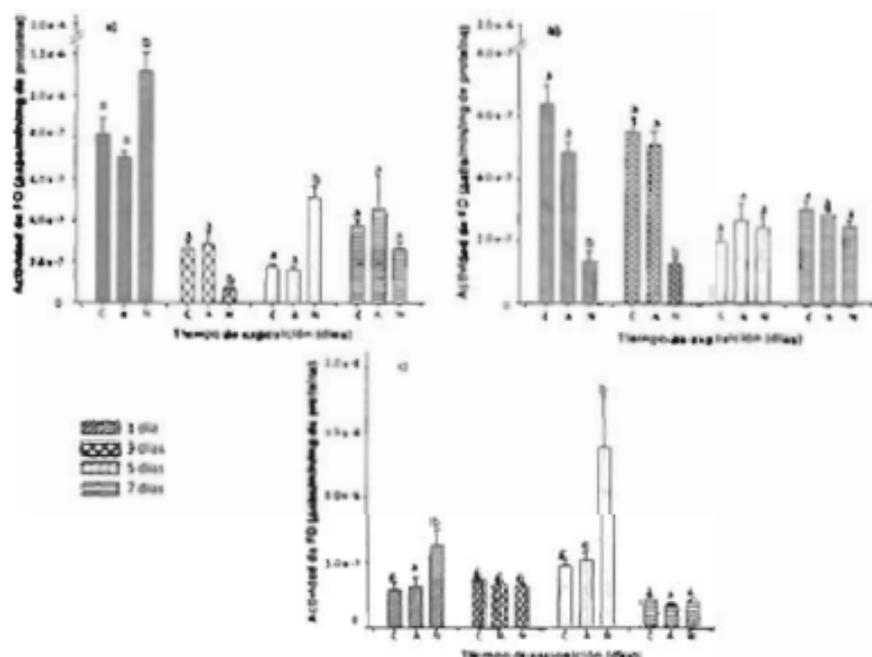


Figura 14. Actividad de fenoloxidasas en glándula digestiva de ostiónes (n=10) expuesta a concentraciones subletales a) 1 µg/L, b) 20 µg/L y c) 50 µg/L de naftaleno (N) durante 1, 3, 5 y 7 días y ostiones control: acetona (A) y agua de mar (C). Los datos son representados como la $\bar{X} \pm EE$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 15 se observa el efecto en la actividad de FO en glándula digestiva de ostiones expuestos a naftaleno (1, 20 y 50 µg/L) a los tiempos probados, donde se observó que a 20 µg/L de naftaleno durante 1 y 5 días *post*-exposición, la actividad de FO disminuye significativamente con respecto a 1 y 50 µg/L. Mientras que en los ostiones expuestos a 50 µg/L por 3 días la actividad de FO se incrementó significativamente comparado con 1 y 20 µg/L.

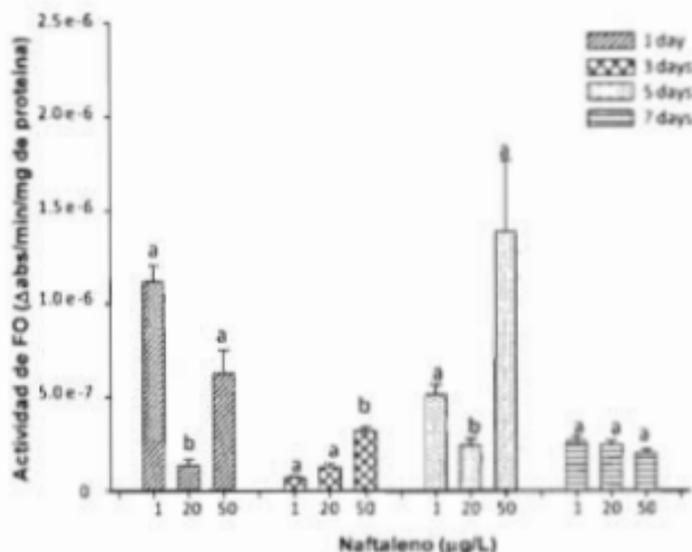


Figura 15. Actividad de fenoloxidasas: en glándula digestiva de ostión *C. coriaceus* ($n = 10$) expuestos a concentraciones subletales de naftaleno durante 1, 3, 5 y 7 días. Los datos son representados como $\bar{X} \pm EE$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Previo a la determinación de la concentración de óxido nítrico (ON) presente en hemolinfa de ostiones se realizó una curva de nitritos (10-100 mM), en la cual se interpolaron los datos obtenidos en los grupos experimentales de ostiones (Anexo 1c). Los resultados indican que la concentración de óxido nítrico en los organismos expuestos a 1 µg/L de naftaleno durante 1 día, disminuyó significativamente comparado con el control (Figura 16a), no obstante la concentración de esta molécula no cambió significativamente, con respecto al control, en los ostiones expuestos durante 3, 5 y 7 días a esta concentración. En lo que respecta al efecto de 20 µg/L (Figura 16b), se observó que la concentración de ON aumentó en los ostiones expuestos durante 1 día a esta concentración, mientras que los ostiones expuestos durante 5 días, presentaron una disminución de esta molécula. Por otra parte, los ostiones expuestos a 50 µg/L, presentaron un

aumento y disminución de ON posterior a 1 y 3 días *post*-exposición, respectivamente (Figura 16c)

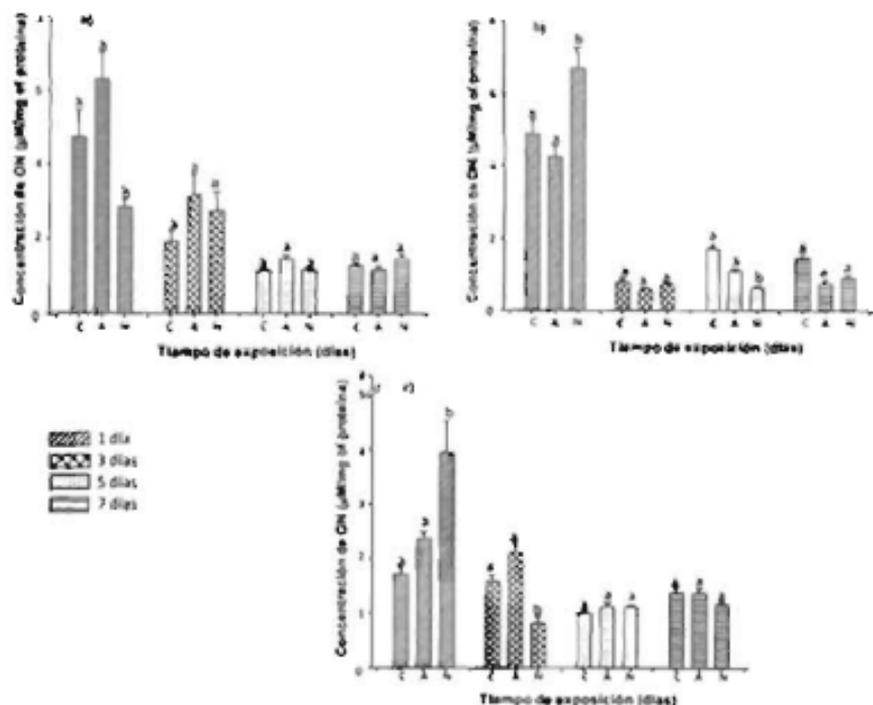


Figura 16. Concentración de óxido nítrico: en hemolinfa de ostión ($n=10$) expuesta a concentraciones subletales a) $1 \mu\text{g/L}$, b) $20 \mu\text{g/L}$ y c) $50 \mu\text{g/L}$ de naftaleno (N) durante 1, 3 5 y 7 días y ostiones control: acetona (A) y agua de mar (C). Los datos son representados como el $\bar{X} \pm \text{EE}$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 17, se compara el efecto de naftaleno a las tres concentraciones evaluadas. Los resultados indican que en los ostiones expuestos a naftaleno (1 , 20 y $50 \mu\text{g/L}$) durante 24 h, se observó una mayor producción de ON comparado con ostiones expuestos a este xenobiótico a mayor tiempo

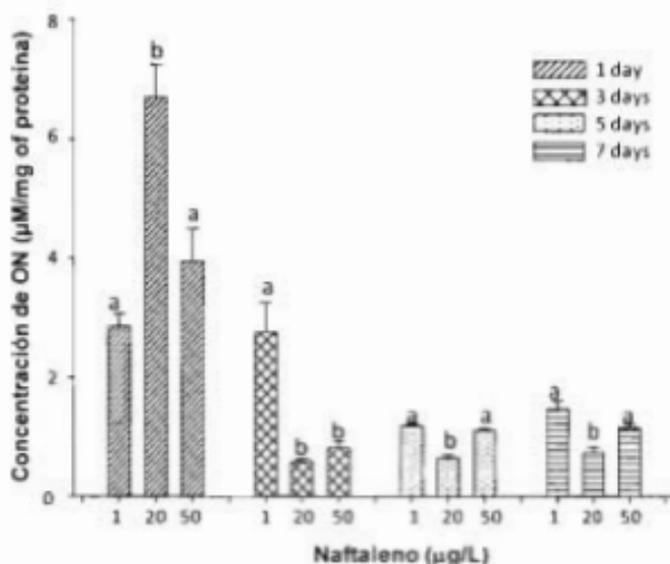


Figura 17. Concentración de óxido nítrico en hemolinfa: de ostión *C. corteziensis* ($n = 10$) expuestos concentraciones subletales de naftaleno durante 1, 3, 5 y 7 días. Los datos son representados como $\bar{X} \pm EE$. Letras diferentes entre las barras del mismo grupo indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Con el objetivo de evaluar el tiempo de respuesta de cada parámetro en los ostiones expuestos a naftaleno, se graficaron los resultados de forma integral (tiempo de exposición y concentración). Los resultados indicaron que la actividad de lisozima se alteró de manera más tardía (5-7 días), en comparación con PO y ON, parámetros que presentaron mayor alteración en tiempos más cortos (1-3 días) (Figura 18).

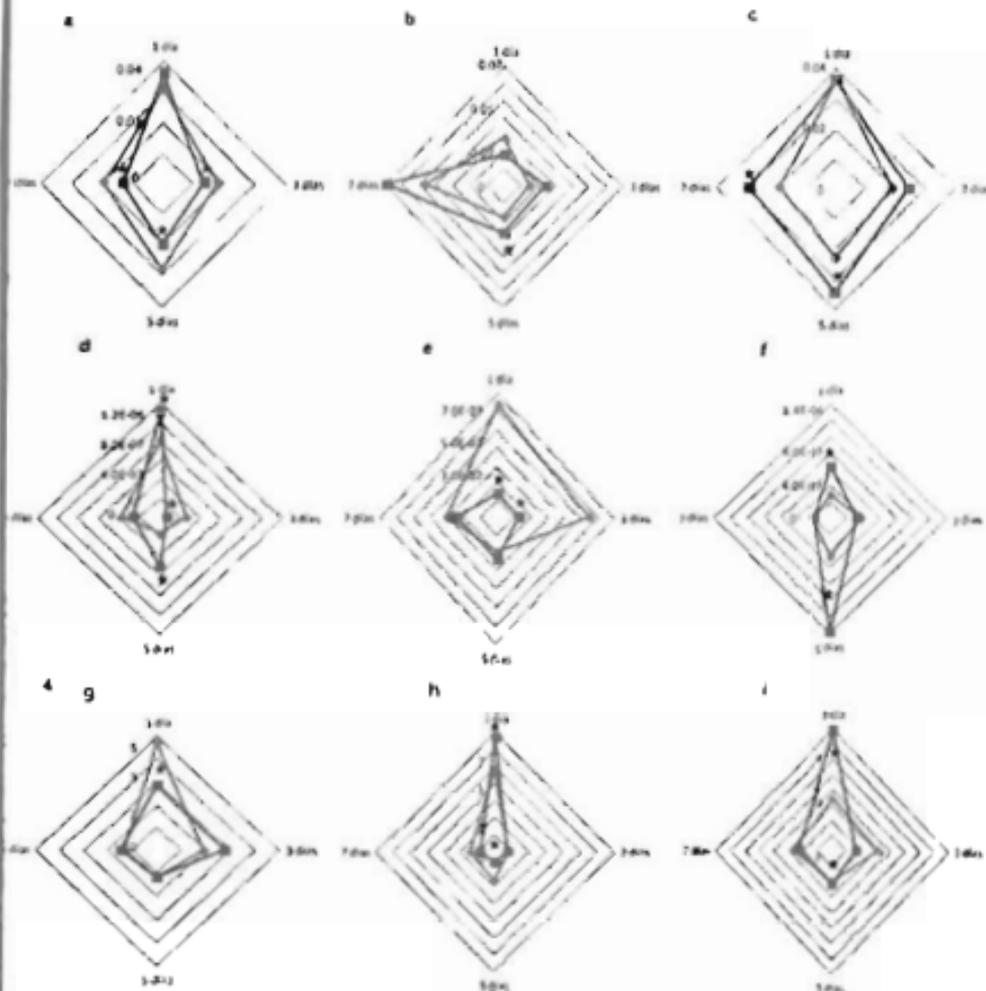


Figura 18. Efecto de naftaleno en los mecanismos de defensa de *C. corteziensis* con respecto al tiempo. Actividad de lisozima expuesta a: a) 1 $\mu\text{g/L}$, b) 20 $\mu\text{g/L}$ y c) 50 $\mu\text{g/L}$; actividad de FO d) 1 $\mu\text{g/L}$, e) 20 $\mu\text{g/L}$ y f) 50 $\mu\text{g/L}$ y concentración de ON g) 1 $\mu\text{g/L}$, h) 20 $\mu\text{g/L}$ y i) 50 $\mu\text{g/L}$. Los datos son representados como media. * $p < 0.005$, en rojo: naftaleno y azul: control.

7. DISCUSIÓN

En los moluscos bivalvos, una respuesta inmune efectiva es esencial para el mantenimiento de una buena salud del organismo y cualquier alteración en los mecanismos de inmunidad puede traer consecuencias en el desarrollo de infecciones y alteraciones en la fisiología del organismo, lo que puede repercutir en el crecimiento, reproducción y en última instancia supervivencia de estos organismos (Blaise *et al.*, 2002). En este sentido, existen estudios que muestran que los PAHs causan efectos sobre la respuesta inmune en moluscos, lo cual podría inducir inmunosupresión o estimulación, lo que provoca disminución de la resistencia a enfermedades (Gagnaire *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2009; Hannam *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios se han enfocado en la respuesta inmune celular y es poco lo que se ha reportado sobre la respuesta inmune humoral. De esta manera, hasta la fecha, no existen reportes en la literatura científica donde se evalué el efecto inmunotóxico del naftaleno sobre la especie *C. corteziensis*, por lo que éste es el primer estudio donde se evalúan parámetros de la respuesta inmune humoral (fenoloxidasa, lisozima y óxido nítrico) en esta especie nativa de las costas del Pacífico tropical, con importancia económica en la región Pacífico norte de México (Maeda-Martínez, 2008).

Respecto a la determinación de naftaleno en los ostiones, los resultados obtenidos indican que en ostiones no depurados (recién comprados en mercado local), se detectó naftaleno ($0.733 \pm 0.657 \mu\text{g/g}$), lo que sugiere que los ostiones cultivados en la zona están expuestos a este hidrocarburo. Sin embargo, en ostiones que se mantuvieron en el sistema de recirculación por un periodo de 30 días, no se detectó la presencia de naftaleno, lo que indica que estos organismos se depuraron de este contaminante bajo las condiciones del sistema experimental utilizado. Estudios similares realizados por Adamo *et al.*, (1997), con el mejillón *M. galloprovincialis*, coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo otros autores indican que el proceso de depuración de contaminantes en moluscos, pueden ser desde 72 h para *Anadara tuberculosa*, hasta 42 días para *Chlamys islándica* (Hannam *et al.*, 2009; Zambrano *et al.*, 2012), ya que, de

acuerdo a American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), y Water Environment Federation (WEF), se establece como tiempo mínimo 48 h para depuración en bivalvos (APHA, AWWA, WEF, 2005).

Por otra parte, en agua y en tejido de ostiones expuestos a naftaleno (1, 20 y 50 µg/L), se detectó el hidrocarburo en diferentes concentraciones; la concentración de naftaleno presentó variaciones a lo largo del tiempo de los bioensayos. Este patrón es un comportamiento usual en este tipo de matrices (agua y tejido), debido a la volatilidad y solubilidad de este tipo de compuestos, así como a la incorporación y eliminación de este xenobiótico en los moluscos, procesos que están influenciados por la lipofilia de naftaleno (Calero y Zambrano, 1997; CSIC, 2003; CCME, 2010).

Los resultados en la concentración de proteína en tejido (hemolinfa y glándula digestiva) de ostión *C. corteziensis* expuesto a naftaleno, muestran una alteración significativa en este parámetro. Se observó que la concentración de proteínas en glándula digestiva se alteró, respecto al control, durante los primeros días de exposición a naftaleno; mientras que en hemolinfa, este parámetro se alteró posterior a cinco días de exposición al hidrocarburo.

Un factor que no se controló en este trabajo, fue el estadio de maduración de los organismos. Factor que puede ser responsable de la variación en la concentración basal de proteínas en los ostiones utilizados en la exposición a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 días). Resultados publicados por Berthelin *et al.*, 2000, indican que en primavera la concentración de proteína en *C. gigas*, aumenta hasta en 20%, lo que está relacionado con periodos de intensa demanda energética en la gónada, debido al desarrollo de los gametos, ya que las proteínas pueden servir como reserva de energía para la gametogénesis (Gabbott y Bayne, 1973; Ruiz *et al.*, 1992).

En el sistema inmune de bivalvos, la lisozima es uno de los agentes bacteriolíticos más importantes contra varias especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Esta enzima se encuentra en secreciones y tejidos mucosos, además es liberada por hemocitos durante la fagocitosis y participa en la inactivación de patógenos. Sin embargo la actividad de lisozima puede verse afectada por la presencia de contaminantes como los PAHs (Ordás *et al.*, 2007; Gopalakrishnan *et al.*, 2011). En el presente estudio la actividad de lisozima en glándula digestiva de ostión *C. corteziensis* fue modificada por la exposición a naftaleno, ya que la actividad de la enzima disminuyó significativamente a la exposición de 1 µg/L (, 5 y 7 días post-exposición) e incrementó significativamente a concentraciones de 20 (5 días) y 50 µg/L (5 y 7 días) del hidrocarburo. Estudios referentes al efecto de PAHs sobre este parámetro, indican que benzo[a]pireno inhibe la actividad de la lisozima en bivalvos (Boutet *et al.*, 2004, Gopalakrishnan *et al.*, 2009; Matozzo *et al.*, 2009; Gopalakrishnan *et al.*, 2011). Sin embargo, también se ha demostrado que la exposición a mezclas de PAHs, como petróleo crudo, incrementan la actividad de esta enzima (Oliver *et al.*, 2003; Ordás *et al.*, 2007).

La FO es una de las enzimas que participa en la defensa inmune humoral en bivalvos, esta enzima es clave en el proceso de melanización y participa en el recubrimiento de antígenos en una cápsula de melanina, o en la eliminación directa de los microorganismos por quinonas tóxicas producidas durante la producción de melanina (Soderhall y Cerenius, 1998). Existen estudios que muestran que la actividad de FO es un parámetro inmune sensible a la exposición a PAHs, ya que este parámetro se ve afectado al aumentar o disminuir su actividad por la exposición a estos contaminantes. Por ejemplo en mejillón *M. edulis*, ostra *C. gigas* y abulón *Haliotis diversicolor* expuestos a fluoranteno, benzo[a]fluoranteno y benzo[a]pireno respectivamente (Coles y Pipe, 1994; Bado-Nilles *et al.*, 2008; Gopalakrishnan *et al.*, 2011). la actividad de FO incrementó significativamente; mientras que en ostras *C. gigas* expuestas a la fracción soluble de gasóleo pesado HFO (Bado-Nilles *et al.*, 2009) y a la fracción soluble de aceite

cíclico ligero (LCO) (Bado-Nilles *et al.*, 2010) la actividad de esta enzima disminuyó. En este estudio la actividad de FO en glándula digestiva de ostión *C. corteziensis* fue modificada por la exposición a naftaleno (1, 20 y 50 µg/L) y mostró una desregulación en este parámetro, ya que la actividad de la enzima disminuyó a 1 µg/L a 3 días y 20 µg/L a 1 y 3 días post-exposición, e incrementó de manera significativa con respecto al control después de 1 y 5 días a 1 y 50 µg/L.

El óxido nítrico (ON) es una molécula de señalización ubicua con efectos inmunorreguladores y antimicrobianos (MacMicking *et al.*, 1997; Rivero, 2006). Debido a su naturaleza no polar esta molécula puede atravesar fácilmente las membranas de patógenos, lo que provoca daño al DNA, proteínas, lípidos y enzimas; además el ON también reacciona con el anión superóxido (O_2^-), generado durante el estallido respiratorio, para producir peroxinitrito (ONOO⁻), un compuesto con mayor toxicidad y con actividad antibacteriana y antiviral (Fang, 2004). Los hemocitos de varios moluscos marinos, como el mejillón *M. edulis* (Franchini *et al.*, 1995; Stefano *et al.*, 2002) y *M. galloprovincialis* (Arumugan *et al.*, 2000; Novas *et al.*, 2007), la ostra del Pacífico *C. gigas* (Nakayama y Maruyama, 1998; Torreilles y Romestand, 2001), y la almeja *Ruditapes decussatus* (Tafalla *et al.*, 2003) son capaces de producir ON en respuesta a estímulos inmunológicos. Sin embargo su producción puede verse alterada por la exposición a PAHs. Gopalakrishnan *et al.* (2011), mostraron un incremento en la concentración de ON en abulón (*Halotis diversicolors*) expuesto a 0,05 mg/L de benzo[a]pireno durante periodos largos (14 a 21 días) de exposición, sin embargo en periodos cortos (3 a 7 días) no se observó efecto. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la concentración de ON en ostiones *C. corteziensis* expuestos a naftaleno, disminuyó significativamente tras la exposición a 1, 20 y 50 µg/L a 1, 5 y 3 días respectivamente, pero incrementó a 1 día de exposición a 20 y 50 µg/L del hidrocarburo.

Por otra parte, con los resultados obtenidos se realizó una integración del tiempo de respuesta de cada parámetro en los ostiones expuestos a naftaleno, lo cual

mostró que la actividad de lisozima se modificó 3 días después de la exposición a naftaleno lo que sugiere que la lisozima es un mecanismo más resistente a la exposición a este hidrocarburo. Mientras que la actividad de FO y la concentración de ON se modificaron durante los primeros días *post*-exposición lo que se sugiere que la actividad de FO y la concentración de ON son parámetros inmunes sensibles a la exposición a naftaleno.

La medición de los mecanismos de defensa pueden proporcionar importantes señales de alerta temprana de los efectos sub-letales de la exposición a contaminantes y la susceptibilidad de los organismos a enfermedades infecciosas (Hannam *et al.*, 2009), ya que un incremento en la actividad de una enzima (lisozima y FO) o de alguna molécula (ON) implicada en los mecanismos de defensa, puede interpretarse como una respuesta del organismo a protegerse contra antígenos, respuesta que puede ser modulada por factores extrínsecos como los xenobióticos. Sin embargo, la persistencia o la activación excesiva de los mecanismos de defensa pueden conducir a hiperestimulación del sistema inmune, que puede ser perjudicial para el organismo, mientras que la inhibición de la enzima o molécula se puede interpretar como disminución en los mecanismos de defensa (Huggett *et al.*, 1992, Thiagarajan *et al.*, 2006). En ambos casos, los cambios en actividad de enzimas y la concentración de moléculas pueden afectar la supervivencia de los organismos cuando son expuestos a antígenos.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que de los tres parámetros inmunológicos evaluados, los más sensibles al efecto de naftaleno son ON y FO, mientras que la actividad de lisozima es un mecanismo que se afecta de manera tardía.
- El naftaleno a las concentraciones evaluadas causa una desregulación en los mecanismos de defensa inmune humoral.
- De acuerdo a la literatura y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se infiere que el potencial inmunotóxico del naftaleno es menor comparado con otros PAHs.
- De acuerdo a la hipótesis planteada en el presente trabajo, el naftaleno afecta de manera negativa la respuesta inmune humoral de ostión *C. corteziensis*. Sin embargo, en los parámetros evaluados no se observó una respuesta concentración/tiempo dependiente al xenobiótico.

9. LITERATURA CITADA

- Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P., Sansone, G. (1997). Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56:45-49.
- Anderson, R.S. (1996). Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 15:127-134
- APHA, AWWA, WEF. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association. Washington, DC. Part 8000 Toxicity. 8, 94-100
- Arumugan, M., Romestand, B., Torreilles, J. (2000). Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* 13:173-177.
- ATSDR. (1995). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of health and human services U.S. Toxicological profile for Polycyclic aromatic hydrocarbons 1995. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/TP.asp?id=122&tid=25> [Consultado 2013 Mayo]
- Bado-Nilles, A., Gagnaire B., Thoma-Guyon, H., Le Floch, S., Renault T. (2008). Effects of 16 hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro* 22 (6): 1610-1617
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Auffret M., Le Floch S., Gagnaire B., Renault, T., Thomas-Guyon, H. (2009). Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1446-1454
- Bado-Nilles A., Renault T., Faury N., Le Floch S., Quentel C., Auffrete M., Thomas-Guyona M. (2010). *In vivo* effects of LCO soluble fraction on immune-related functions and gene transcription in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 97:196-203
- Berthelin, C., Kellner K., Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125:359-369

- Biliard, S., Hahn, M., Franks D., Peterson, R., Bols, N., Hodson, P. (2002). Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 133: 55-68
- Bjork, M., Gilek M. (1996). Uptake and elimination of ¹⁴C-phenanthrene by the blue mussel *Mytilus edulis* L. at different algal concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (1): 151-158
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P. (2002) Immunocompetence of bivalve haemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. *Environmental Toxicology* 17: 160-169
- Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo A., Takada, H. (2006). Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin* 52: 942-956
- Botello, J., Garcia-Ruelas, C., Ponce-Velez, G. (2002). PHA Levels in Bivalve Mollusks from the Mexican Subtropical Pacific *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69: 486-493
- Boutet, I., Tanguy A., Moraga, D. (2004). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329(1): 147-157
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Cabrera-Rodríguez, P., Aldana-Aranda, D., Brulé T., Del Ángel A. (2008). Culture of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971) in Rio Lagartos, Yucatán, México. *Aquaculture Research* 28 (8): 611-619
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., del Rio, Portilla MA. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 66-73
- Cáceres-Puig, J., Abasolo-Pacheco, F., Mazón-Suástegui, J., Maeda-Martínez, A., Saucedo P. (2007). Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during later nursery culturing at the hatchery. *Aquaculture* 272: 417-422

- Calero, L., Zambrano, M. (1997). Bioacumulación de hidrocarburos aromáticos del petróleo en un molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*. *Boletín Científico CCCP*. (Colombia) 6: 131-137
- Campa-Córdova, A., Luna-González, A., Mazón-Suastegui, J., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F., González-Ocampo, H. (2011). Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión del placer *Crassostrea corteziensis*. *Revista de Biología Tropical* 59 (1): 183-191
- Cajaraville, M., Pal, S. (1995). Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Structure and Function* 20: 355-367
- Castillo-Durán, A., Chávez-Villaiba, J., Arreola-Lizárraga, A., Barraza-Guardado, R. (2010). Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and winter. *Ciencias Marinas* 36: 29-39
- Castillo-Rodríguez, Z., García-Cubas, A. (1984). Taxonomía y Anatomía Comparada de las ostras en las costas de México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. En: <http://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1985-2/articulo230.html>. (Consultado 2013 Mayo)
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (2010). Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Criteria Document (revised). Quebec (Canada). 216 pp.
- Chávez-Villaiba, J., Arreola-Lizárraga, A., Burrola-Sánchez, S., Hoyos-Chairez, F. (2010). Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture* 300: 128-136
- Cheng, T. (1975). Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266: 343-379
- Cheng, T. (1983). The role of lysosomes in molluscan inflammation. *American Zoologist* 23: 129-144
- Chu, FE. 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 1-42 pp.

- Coles, J.A., Pipe, R.K. (1994). Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 337-352
- CONAPESCA (2011). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario>
- CONAPESCA (2013). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion [Consultado 2013 Agosto]
- CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). (2003). Impacto de un vertido de petróleo sobre los organismos marinos. Algunas lecciones del vertido del Aegean sea Informe técnico No. 15. (España). En <http://csicprestige.iim.csic.es/informes/info15.pdf>. [Consultado 2013 Enero]
- Croxton, A., Wikfors, G., Schulerbrandt-Gragg (2012). Immunomodulation in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to a PAHs contaminated, microphytobenthic diatom. *Aquatic Toxicology* 118-119: 27-36
- Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 306 (6): 496-520
- Demers, N. y Bayne, C. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology* 21: 363-36
- Douben, P. (2003). PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Wiley. Online ISBN: 9780470867136. [Consultado 2013 Enero]
- Enriquez-Espinoza, T., Grijalva-Chon, J., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273
- EPA (1987) Quality Criteria for Water 1986. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Fang, F. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology* 2 (10): 820-32
- FAO 2010. En: Estadísticas de pesca y acuicultura. En: <http://www.fao.org/> <http://www.fao.org/fishery/es> [Consultado 2013 Septiembre]

- FAO 2012. En: Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. En: <http://www.fao.org/docrep/016/a2727s/a2727s00.htm>. [Consultado 2013 Septiembre]
- Farley CA. (1968). Minchinia nelsoni (Haplosporidia) disease syndrome in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Protozoology* 15: 585-599.
- Farrington, J., Davis, A., Frew N., Rabin, K. (1982) No. 2 fuel oil compounds in *Mytilus edulis*. Retention and release after an oil spill. *Marine Biology* 66: 15-26
- Franchini, A., Conte, A., Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Advances in Neuroimmunology* 5 (4): 463-78
- Gabbott, P., Bayne, B. (1973). Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* (L.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 53: 269-286
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot Th., Renault, T. (2006). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 22: 1-14
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvel A., Jean-Yves, D., Saulnier, D., Renault, T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *In vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology* 84: 92-102
- Galloway, T., Depledge, M. (2001). Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology*. 10: 5-23
- Girón-Pérez, M., Romero-Bañuelos, CA., Zepeda-Llamas, ME., Ramirez-Aranda, EM., Bautista-Duran FZ., García-Latorre E., Vega-Lopez A. (2009). Efecto de la contaminación ambiental sobre el estado de salud de los ostiones (*Crassostrea cortizensis*) del estero Boca de Camichin, Nayarit: implicaciones en el sistema inmune y en la respuesta pro-oxidante y antioxidante. Medalla Nayarit a la investigación científica y tecnológica. Tepic, Nayarit. México (inédito)
- Girón-Pérez, M. (2010). Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution. *Invertebrate Survival Journal* 7: 149-156
- Girón-Pérez, M., Barrón, V. (2010). Biomarcadores de Plaguicidas en organismos acuáticos. En: Robledo M, Medina D, Rojas G, Romero B. Plaguicidas en Nayarit. Universidad Autónoma de Nayarit. 71-72 pp

- Girón-Pérez M., Romero-Bañuelos C., Toledo-Ibarra, Rojas-García A., Medina-Díaz M., Robledo-Marengo M., Vega-López A. (2013). Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): Pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 165: 476–482
- Gómez-Mandikute, A., Cajaraville, M. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro* 17: 539-546
- Gorocica, R., Chávez, S., Lascurain, L., Espinosa, M., Zenteno, G. (1999). Óxido nítrico, una molécula multifuncional. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 12 (4): 300-304
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W., Wang K. (2009). Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo (a) pyrene. *Chemosphere* 75: 389–397
- Gopalakrishnan, S., Wei-Bin, H., Qiang-Wei, W., Man-Li, Wu, Jie-Liu, Ke-Jian W. (2011). Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 154:120–128
- Hannam, M., Bamber, S., Moody, J., Galloway, T., Jones M. (2009). Immune function in the Arctic Scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure. *Aquatic Toxicology* 92:187–194
- Hannam, M., Bamber, S., Galloway, T., Moody, A., Jones, M. (2010). Functional immune response in *Pecten maximus*: combined effects of a pathogen-associated molecular pattern and PAH exposure. *Fish and Shellfish Immunology* 28: 249-252
- Hansen, B.H., Altin, D.H., Vang, S.H., Nordlug, T., Olsen, A.J. (2007). Effect of naphthalene o gene transcription in *Calanus finmarchinus* (Crustacea, Copepoda). *Aquatic Toxicology* 86:157-165
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H. (2007). Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish and Shellfish Immunology* 22: 433-440

- Huggett, R., Kimerle, R., Mehrle, Jr P. (1992). Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis, Publishers, Universidad de Michigan 347 pp.
- Ibañes, C., Caiola, M., Nebra, A., Wessels, M. (2009). Estuarios. Primera ed. 1. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. Secretaria General Técnica España 7-10 pp
- Iniesta, R., Blanco, J. (2005) Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia. *Journal of Marine Research* 2: 1-200
- Itoh, N., Takahashi, K. (2007). cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 148: 160-166
- Itoh, N., Takahashi, K. (2009) A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Immunology* 46: 1768-1774
- Itoh, N., Okada, Y., Takahashi, K., Osada, M. (2010). Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 126-135
- Jonsson, G.; Bechmann, R.K.; Bamber, S.D.; Baussant, T. (2004). *Environmental Toxicology Chemistry* 23: 1538-1548
- Livingstone, D., Lemaire, P., Matthews, A., Peters, L., Bucke, D., Law, R. (1993). Pro-oxidant, Antioxidant and 7-Ethoxiresorufin O-Deethylase (EROD). Activity Responses in Liver of Dab (*Limanda limanda*) Exposed to Sediment Contaminated with Hydrocarbons and other Chemicals. *Marine Pollution Bulletin* 26(11): 602-606
- López, A., Urcuyo, J. (2008) Moluscos de Nicaragua. I-bivalvos. Primera edición. Ministerio del ambiente y los recursos naturales (marena)
- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H. (2010) First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology* 28: 719-26
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., De Decker, S., Renault T., Thomas-Guyon H. (2011a). First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific

oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 31: 795-800

Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Amari M., Rosenfeld, E., Bustamante, P., Fruitier-Arnaudin, I. (2011 b). Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 4: 220-226

MacMicking, J., Xie, Q., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15: 323-50

Maeda-Martinez, A. (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO. Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO 91-100 pp. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0444s/i0444s02.pdf>

Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (1): 27-36

Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G., Marin, M. (2009). First evidence of altered immune response and resistance to air exposure in the clam *Chamelea gallina* exposed to Benzo[a]pyrene. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 479-488

Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Takahashi, K.G. (2006). Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 145: 325-330

Mazón-Suastegui, J. (1996). Cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas*. En: Casas-Valdez M. y Ponce-Díaz G. (eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. II 650

Mazón-Suastegui, J., Saucedo, P., Ruiz-Ruiz, K., Parres-Haro A., Rodríguez-Jaramillo, C. (2009). Artificial diets reduce nursery costs for the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis*, with good spat/juvenile growth, biochemical composition, and physiological condition for field culture. *World Aquaculture Society* 25-29

- McDade, J., Tripp, M. (1967) Lysozyme in the hemolymph of the oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 9: 531-535
- McHenry, J., Birkbeck, T., Allen, J. (1979). Occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 63: 25-28
- Meador, J. (2003) Bioaccumulation of PAHs in Marine Invertebrates. In: Douben, P.E.T., (Ed) PAHs: An Ecotoxicological Perspective, John Wiley & Sons Ltd, 147-171 pp.
- Medina, V., Medina, G., Campos, R. (2006). Detección de contaminantes orgánicos sobre superficies pasivas por espectroscopia RAMAN estimulada. *Conciencia Tecnológica* 31: 28-33
- Mohandas, A., Cheng, TC., Cheng, JB. (1985). Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 189-197
- Moncada, S., Palmer, RM., Higgs, EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43: 109-142
- Morales-Bojórquez, E. (2009). Indicadores biológicos de cambios globales: el océano Pacífico. *Revista de Ciencia y Desarrollo* 35: 60-64
- Nakayama, K., Maruyama, T. (1998). Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Development Comparative Immunology* 22 (2): 151-9
- Nappi, A., Vass, E. (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. *Pigment Cell Research* 6: 117-126
- Novas, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, I. (2007). After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 85: 285-290
- Oliver L., Fisher W., Voley A., Malaeb Z. (2003). Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64: 363-373
- Ordás, M., Albaiges, J., Bayona, J., Ordás A., Figueras, A. (2007). Assessment of *in vivo* effects of the Prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel

immune system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52: 200-206

- Páez-Osuna, F. (1999) La contaminación y polución costera. *Ciencia y desarrollo XXV* 144: 60-65
- Parra-Laca, R., Vázquez-Yeomans, R., Río-Portilla, M., Cáceres-Martínez, J. (2010) Characterization of *Uratostoma* sp. found in *Crassostrea virginica* and *Crassostrea corteziensis* a coevolutionary approach. *World Aquaculture Society International Congress San Diego California*
- Perugini, M., Visciano, P., Manera, M., Turno, G., Lucisano, A., Amorena, M. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (5): 2049-2054
- Polanco, T. (2002). Impulso desarrollo y potenciación de la ostricultura en España. *Fundación Alfonso Martín Escudero*, 2 pp
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L. (2005). Persistence of *Vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* 7: 761-772
- Ramdine G., Fichet D., Louis M., Lemoine S. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 80-89
- Ratcliffe, N., Brookman, J.L., Rowley, A.F. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial Lipopolysaccharides. *Development and Comparative Immunology* 15: 33-39
- Rivero, A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in Parasitology* 22(5):219-25
- Roberts, S., Goetz, G., White, S., Goetz, F. (2009). Analysis of Genes Isolated from Plated Hemocytes of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* 11: 24-44
- Rodríguez de la Rúa, A., González de Canales, M. y Sarasquete, C. (2002). Estudio histomorfológico del aparato digestivo y distribución histoquímica de carbohidratos en el ostión *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 329-336
- Ruiz, C., Abad M., Sedano, F., García-Martín, L., Sánchez, L. (1992). Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical

composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155:249-262

- Sánchez-Hernandez, B. (2003). Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo y su acción como agente terapéutico. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica* 11(2): 72-76
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M. (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 5 (1): 21-29
- Söderhäll, K., Smith VJ. (1986). The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. *Invertebrate Immunity* 208-223 pp.
- Shöderhäll, K., Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10 (1): 23-28
- Shöderhäll, K. (2010). Invertebrate Immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 708. Landes Bioscience. Springer. En: http://books.google.com.mx/books?id=m3ri40Qg2kkC&pg=PA61&lpg=PA61&dq=Invertebrate+Blood+Cells+I+Bivalves&source=bl&ots=kNrNqn95yX&sig=NHC_FchOm3fw0zesmoc6vTHklp8&hl=es-419#v=onepage&q=Invertebrate%20Blood%20Cells%20I%3A%20Bivalves&f=false (consultado 2013 febrero)
- Solomon, E., Sunduran, U., Machonkin, T. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-606
- Soriano-Sanz (2009) Evaluación y seguimiento del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido de B/Tprestige. Universidad de Coruña. Tesis de Doctorado. 3-40 pp
- Stefano, G., Salzet, M., Magazine, H. (2002). Cyclic nitric oxide release by human granulocytes, and invertebrate ganglia and immunocytes: nano-technological enhancement of amperometric nitric oxide determination. *Medical Science Monitor* 8,6: 199-204
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A. (2002). Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132: 423-431

- Tafalla, C., Gomez-Leon, J., Novoa, B., Figueras, A. (2003). Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Development and Comparative Immunology* 27(3): 197-205
- Thiagarajan, R., Gopalakrishnan, S., Thilagam, H. (2006). Immunomodulation in the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51 (3): 392-399
- Thurston, C. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Society for General Microbiology* 140 (1): 19
- Toledo-Ibarra G. (2012). Evaluación de parámetros físico-químicos y contaminación en el estero Boca de Camichin y su efecto en la actividad de enzimas antioxidantes en ostión (*Crassostrea corteziensis*). Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic Nayarit, México 61 pp.
- Torreilles, J., Romestand, B. (2001). In vitro production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. *BMC Immunology* 2 (1): 1
- UNEP. (2003). Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Global report. 1-207 pp.
- Vargas-Albores, F., Barracco, M. (2001). Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos. Con énfasis en pectinidos. Los Moluscos Pectinidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura A N Maeda-Martinez (ed.), Cap. 7: 127-146 pp.
- Villamil, L., Gomez-Leon, J., Gomez-Chiarri, M. (2007). Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Development and Comparative Immunology* 31: 968-977
- Vijayavel, K., Gomathi, R.D., Durgabhavani, K., Balasubramanian, M.P. (2004). Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Marine Pollution Bulletin* 48: 429-433
- Voet-Donald, Voet-Judith, Pratt, C. (2007). Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular. Segunda ed. Panamericana 1260pp. En http://books.google.com.mx/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA531&lpg=PA531&dq=estructura+del+lisoizima+de+clara+de+huevo+de+gallina&source=bi&oeq=PA531&oeq=PA531

ts=RlljYw8O5&sig=Bk7E6bwWqE8Fq2gde4conpo5TA8&hl=es&sa=X&ei=L0ZtUtnEFqThyQG02ICACA&ved=0CDsQ6AEwAw#v=onepage&q=estructura%20del%20lisozima%20de%20clara%20de%20huevo%20de%20gallina&f=false

- Widdows, J., Moore, S., Clarke, K., Donkin, P. (1983) Uptake, Tissue Distribution and Elimination of [1-14C-] Naphthalene in the Mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 76: 109-114
- Wootton, E., Dyrinda, E., Pipe R., Ratcliffe, N. (2003). Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology* 65: 13-25.
- Xue, Q., Schey, K., Volety, A., Chu F., La Peyre, J. (2004) Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative and Biochemistry Physiology Part B* 139: 11-25
- Xue, Q., Itoh, N., Schey, K. Li, Y., Cooper, R., La Peyre J. (2007). A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 82-95
- Xue, Q., Hellberg, M., Schey, K., Itoh, N., Eytan, R., Cooper, R., La Peyre, J. (2010). A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evolutionary Biology* 10: 213
- Zambrano M., Prada J., Arencibia G., Vidal A. (2012). Bioacumulación de naftaleno y fluoranteno en el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* (sowerby, 1833). *Revista UDCA actualidad & divulgación científica* 15 (2): 283 - 290
- Zambrano-Soria M. (2012). Crecimiento, contenido de metales pesados y calidad de Ostión de Cortez (*Crassostrea corteziensis*) cultivado el Estero Camichin, Nayarit. Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiólogo. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic Nayarit, México 42 pp.

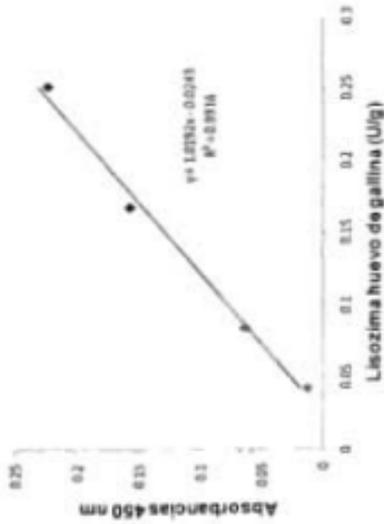
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SANTIAGO



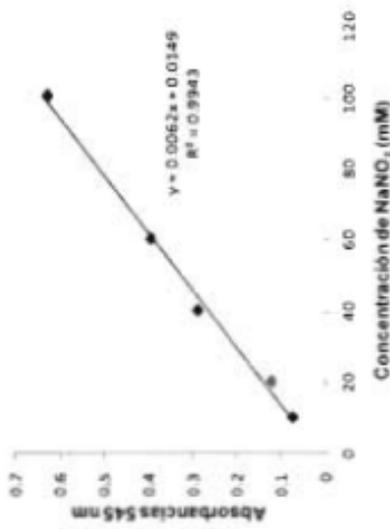
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

ANEXO 1

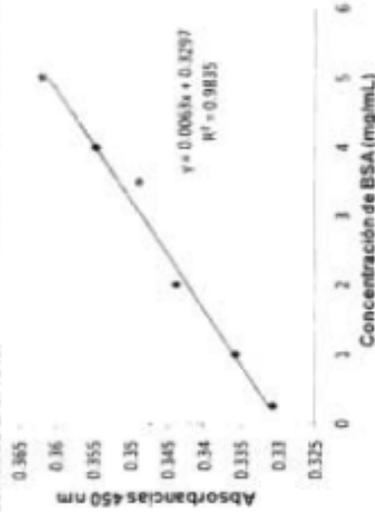
Curvas tipos sobre las cuales se interpolaron los datos experimentales obtenidos



Anexo 1a. Curva estándar de lisozima. Como blanco de esta enzima se utilizó *Micrococcus lysodicticus* al 0,15%.



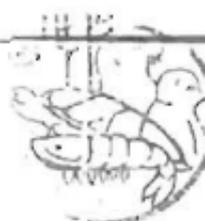
Anexo 1b. Curva estándar de Nitrito de sodio NaNO_2



Anexo 1c. Curva estándar de proteína. Se utilizo un estándar de BSA de concentración conocida (0,25-5,0 mg/mL).

ANEXO 2

**Constancias de participación en eventos académicos donde se
presentaron los resultados parciales del presente estudio**



MENTIÓN HONORÍFICA

A: Karina Diaz Resendiz,

Por su Participación en el
CONFERENCIA INTERNACIONAL DEL
FORO CONMATIVO EN ECOSISTEMAS ACUICOLAS

con la ponencia: EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS AND IMMUNOLOGIC
RESPONSES IN OYSTER (*Crassostrea corteziensis*) EXPOSED TO NAPHTHALENE

Los Cobos Baja California Sur del 20 al 23 de noviembre de 2012

Tania Zenteno-Savín

José Pablo Virzquez-Medina

Joanna Joyana Matos

Susana Pineda



Otorga lo presente:

CONSTANCIA

A: Korina Janice Guadalupe Diaz Resendiz

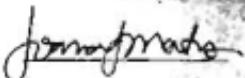
Por su Participación en el
PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL DEL
ESTRES OXIDATIVO EN ECOSISTEMAS ACUATICOS*

Los Cabos, Baja California Sur del 20 al 23 de noviembre de 2017




Tania Zenteno Savin


Jose Pablo Vazquez Medina


Joanna Joyner-Matos


Susana Ferrer



Otorga la Presente

Constancia a:

**Karina Janice Guadalupe Díaz Reséndiz, Manuel Iván Girón Pérez,
Carlos Alberto Romero Bañuelos.**

Por su participación en la "Jornada de Investigación 2011" con el trabajo:

*Efecto de hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre la respuesta inmune de ostión
(crassostrea corteziensis)*



Dr. Rubén Bugarín Montoya
Secretario de Investigación y Posgrado

Dr. Alberto Madueño Molina
Director de Fortalecimiento a la Investigación