

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN OSTIÓN
(*Crassostrea corteziensis*) EXPUESTOS A NAFTALENO**



DALIA GUADALUPE MENDOZA LÓPEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MANUEL IVÁN GIRÓN PÉREZ**

**CODIRECTOR:
M.C. CARLOS ALBERTO ROMERO BAÑUELOS**

**ASESORES:
DRA. MARIA DE LOURDES ROBLEDO MARENCO
DRA. BRISCIA SOCORRO BARRÓN VIVANCO
DR. JOSÉ ARMANDO LÓPEZ SÁNCHEZ**

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en el Área De Ciencias Ambientales

Tepic, Nayarit. Abril de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/065/14

Xalisco, Nayarit; 24 de marzo de 2014

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
Presente.

Con base al oficio de fecha 24 de febrero de 2014, enviado por los **CC. Dr. Manuel Iván Girón Pérez, M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos, Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco y Dr. José Armando López Sánchez**, 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. Dalia Guadalupe Mendoza López**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.-Expediente.

Ref.

Dr. Juan Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado CBAP
Universidad Autónoma de Nayarit

PRESENTE

Los profesores que suscriben la presente, integrantes del consejo tutorial de la Biol. Exp. Dalia Guadalupe Mendoza López, declaramos que hemos revisado la tesis titulada "Evaluación del estrés oxidativo en ostión (*Crassostrea corteziensis*) expuestos a naftaleno" y determinamos que la tesis puede ser presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Ambientales.

ATENTAMENTE



Dr. Manuel Iván Girón Pérez
Director



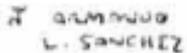
M. en C. Carlos Alberto Romero Bañuelos
Co-director



Dra. María de Lourdes Robledo Marengo
Asesor



Dra. Briscia Sorro Barrón Vivanco
Asesor



Dr. José Armando López Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

Ofelia López y Jesús Mendoza

Memelas y Coleman

Liliana y la Milanese

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de alguna manera contribuyeron para que el día de hoy pudiera concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres. Por su amor y su apoyo durante toda mi vida, les agradezco todos los sacrificios que han hecho para sacarnos adelante a mí y a mis hermanas, mejores padres no nos pudieron tocar.

Dr. Iván. Por su paciencia, tiempo, consejos, regaños y conocimientos compartidos durante este tiempo.

M.C. Carlos. Por sus consejos y valiosas asesorías.

A mis asesores Dra. Lourdes, Dra. Briscia y Dr. José Armando, gracias por su orientación y revisión de este trabajo.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio por hacer de ese lugar que fue mi segunda casa durante estos años un lugar agradable: Gladys, Karina, Cristian, Fabrizia, Xavi, Luzma, "Palomita", Paloma, y Brenda.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización de la Maestría, así como a la UAN y al CBAP por abrirme sus puertas.

A Lliana, gracias por todo tu apoyo y por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas, por tus consejos y hasta los regaños.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología 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 beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario: 418944.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia económica y ecológica del ostión.....	1
1.2. Anatomía, fisiología y ciclo biológico del ostión	2
1.2.1. Anatomía y fisiología.....	2
1.2.1. Ciclo biológico.....	4
1.3. Contaminantes y desarrollo del ostión	5
1.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	5
1.4.1. Biotransformación de PAHs.....	9
1.4.1.1. Naftaleno	10
1.5. Estrés oxidativo y daño celular.....	12
1.5.1. Defensa antioxidante	13
1.5.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)	14
1.5.1.2. Catalasa (CAT).....	14
1.5.1.3. Glutatión peroxidasa (GPx)	15
1.5.2. Daño oxidativo	16
1.5.1. Peroxidación lipídica.....	16
1.5.2. Oxidación de proteínas.....	17
1.5.3. Daño a la membrana celular.....	17
1.6. Exposición PAHs y estrés oxidativo en moluscos	18

2. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Tratamiento de animales.....	22
5.2. Exposición a naftaleno	22
5.3. Preparación y obtención de muestras	23
5.4. Grupo control	23
5.5. Control positivo de oxidación	23
5.6. Determinación de la concentración de proteínas	24
5.7. Concentración de hidroperóxidos lipídicos.....	24
5.8. Oxidación de proteínas	24
5.9. Estabilidad membranal.....	25
5.10. Actividad de catalasa (CAT).....	25
5.11. Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	26
5.12. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	26
5.13. Actividad de glutatión-S transferasa (GST)	26
5.14. Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1. Controles de oxidación.....	28
6.2. Efecto de naftaleno sobre la concentración de proteínas	29
6.3. Efecto de naftaleno sobre la concentración de hidroperóxidos lipídicos	30
6.4. Efecto de naftaleno sobre la concentración de proteínas oxidadas	32

6.5. Efecto de naftaleno sobre la estabilidad membranal.....	32
6.6. Efecto de naftaleno sobre la actividad de enzimas antioxidantes	33
7. CONCLUSIONES.....	42
8. PERSPECTIVAS.....	43
9. BIBLIOGRAFÍA	44
10. ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serie histórica de la producción de ostión (Peso vivo en toneladas 2002-2011).....	2
Tabla 2. Lista de hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor peligro.....	6
Tabla 3. Concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos reportadas en cuerpos de agua de México y otras partes del mundo	7
Tabla 4. Concentraciones de naftaleno reportadas en cuerpos de agua de México y otras partes del mundo.....	8
Tabla 5. Características, propiedades y clasificación del naftaleno.....	12
Tabla 6. Especies reactivas de oxígeno	12
Tabla 7. Diferentes tipos de antioxidantes presentes en las células.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía externa del ostión <i>C. corteziensis</i>	3
Figura 2. Anatomía interna del ostión.....	4
Figura 3. Biotransformación de naftaleno en mamíferos.....	12
Figura 4. Sistema enzimático de defensa antioxidante	15
Figura 5. Concentración de hidroperóxidos lipídicos en tejido de <i>C. corteziensis</i> expuesto durante 24 h a buffer fosfato salino y H ₂ O ₂ al 3 y 9%.....	28
Figura 6. Concentración de proteínas oxidadas en tejido de <i>C. corteziensis</i> expuesto durante 24 h a buffer fosfato salino y H ₂ O ₂ al 3 y 9%.....	28
Figura 7. Concentración de proteínas totales en branquia de <i>C. corteziensis</i>	30
Figura 8. Concentración de proteínas totales en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	30
Figura 9. Concentración de hidroperóxidos lipídicos en branquia de <i>C. corteziensis</i>	30
Figura 10. Concentración de hidroperóxidos lipídicos en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	30
Figura 11. Concentración de proteínas oxidadas en branquia de <i>C. corteziensis</i>	32
Figura 12. Concentración de proteínas oxidadas en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	32
Figura 13. Estabilidad membranál (naftaleno 1.0 µg/L).....	33

Figura 14. Estabilidad membranal (naftaleno 20.0 µg/L).....	33
Figura 15. Actividad de CAT en branquia de <i>C. corteziensis</i>	34
Figura 16. Actividad de CAT en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	34
Figura 17. Actividad de SOD en branquia de <i>C. corteziensis</i>	35
Figura 18. Actividad de SOD en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	35
Figura 19. Actividad de GST en branquia de <i>C. corteziensis</i>	37
Figura 20. Actividad de GST en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	37
Figura 21. Actividad de GPx en branquia de <i>C. corteziensis</i>	38
Figura 22. Actividad de GPx en glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i>	38
Figura 23. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia y glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i> , tras 24 h de exposición a naftaleno (1.0 µg/L)....	39
Figura 24. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia y glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i> , tras 72 h de exposición a naftaleno (1.0 µg/L).....	39
Figura 25. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia y glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i> , tras 24 h de exposición a naftaleno (20.0 µg/L).....	40
Figura 26. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia y glándula digestiva de <i>C. corteziensis</i> , tras 72 h de exposición a naftaleno (20.0 µg/L).....	40

RESUMEN

La ostricultura es una actividad económica importante en México y una de las especies de ostiones más cultivadas en el Pacífico mexicano es *Crassostrea corteziensis*. Las sustancias contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pueden ocasionar estrés oxidativo en los ostiones, lo que afecta la salud de estos organismos y conlleva a una reducción en la productividad ostrícola. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el estrés oxidativo en tejido (branquia y glándula digestiva), así como la estabilidad de la membrana celular de hemocitos de ostiones (*C. corteziensis*) expuestos a naftaleno. Los ostiones (n=20) se expusieron a concentraciones de 1 y 20 µg/L de naftaleno durante 24 y 72 h, posteriormente se determinaron parámetros de estrés oxidativo (niveles de oxidación en lípidos y proteínas, y actividad de enzimas antioxidantes), así como estabilidad de la membrana celular de hemocitos. Los resultados obtenidos sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, naftaleno no induce estrés oxidativo, sin embargo la estabilidad de la membrana celular se redujo significativamente en ostiones expuestos a naftaleno durante 72 h a 20 µg/L. Debido a que no existen reportes del efecto de naftaleno sobre *C. corteziensis*, los resultados obtenidos en el presente estudio pueden representar una primera aproximación al efecto de este xenobiótico sobre esta especie de ostión con importancia económica y ecológica.

ABSTRACT

Oyster farming is an important economic activity in Mexico, and *Crassostrea corteziensis* species is one of the most cultivated oysters in the Mexican Pacific. Pollutants substances, such as polycyclic aromatic hydrocarbons may cause oxidative stress in oysters, which affects the health of these organisms and leads to the productivity reduction of this activity. The aim of this study was to evaluate oxidative stress in tissues (gills and digestive gland) and membrane stability in hemocytes of oyster (*C. corteziensis*) exposed to naphthalene. Oysters ($n=20$) were exposed to naphthalene (1 and 20 $\mu\text{g/L}$) during 24 and 72 h, and oxidative stress parameters (levels of oxidation on lipids and proteins, and antioxidant enzymes activities), as well as, cellular membrane stability in hemocytes were measured. The results obtained suggest that naphthalene, in the experimental condition, does not induced oxidative stress, conversely the membrane stability was reduced significantly in oysters exposed during 72 h at 20 $\mu\text{g/L}$ of naphthalene. Since there are no reports about the effect of naphthalene on *C. corteziensis*, the results obtained in the present study could represent a first scientific approximation of the effect of this xenobiotic on this oyster species, with economic and ecological importance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia económica y ecológica del ostión

Existen alrededor de 100 especies de ostiones, las cuales pertenecen a la familia *Ostreidae* y dentro de ella hay tres géneros principales: *Pycnodonta*, *Ostrea* y *Crassostrea* (Polanco *et al.*, 2002), este último, puede existir en medio marino y también en estuarios donde la carga de sedimentos es alta y la salinidad variable. Las especies más cultivadas de este género a nivel mundial son *Crassostrea gigas*, *C. angulata* y *C. virginica* (Quayle, 1981); sin embargo, en el Pacífico mexicano, principalmente en los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora, también se cultiva y explota de manera comercial *C. corteziensis* (CONAPESCA, 2011), la cual, es una especie nativa con importancia económica y ecológica (Stuardo y Martínez, 1974).

México se encuentra entre los 10 primeros productores de ostiones a nivel mundial (FAO, 2007). A nivel nacional, la ostricultura, por su producción en volumen, ocupa el sexto lugar dentro de todas las actividades pesqueras y el décimo sexto en cuanto a los productos acuícolas de exportación, rubro en el que Estados Unidos es el principal destino. La producción promedio en la década comprendida entre 2002 y 2011 fue de 47,725 ton (Tabla 1) (CONAPESCA, 2011). Sólo en el año 2012, la producción de ostión generó ganancias por \$200,604,540.30 M.N. (CONAPESCA, 2014).

Además de su importancia económica, los ostiones tienen una importancia ecológica, ya que al filtrar el agua de su entorno, contribuyen en la depuración, estabilización del pH y en el incremento de la transparencia de la misma, lo que favorece la penetración de la luz en la columna de agua y por lo tanto la productividad primaria en su ecosistema. Por otra parte, debido a sus características, como el hecho de ser sésiles, alimentarse a base de filtración y tener amplia distribución, los ostiones pueden ser utilizados como indicadores de

contaminación en sistemas acuáticos como bahías, lagunas y esteros (Farrington, 1983; Ávila y Zarazúa, 1993; Belcheva *et al.*, 2011).

Tabla 1. Serie histórica de la producción de ostión en México (Peso vivo en toneladas 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	51,538	50,219	48,293	46,109	46,762	50,294	44,452	43,250	58,716	46,893
VERACRUZ	24,877	24,451	21,653	24,382	21,383	24,198	21,759	19,942	26,328	27,268
TABASCO	20,814	20,705	21,456	16,304	19,600	20,053	17,173	16,171	18,368	12,566
NAYARIT	1,259	763	4	567	905	1,129	1,423	1,416	1,085	2,071
TAMAULIPAS	1,251	1,031	769	863	2,047	1,154	1,214	1,863	1,865	1,479
BAJA CALIFORNIA	306	619	878	969	716	932	1,077	1,005	1,633	1,157
BAJA CALIFORNIA SUR	509	498	817	663	591	737	612	638	816	573
GUERRERO	125	238	-	194	553	549	233	295	417	462
CAMPECHE	1,196	1,009	880	971	687	544	325	317	479	349
OAXACA	122	51	1,270	91	60	138	156	115	54	152
OTRAS*	909	744	585	410	589	1,241	532	488	1,089	282

CONAPESCA, 2011

1.2. Anatomía, fisiología y ciclo biológico del ostión

1.2.1. Anatomía y fisiología

Los ostiones cuentan con dos valvas desiguales (Figura 1), cada una compuesta de tres capas; una interna que es delgada, dura y brillante (nácar); otra exterior también delgada y membranosa, y una capa intermedia que es más gruesa. Las conchas brindan al ostión protección contra depredadores y factores ambientales (Quayle, 1981).

Los ostiones tienen distintos órganos y tejidos (Figura 2), cubiertos por un manto donde se forma la concha, debajo de éste se están localizados los palpos labiales. Además, tienen dos pares de branquias de forma laminar, a través de las cuales se alimentan al crear corrientes mediante cilios; de esta manera el agua llega a las branquias que separan partículas sólidas, nutrientes y captan el oxígeno. El alimento captado por las branquias, se separa de acuerdo a su tamaño, así las partículas más pequeñas son transportadas a los palpos y llevadas a la boca y a la glándula digestiva, donde se encuentra el estilo cristalino que contiene enzimas que ayudan a la digestión del alimento (Quayle, 1989).

El sistema circulatorio de los ostiones está constituido por hemolinfa, que lleva oxígeno y nutrientes a todos los órganos del organismo, en este fluido se encuentran los hemocitos que tienen funciones diversas, tales como, el intercambio de gases, osmorregulación, digestión y distribución de nutrientes, excreción y reparación de heridas, adicional a esto, estas células están encargadas de las funciones esenciales de defensa inmune innata (Bado-Nilles *et al.*, 2008; Hannam *et al.*, 2010).



Figura 1. Anatomía externa del ostión *C. corteziensis* (tomado de Castillo y García, 1984).

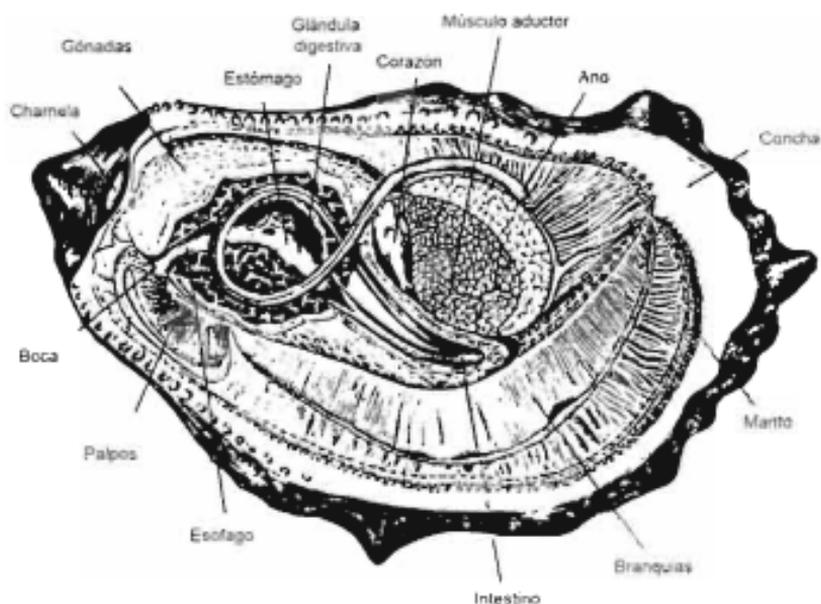


Figura 2. Anatomía interna del ostión (tomada de Thomson, 1954).

1.2.1. Ciclo biológico

Los organismos pertenecientes al género *Crassostrea* presentan sexos separados, llevan a cabo una fertilización externa, arrojan sus gametos al agua donde son fecundados para generar unas larvas planctónicas que desarrollan dos pequeñas conchas y órganos básicos. Hacia el final del periodo larval, el ostión cuenta con dos músculos abductores, un sistema digestivo, varios filamentos branquiales, un pie con el cual puede arrastrarse, un órgano natatorio y un *velum* (Quayle, 1989). Al alcanzar un tercio de milímetro, el ostión busca un sitio donde adherirse, posteriormente una glándula localizada en el pie, segrega una sustancia cementante que se endurece rápidamente y la ostra se fija de por vida a un sustrato sólido donde crecerá hasta alcanzar su tamaño adulto (Quayle, 1981).

1.3. Contaminantes y desarrollo del ostión

Debido a que los ostiones son organismos sésiles y su alimento lo obtienen al filtrar el agua de su medio circundante, son vulnerables a recibir daño por diversos contaminantes como pueden ser plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Los bivalvos en general tienen como una primera respuesta de protección ante contaminantes químicos presentes en el medio, el cierre hermético de sus valvas, lo que los aísla durante varias horas (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007). No obstante, si estas sustancias ingresan al organismo, se incorporan a ciclos metabólicos, lo que puede ocasionar daños fisiológicos y morfológicos, como son: alteraciones histopatológicas, oxidación celular, daño al sistema inmune, afectar la maduración sexual y la capacidad reproductiva (Auffret, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007; Collin *et al.*, 2010).

1.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

Los PAHs son moléculas de dos o más anillos aromáticos fusionados, poseen gran estabilidad molecular y son hidrofóbicos (Kanaly y Harayama, 2000). Se encuentran distribuidos en diversas matrices ambientales como aire, suelo y en cuerpos de agua (Eduok *et al.*, 2010).

Actualmente existen más de 100 diferentes PAHs, sin embargo, en 1995 la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) emitió una lista que considera 17 PAHs, como peligrosos para la salud y los ecosistemas (Tabla 2), debido a que estos poseen propiedades mutagénicas y carcinogénicas (ATSDR, 1995, Díaz *et al.*, 2001; Armendáriz *et al.*, 2006), además, tienden a ser bioacumulables, lo que hace que estos compuestos sean persistentes en organismos y aumenten los riesgos a la salud de los mismos (Borabe *et al.*, 2003; Pichaud, 2008).

Los PAHs se generan principalmente por la quema de combustibles fósiles y material orgánico y pueden ser introducidos al ambiente por vía natural o debido a las actividades antropogénicas (Ramdine *et al.*, 2012). Entre las fuentes naturales destacan la transformación de algunos compuestos orgánicos, biosíntesis, incendios forestales, fugas naturales de petróleo y erupciones volcánicas; en lo que respecta a las fuentes antropogénicas se encuentran el tráfico de embarcaciones y otros vehículos de motor, industrias, plantas generadoras de energía, incineradoras de residuos, combustión doméstica, pintura de barcos, entre otras (Manoli y Samara, 1999). Una vez dentro de los cuerpos de agua, la mayor parte de los PAHs se acumulan en los sedimentos, el resto queda disuelto en el agua donde tiene una mayor biodisponibilidad, la cual a su vez depende de la hidrofobicidad del compuesto, el tipo de sedimento y las características biológicas del organismo (D'Adamo *et al.*, 1997; Soriano, 2009).

Tabla 2. Lista de hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor peligro*

Acenafteno	Benzo[b]fluoranteno	Fluoranteno
Acenaftileno	Benzo[g,h,i]perileno	Ferantileno
Antraceno	Benzo[j]fluoranteno	Fluoreno
Benzo[a]antraceno	Benzo[k]fluoranteno	Indeno[1,2,3-cd]pireno
Benzo[a]pireno	Criseno	Pireno
Benzo[e]pireno	Dibenz[a,h]antraceno	

*Lista emitida por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades en 1995.

La presencia de PAHs en sistemas acuáticos alrededor del mundo ha sido ampliamente descrita, estos contaminantes se han detectado en ríos, estuarios, zonas costeras y lagos, ya sea en el agua, materia suspendida y en sedimentos, así como en los organismos que habitan en estos ecosistemas. Está claro que la concentración de PAHs en ecosistemas acuáticos, se encuentra relacionada con las actividades antropogénicas de cada zona en particular (Baumard *et al.*, 1998; Ngabe *et al.*, 2000; Boonyatumanond *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Maskaoui y Hu, 2009; Guo *et al.*, 2010; Ramdine *et al.*, 2012) (Tabla 3). En México, se ha reportado la presencia de PAHs en diversos cuerpos de agua, tanto del Golfo de México como del Océano Pacífico. Existen evidencias que han señalado que los

niveles de contaminación por PAHs en estas zonas han provocado disminución en la producción acuícola (Botello y Calva, 1998; Botello et al., 2001).

Tabla 3. Concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos reportadas en cuerpos de agua de México y otras partes del mundo

Zona	PAHs Reportados	Matriz	Concentración (IPAH)	Referencia
China	1, 2, 3, 4, 5,	Agua superficial	945.1 - 13448.5 ng/L*	
• Río Dallao	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Materia particulada suspendida	317.5 - 238518.7 ng/g*	Guo et al., 2007
		Sedimento	61.9 - 840.5 ng/g*	
China	1, 2, 3, 4, 5,			
• Costa de Shantou	6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	Sedimentos	884.1 - 13133 ng/g*	Maekawa y Hu, 2009
Francia		Sedimentos	2 - 17 ng/g*	
• Isla Guadeloupe	1	Tejido de ostión	3.2 - 12.5 ng/g*	Randine et al., 2012
Sonora	2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16	Sedimentos	16.8 ng/g	Piazza et al., 2008
Sinaloa				
• Río Culiacán (a)	2, 3, 5, 6, 7,		(a) 63.8 ng/g	
• Mazatlán (b)	8, 10, 11,	Sedimentos	(b) 47 ng/g	Piazza et al., 2008
• Navachiste (c)	12, 13, 15, 16		(c) 61 ng/g	
Nayarit	1		409 ± 208.2 µg/L*	
• Boca de Camichín	7 12	Agua	25.5 ± 13.6 µg/L* 1.13 ± 0.3 µg/L*	Grón-Peret et al., 2013
Oaxaca	2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16	Sedimentos	195 ng/g	Piazza et al., 2008
• Golfo de Tehuantepec				
Oaxaca	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Sedimentos	22 - 6.850 µg/kg*	Salazar-Coria et al., 2010
• Salina Cruz				
Veracruz	2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16	Sedimentos	49.4 ng/g	Piazza et al., 2008
• Laguna Verde				
Veracruz	1, 2, 3, 4, 5,	Sedimentos	(a) 14.79 µg/g (b) 20.97 µg/g (c) 17.92 µg/g	Botello y Calva, 1998
• Pueblo Viejo (a)	6, 7, 8, 9,			
• Tamiahua (b)	10, 11, 12,			
• Tampamachoco (c)	13, 15, 16			

Lagunas de Veracruz	2, 3, 4, 7, 9	Sedimentos	(a) 1.1 – 11.6 ug/g* (b) 0.6 – 12.4 ug/g* (c) 3.6 – 11.3 ug/g* (d) 3.2 – 18.2 ug/g*	Batello et al., 2001
• Salada (a)	8, 11, 12,			
• Llano (b)	13, 15, 16			
• Mancha (c)				
• Mandinga (d)				
Campeche	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9			
• Laguna de Términos	10, 11, 12, 13, 14, 15 16, 17, 18, 19	Tejido de ostión	2470 - 42,500 ng/g*	Noreña-Barroso et al., 1999
Ciudad de México	2, 3, 5, 6, 7,			
• Texcoco (a)	8, 10, 11,	Sedimentos	(a) 95 ng/g (b) 90.7 ng/g (c) 122 ng/g	Piazza et al., 2008
• Chalco (b)	12, 13, 15,			
• Espejo de los Lirios (c)	16			

*Rango de concentraciones detectadas

Código de números: Naftaleno (1), acenafileno (2), acenafieno (3), fenantreno (4), antraceno (5), fluoranteno (6), pireno (7), criseno (8), benzo[a]antraceno (9), benzo[k]fluoranteno (10), benzo[b]fluoranteno (11), benzo[a]pireno (12), indeno (1,2,3-cd)pireno (13), dibenzo[a,h]antraceno (14), benzo[g,h,i]perileno (15), fluoreno (16), bifenilo (17), benzo[e]pireno (18), perileno (19)

Uno de los PAHs, detectado comúnmente en ecosistemas acuáticos es el naftaleno. Este compuesto se ha detectado en agua, materia orgánica suspendida y sedimentos, así como en tejidos de moluscos, particularmente el ostión (Tabla 4).

Tabla 4 Concentraciones de naftaleno reportadas en cuerpos de agua de México y otras partes del mundo

Zona	Matriz	Concentración	Referencia
China	Agua superficial	80.98 ng/L	
• Río Dallao	Matena particulada suspendida	181.58 ng/g	Guo et al., 2007
	Sedimento	7.85 ng/g	
China			
• Costa de Shantou	Sedimentos	5.7 ng/g	Maskaoui y Hu 2009
Francia			
• Isla Guadeloupe	Sedimentos	2 – 9.7 ng/g *	Ramdine et al., 2012
	Tejido de ostión	0.9 – 4.6 ng/g*	
Oaxaca, México			
• San Pedro (a)	Sedimentos	(a) 3.6 ug/g (b) 1.25 ug/g	Salazar-Cana et al., 2007
• Estero Piedra (b)			

• Laguna superior (c)		(c) 2.6–1.3 µg/g	
Oaxaca, México Salina Cruz	Sedimentos	42.5 - 60 µg/kg*	Salazar-Coria <i>et al.</i> , 2010
Nayarit, México • Boca de Camichín	Agua	409 ± 208.2 µg/L*	Girón-Pérez <i>et al.</i> , 2013
Campeche, México • Laguna de Términos	Tejido de ostrón	117 - 281 ng/g *	Nereña-Barroso <i>et al.</i> , 1988
	Agua	0 - 152 ng/g	
Edo. de México • Lago Tecomulco	Sedimentos	2.155 mg/kg	Romo-Gómez <i>et al.</i> , 2012

*Rango de concentraciones detectadas.

1.4.1. Biotransformación de PAHs

Debido a que los PAHs son altamente hidrofóbicos tienden a acumularse en los organismos, principalmente en los tejidos que contienen más grasa. Para su eliminación requieren de una biotransformación con la finalidad de aumentar su polaridad y transformarlos así en metabolitos más hidrosolubles y por lo tanto más fáciles de excretar, sin embargo, durante la biotransformación de estos compuestos, se pueden generar metabolitos más tóxicos que el compuesto original (Kanaly y Harayama, 2000; Klassen y Watkins, 2001).

La biotransformación de estos compuestos requiere de enzimas, tales como epóxido hidrolasa, cuya inducción está altamente relacionada con la del citocromo P-450 (CYP 450), seguido de la glutatión s-transferasa (GST), la cual da como resultado la formación de ácido mercaptúrico, los que son excretados por orina o forman conjugados que pueden ser eliminados por bilis (Timbrell, 1985; Klassen y Watkins, 2001; Mastandrea *et al.*, 2005).

Aunque se tiene documentada la presencia varias familias de CYP 450 en ostones, el metabolismo de los PAHs en moluscos no ha sido completamente descrito (Zanette *et al.*, 2010). Los bivalvos comparados con el resto de los invertebrados, debido a su naturaleza sésil, acumulan mayores niveles de hidrocarburos en sus tejidos, los cuales se incorporan a través de difusión pasiva e ingesta de partículas en suspensión (Iniasta y Blanco, 2005). Los PAHs se bioacumulan en las zonas con mayor concentración de lípidos, como glándula digestiva, intestino y gónadas (Widdows *et al.*, 1983; Frouin *et al.*, 2007). La eliminación de este tipo de compuestos depende del tiempo de exposición, concentración del hidrocarburo, metabolismo del organismo y del peso molecular del compuesto, un ejemplo de esto último, es la tasa de eliminación del benzo[a]pireno, la cual es más lenta en comparación con la de naftaleno (Iniasta y Blanco, 2005). La vida media de naftaleno está en función del tejido donde se encuentra depositado; por ejemplo en branquia de *Mytilus edulis*, este compuesto tiene una vida media de 2.2 días, mientras que en glándula digestiva se ha reportado una vida media de 5.1 días (Widdows *et al.*, 1983).

1.4.1.1. Naftaleno

El naftaleno está formado por la fusión de dos anillos de benceno (Tabla 5), es un componente natural de alquitrán de hulla y del petróleo, de donde deriva la mayor parte de su presencia en el ambiente. Otra fuente importante son los incendios forestales y la combustión de madera. El naftaleno es utilizado como intermediario en la producción de plastificantes, resinas e insecticidas, lo que conlleva a su presencia en efluentes industriales (IARC, 2002). De esta manera, el naftaleno ha sido identificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la ATSDR como una sustancia comúnmente encontrada en sitios de desechos peligrosos e incluido en la Lista de Prioridades Nacionales (NPL) en Estados Unidos (IARC, 2002).

La mayor parte del naftaleno que se incorpora al ambiente se descarga en el aire (resultado principalmente de la combustión) de donde ingresa al suelo y agua por deposición húmeda o seca. Al poseer sólo dos anillos aromáticos y un bajo peso molecular, el naftaleno comparado con otros PAHs tiene una mayor solubilidad en agua ($\log Kow$ 3.30), por lo que tiene una mayor biodisponibilidad para los organismos de este medio (Iniesta y Blanco, 2005). Una vez en el agua puede ser degradado por fotólisis; algunos estudios reportan que en agua superficial este fenómeno tarda 71 h, mientras que a profundidades mayores de 500 m, puede tardar cerca de dos años; este compuesto también puede ser degradado por procesos biológicos en suelos en un periodo aproximado de 3 meses y medio (IARC, 2002).

Tabla 5. Características, propiedades y clasificación del naftaleno

Estructura química		Punto de ebullición	217.9 °C
Formula química	C ₁₀ H ₈	Punto de fusión	80.2 °C
Masa molecular	128.17	Densidad	1.162 g/cm ³
log Kow	3.30	Solubilidad en agua	31–34 mg/L a 25 °C
		Clasificación IARC	2B

Agencia internacional para investigación del cáncer, 2002

Una vez dentro de los organismos, el naftaleno, puede ser biotransformado en un epóxido durante las reacciones de fase 1 por acción de un CYP 450, este epóxido se conjuga con glutatión por acción de la GST, seguido de esto, pierde el ácido glutámico, reacción llevada a cabo por gama glutamil-transpeptidasa, después, por acción de la cistinil glicinasa, se elimina la glicina y queda únicamente un conjugado con cisteína que al final por la *n*-acetil transferasa, se acetila y da como resultado un derivado de ácido mercaptúrico que será excretado por orina (Figura 3) (Timbrell, 1985).

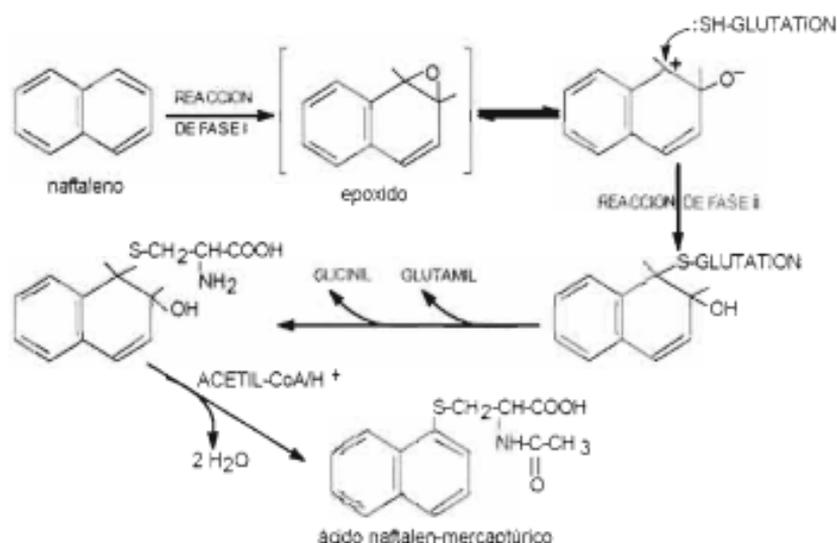


Figura 3. Biotransformación de naftaleno en mamíferos (Timbrell, 1985).

1.5. Estrés oxidativo y daño celular

El término estrés oxidativo hace referencia a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tabla 6) y los sistemas antioxidantes de un organismo para eliminar o neutralizar estas moléculas, lo que impide un potencial daño oxidativo en la célula (Regoli *et al.*, 2002)

Tabla 6. Especies reactivas de oxígeno

Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Alcoxilo ($LO\cdot$)	Hidroperóxidos de alquilo ($LOOH$)
Hidroperóxido ($HOO\cdot$)	Oxígeno siglete (1O_2)
Peroxilo ($LOO\cdot$)	Ozono (O_3)
Hidroxilo ($\cdot OH$)	

Hermes-Lima, 2005

Las ROS son producidas a niveles basales de manera normal en los organismos, como subproductos del metabolismo de xenobióticos o generados por células fagocíticas, así como producto de reacciones enzimáticas y radiólisis (Livingstone, 2001; Manduzio, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006; Regoli y Giuliani, 2013).

Al incrementar la producción de ROS o existir deficiencias en el sistema de defensa antioxidante, estas moléculas pueden reaccionar con componentes celulares, lo que puede provocar estrés oxidativo y posteriormente causar daño a macromoléculas, incluidos lípidos, proteínas y ADN (Valavanidis *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2007;).

1.5.1. Defensa antioxidante

En las células existen antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático (Tabla 7), entre los cuales destacan vitaminas, como la vitamina E (α – tocoferol), la cual actúa en las membranas celulares al reaccionar con electrones desapareados de las ROS, lo que previene la propagación de la peroxidación lipídica. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos, destaca también el glutatión reducido (GSH), molécula abundante en el citosol y capaz de neutralizar directamente a ROS, lo que genera glutatión oxidado (GSSH) (Hermes-Lima, 2005; Mayor-Oxilia, 2010; Regoli y Giuliani, 2013).

Tabla. 7. Diferentes tipos de antioxidantes presentes en las células

Enzimáticos	No enzimáticos
Catalasa (CAT)	Vitamina E
Superóxido dismutasa (SOD)	Vitamina C
Glutatión peroxidasa (GPx)	Betacaroteno
	Glutatión (GSH)

Mayor-Oxilia, 2010.

La defensa antioxidante llevada a cabo mediante enzimas, es más específica que la realizada por mecanismos no enzimáticos, ya que estas últimas pueden actuar

sobre varios ROS, mientras que las enzimas lo hacen sobre sustratos específicos (Regoli y Giuliani, 2013), dentro de las principales enzimas antioxidantes destacan la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

1.5.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) tiene cuatro variantes: la Mn-SOD localizada en mitocondria, dos formas de Cu/Zn-SOD encontradas en citosol, cloroplastos y peroxisomas, y la Fe-SOD reportada en bacterias y cloroplastos (Hermes-Lima, 2005). Bajo condiciones de estrés oxidativo es común detectar incrementos en la actividad de esta enzima (Hermes-Lima, 2005). La reacción llevada a cabo por SOD es la eliminación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), lo que protege de su nocivo efecto y genera como resultado la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una molécula altamente reactiva y nociva dentro del entorno celular (Figura 4) (Regoli y Giuliani, 2013).

1.5.1.2. Catalasa (CAT)

La enzima catalasa (EC 1.11.1.6), es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza, se encuentra presente en la mayoría de los organismos, su distribución dentro de ellos varía de acuerdo al tipo de tejido. Dentro de las células, la CAT se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas y en menor medida en mitocondrias. Esta enzima posee una alta capacidad de reacción, su función principal es la descomposición de H_2O_2 en oxígeno molecular y agua (Figura 4) (Céspedes *et al.*, 1996; Regoli y Giuliani, 2013).

La CAT es tan eficiente que no puede ser saturada por H_2O_2 en cualquier concentración (Lledías *et al.*, 1998). Se ha sugerido que esta enzima es más efectiva cuando las concentraciones de H_2O_2 son altamente elevadas (Hermes-Lima, 2005). Además de su función como antioxidante, CAT está relacionada con

la respuesta inmune, ya que participa en procesos inflamatorios (Zhang *et al.*, 2011).

1.5.1.3. Glutación peroxidasa (GPx)

Glutación peroxidasa (E.C. 1.11.1.9) es una enzima selenio dependiente con cuatro diferentes formas con funciones muy similares. El sustrato de esta enzima es H_2O_2 , molécula que es neutralizada a través de la oxidación de GSH a GSSG. Se ha sugerido que cuando los incrementos de H_2O_2 son más pequeños, GPx funciona mejor que CAT; cataliza, además la descomposición de algunos hidroperóxidos orgánicos como LOOH con la oxidación de GSH a GSSG (Figura 4) (Hermes-Lima, 2005; Regoli y Giuliani, 2013).

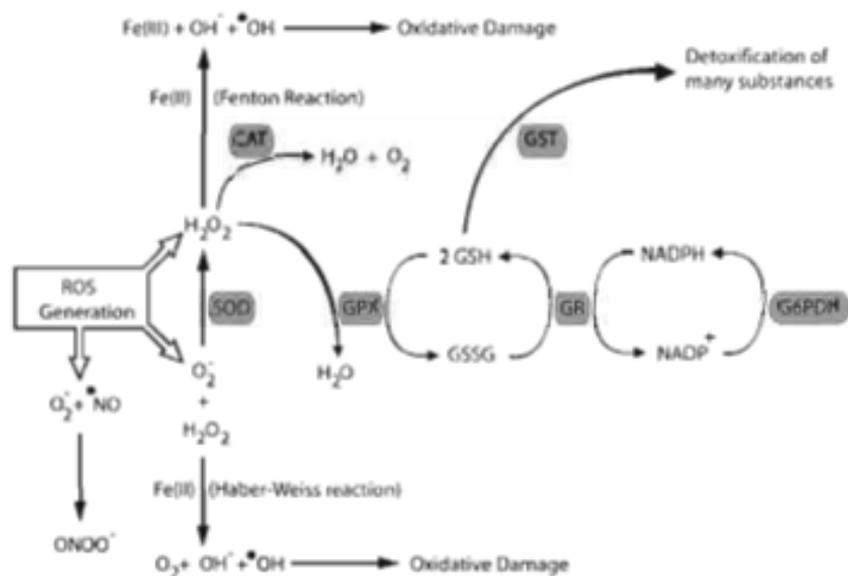


Figura 4 Sistema enzimático de defensa antioxidante (Hermes-Lima, 2005). SOD [Superóxido dismutasa], CAT (Catalasa), GPx [Glutación peroxidasa], GST (Glutación s-transferasa), GR [Glutación reductasa], G6PDH [Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa]

1.5.2. Daño oxidativo

El desbalance entre producción de ROS y la capacidad del sistema de defensa antioxidante puede ocasionar daño a macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ADN (Valavanidis *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2007).

1.5.1. Peroxidación lipídica

El proceso de peroxidación lipídica se lleva a cabo en las membranas de las estructuras celulares, se trata de una reacción en cadena llevada a cabo por oxidantes fuertes, catalizada por metales de transición, lo que provoca una ruptura sobre los fosfolípidos membranales. El proceso consta de tres etapas (Hermes-Lima, 2005; Alves *et al.*, 2007):

1. **Iniciación:** El primer paso es la abstracción de un átomo de hidrógeno del grupo metilo de un ácido graso poliinsaturado (PUFA), dando como resultado la formación de un radical lipídico ($L\cdot$) que reacciona rápidamente con oxígeno molecular (O_2) debido a su inestabilidad, formando un lípido peroxilo radical ($LOO\cdot$).
2. **Propagación:** $LOO\cdot$ remueve un hidrógeno de otro lípido, lo que genera un hidroperóxido lipídico ($LOOH\cdot$) y un nuevo $L\cdot$, el cual puede reaccionar con O_2 y forma nuevamente $LOO\cdot$ y así, una reacción en cadena.
3. **Terminación:** El proceso de peroxidación lipídica finaliza cuando $L\cdot$ o $LOO\cdot$ es interceptado por un antioxidante o con la reacción de dos radicales lipídicos para formar una especie no radical.

El proceso de peroxidación lipídica es considerado el mayor causante de daño y muerte celular (Hermes-Lima, 2005).

1.5.2. Oxidación de proteínas

La disminución en los sistemas de defensa antioxidante y el aumento en la producción de ROS pueden causar la oxidación proteica. Las proteínas pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. La oxidación de proteínas puede ser reversible o irreversible, esta última se da por cuatro mecanismos: carbonilación, ruptura de enlaces peptídicos, nitración y formación de enlaces proteína-proteína, provocadas por la reacción de proteínas con ROS. Los daños a las proteínas pueden ocasionar inhibición de enzimas, desnaturalización y la degradación de proteínas (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006). Existen pocos mecanismos para la protección de las proteínas contra la oxidación o reparación del daño. Las proteínas dañadas son degradadas por proteasas, lo que previene de la acumulación de proteínas con mal funcionamiento, los aminoácidos no oxidados, entonces, son reutilizados para la biosíntesis de nuevas proteínas (Hermes-Lima, 2005).

1.5.3. Daño a la membrana celular

La membrana celular es una estructura que define los límites de la célula, su función más importante es la de mantener un equilibrio entre el medio intra y extracelular, su característica principal es su permeabilidad selectiva, lo que le permite seleccionar las moléculas que entran y salen de su interior. Está formada principalmente por lípidos (fosfolípidos, glicolípidos y esteroides) y proteínas (integrales, periféricas y ancladas a lípidos) (Becker *et al.*, 2007). La oxidación de las moléculas que componen la membrana celular (principalmente lípidos y proteínas) pueden ocasionar niveles de daño que van desde la reducción de la fluidez de la membrana, hasta la pérdida completa de la estabilidad membranar (Hermes-Lima, 2005).

1.6. Exposición PAHs y estrés oxidativo en moluscos

Los niveles de contaminantes en el ambiente acuático han aumentado debido a las actividades antropogénicas, de esta manera, los organismos acuáticos, como los moluscos bivalvos pueden ser afectados por sustancias derivadas de este tipo de actividades, que sumadas a fluctuaciones naturales de variables ambientales como salinidad, disponibilidad de alimento, oxígeno y exposición a la luz, pueden provocar estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006; Belcheva *et al.*, 2011).

Producto de esta contaminación, existen diversos estudios que evidencian la presencia de PAHs en moluscos. Para el ostión *C. corteziensis*, se reportó una concentración de 13.19 $\mu\text{g/g}$ de hidrocarburos (Botello *et al.*, 2002), mientras que para *C. virginica* el rango de PAHs encontrado fue de 2470 - 42,500 ng/g (Noreña-Barroso *et al.*, 1999) y para la especie *C. rhizophorae* se ha detectado en un rango que va de 3.2 a 12.5 ng/g (Ramdine *et al.*, 2012). Existe una estrecha relación entre las condiciones ambientales y la generación de ROS en los organismos. Se ha reportado que la exposición a PAHs puede inducir un aumento en la tasa de ROS en las células, lo que puede provocar estrés y daño oxidativo a macromoléculas de tejidos (Livingstone *et al.*, 1992; Manduzio, 2005; Pichaud *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de ostiones es una actividad acuícola importante en México y la especie *Crassostrea corteziensis* es una de las más cultivadas en el Pacífico mexicano. Sin embargo, existen diversos contaminantes, como los PAHs que pueden acumularse en los tejidos del organismo, lo que puede provocar riesgos a la salud del molusco, afectar el desarrollo del ostión, reducir la producción y de esta forma generar pérdidas económicas.

Uno de los PAHs más abundantes en ecosistemas acuáticos es el naftaleno, sin embargo, hasta el momento, no existen estudios donde se evalúe el efecto de este compuesto sobre parámetros fisiológicos del ostión *C. corteziensis*, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la exposición a naftaleno sobre el estrés oxidativo de esta especie, una especie endémica del Pacífico tropical oriental.

3. HIPÓTESIS

La exposición de *Crassostrea corteziensis* a naftaleno provoca una desregulación en la actividad de enzimas de defensa antioxidante e induce daño oxidativo en los tejidos este molusco.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el estrés oxidativo en branquias y glándula digestiva del ostión *Crassostrea corteziensis* expuesto de forma subaguda a naftaleno.

Objetivos particulares

Cuantificar en branquias y glándula digestiva de *C. corteziensis* la concentración total de proteínas membranal tras la exposición a concentraciones subletales de naftaleno.

Determinar en branquias y glándula digestiva de *C. corteziensis* la concentración de hidroperóxidos lipídicos y la oxidación de proteínas, provocadas por la exposición a concentraciones subletales de naftaleno.

Determinar en hemocitos de ostión *C. corteziensis* la estabilidad membranal tras la exposición a concentraciones subletales de naftaleno.

Determinar en branquias y glándula digestiva de *C. corteziensis* la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, tras la exposición a concentraciones subletales de naftaleno.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Tratamiento de animales

Se instaló un sistema de recirculación de agua en el laboratorio conformado por tanques de plástico interconectados, para mantener un volumen de 50 L de agua con flujo continuo de 150 mL/min. En este sistema, se colocaron ostiones ($n=10$) de la especie *C. corteziensis* con talla y peso promedio de 7.5 ± 0.9 cm largo, 5.3 ± 1.4 cm ancho y 59 ± 7.4 g, respectivamente, estos organismos fueron comprados en un establecimiento comercial el mismo día de su colecta en la zona estuarina de Boca de Camichín. Los especímenes se colocaron dentro del sistema de recirculación durante 30 días, con el objetivo de ser aclimatados a las condiciones de laboratorio y favorecer la depuración de sustancias contenidas en los organismos.

Los ostiones se mantuvieron en agua de mar filtrada, diluida con agua dulce purificada hasta obtener una salinidad de 28 unidades prácticas de salinidad (ups), el pH durante el experimento se mantuvo en un rango de 7.5 – 8.5 y la temperatura promedio fue de 27°C. Los ostiones se conservaron a temperatura ambiente y se alimentaron diariamente con alga espirulina comercial en polvo (0.1 g por cada 10 organismos), además de esto, se realizaron recambios de una tercera parte del volumen total del agua cada tercer día, para favorecer la depuración de sustancias adquiridas en su entorno natural.

5.2. Exposición a naftaleno

Previo a la exposición a naftaleno, los ostiones se extrajeron del sistema de recirculación y se colocaron en peceras de vidrio con un volumen de agua de 5 L (salinidad de 28 ups y pH 7.5 – 8.5). Bajo estas condiciones, los ostiones ($n=20$), fueron expuestos de forma subaguda (24 y 72 h) a naftaleno (1 y 20 $\mu\text{g/L}$) (Sigma-Aldrich $\geq 99\%$ de pureza) disuelto en acetona (Fermont, grado reactivo 99.7% de

pureza), 1:20 w/v. En el caso de los ostiones expuestos durante 72 h se realizaron recambios totales de agua cada 24 h, y se agregó nuevamente la misma concentración del hidrocarburo.

5.3. Preparación y obtención de muestras

Pasado el tiempo de exposición al hidrocarburo, los ostiones se desconcharon y se obtuvo de cada ostión, 0.4 g de cada tejido a analizar (branquias y glándula digestiva). Las muestras de tejido se depositaron en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) para su homogenización mecánicamente durante 1 min a 20,000 rpm.

Para realizar las pruebas de actividad enzimática y concentración de proteínas oxidadas, un fragmento del homogeneizado se centrifugó a 9,000 rpm durante 20 min. Mientras que para la determinación de hidroperóxidos lipídicos, se homogenizó el tejido con metanol frío (1:9 w/v) y se centrifugó a 1,000 xg (3600 rpm) durante 15 min a 4°C. Por otra parte, para la determinación de la estabilidad membranal, se realizó la extracción de hemolinfa de la región posterior del músculo aductor de cada ostión.

5.4. Grupo control

Adicional a los ostiones expuestos a naftaleno, se contó con dos grupos control, el primero (C), formado por ostiones que se mantuvieron en agua de mar filtrada, y el segundo (A), por ostiones mantenidos en agua de mar filtrada a los cuales se agregó además acetona (el mismo volumen utilizado para disolver el hidrocarburo).

5.5. Control positivo de oxidación

Como control positivo de daño oxidativo, muestras de tejido (branquia y glándula digestiva), se expusieron a H₂O₂ (3 y 9%) durante 24 h. Posteriormente, se

determinó en cada muestra la concentración de proteínas e hidroperóxidos lipídicos.

5.6. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los tejidos, se tomaron 10 μL de la muestra homogeneizada, volumen que se colocó en un pozo de una microplaca y se agregó 190 μL del reactivo de Bradford. La mezcla se incubó durante 15 min y se determinó la absorbancia a 545 nm (Bradford, 1976). Los resultados fueron interpolados en una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) (Anexo 1).

5.7. Concentración de hidroperóxidos lipídicos

Este parámetro se determinó mediante la técnica descrita por Zanette *et al.*, (2006) y Monserrat *et al.* (2003) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reactivos (400 μL de FeSO_4 a 0.25 mM, 400 μL de H_2SO_4 a 25 mM, y 100 mL de xileno orange a 0.1 mM) y se incubó durante 30 min. Posteriormente se agregaron 100 μL del sobrenadante de la muestra homogeneizada. La mezcla resultante, se incubó a temperatura ambiente durante 18 h en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó su absorbancia a 550 nm contra una curva estándar de hidroperóxido de cumeno (Anexo 2).

5.8. Oxidación de proteínas

Para determinar este parámetro se tomaron 100 μL de la fracción centrifugada, la cual se precipitó con 200 μL de ácido tricloro acético (TCA) al 30% con agitación lenta y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se desechó. A la fracción precipitada se agregó 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (20 mM en etanol). La mezcla se incubó en oscuridad durante 1 h, con agitación cada 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se precipitó con 200 μL de TCA al 30% y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 5 min. Posterior a esto se realizaron tres lavados con etanol-etilacetato (1:1 v/v) y se centrifugó a 3000 rpm entre cada lavado, finalmente se desechó el sobrenadante y el precipitado fue disuelto con

1000 μL de urea 6 mM e incubado durante 1 h a 37°C en baño maría. La concentración de proteínas oxidadas se determinó a 366 nm y se calculó mediante el coeficiente de extinción molar (22 mM/cm) (Reznick y Packer, 1994). La concentración de proteínas oxidadas fue ajustada de acuerdo a la concentración total de proteínas de la muestra.

5.9. Estabilidad membranal

La determinación de la estabilidad membranal de los hemocitos se realizó mediante la medición de retención del rojo neutro (Canty *et al.*, 2007; Hannam *et al.*, 2009). Se incubaron 50 μL de hemolinfa en un micropozo durante 45 min a 4°C y se realizó un lavado con solución salina para eliminar las células no adheridas, posteriormente se agregaron 200 μL de rojo neutro (0.004%) y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se lavó con 200 μL de solución salina y se agregaron 200 μL de etanol acidificado (1% ácido acético y 20% etanol), se agitó durante 10 min y se determinó su absorbancia a 545 nm. Se determinó la concentración de proteínas y los resultados se presentan como densidad óptica por mg de proteína.

5.10. Actividad de catalasa (CAT)

La medición de la actividad de CAT se realizó de acuerdo a Radi *et al.* (1991). Se mezclaron 20 μL del centrifugado con 1000 μL buffer (0.3 M sacarosa, 1 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 200 μL de H_2O_2 en una celda de cuarzo. Se determinó la absorbancia a 240 nm cada 30 s durante 120 s, posteriormente se determinó la diferencia de absorbancia entre los tiempos (Anexo 3). La actividad enzimática se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción molar 0.0093 mM/cm. Los resultados se corrigieron considerando la concentración de proteínas en cada muestra.

5.11. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Para determinar la actividad de SOD se tomaron 20 μL del centrifugado y se mezclaron con 800 μL de buffer (50 mM de NaHCO_3 y 0.1 mM de EDTA). Posteriormente, se agregaron 10 μL de NADH 0.03 M. Se determinó la absorbancia a 340 nm cada 30 s durante 120 s (Anexo 4) y se calculó la actividad enzimática mediante el coeficiente de extinción molar de 6.22 mM/cm. Los resultados se corrigieron considerando la concentración de proteínas en cada muestra (Misra y Fridovich, 1972).

5.12. Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx se determinó mezclando 20 μL del sobrenadante con 800 μL de buffer (50 mM de fosfato de potasio pH 7.0; 2.5 mM de GSH, 1.0 mM de NaNO_3), posteriormente se agregó 1U de glutatión reductasa (GR) y se adicionaron 10 μL de NADH y 20 μL de H_2O_2 40 mM. Se determinó la absorbancia a 340 nm cada 30 s hasta 120 s (Anexo 4), y se calculó la actividad enzimática mediante el coeficiente de extinción molar de 6.22 mM/cm. Los resultados se corrigieron por la concentración de proteínas en cada muestra (Ansaldo *et al.*, 2007).

5.13. Actividad de glutatión-S transferasa (GST)

La determinación de la actividad de GST se realizó a partir de 100 μL del homogeneizado, al cual se agregaron 150 μL de TRIS-HCl pH 7.4 (0.5 mM), 20 μL de GSH 100 mM y 5 μL de diclorometano. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 h. Se adicionaron 165 μL de TCA al 20% y se agitó en vortex. Se incubó nuevamente a temperatura ambiente, durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Se tomaron 200 μL del sobrenadante y se le agregaron 600 μL de agua destilada y 200 μL del reactivo de Nash (88 μL de ácido acético, 62 μL de acetilacetona, 4.6 g de acetato de amonio y 10 mL de

agua). Se incubaron a 60°C durante 30 min, posteriormente se enfrió en baño de hielo y se registraron las absorbancias a 414 nm cada 30 s hasta 120 s (Anexo 3). La actividad enzimática se calculó mediante el coeficiente de extinción molar 9.6 mM/cm. Los resultados se corrigieron por la concentración de proteínas en cada muestra (Warholm *et al.*, 1994)

5.14. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Sigma Stat 3.5. En cada serie de datos se determinó la distribución normal. Los datos paramétricos se compararon a través de ANOVA de una vía, mientras que los datos no paramétricos se compararon a través de Kruskal-Wallis, como subpruebas se utilizaron las pruebas de Bonferroni y Tukey, respectivamente. Como valor de significancia se tomó $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la literatura científica existen numerosos estudios que evalúan el efecto de distintos PAHs (de manera individual o en mezclas) sobre el estrés oxidativo en diversas especies de moluscos bivalvos; sin embargo, no existen hasta el momento estudios publicados donde se evalúe el efecto de naftaleno sobre el estrés oxidativo en la especie de ostión *C. corteziensis*, una especie nativa del Pacífico tropical oriental, que además de su importancia ecológica, es explotada comercialmente en México, por lo cual este trabajo constituye una primera aproximación sobre el efecto de este hidrocarburo en esta especie de ostión.

6.1. Controles de oxidación

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados para evaluar el efecto de H_2O_2 sobre el daño oxidativo en tejidos de ostión (control positivo), indican que en los tejidos expuestos a este agente oxidante a una concentración del 9%, en los lípidos tisulares aumentó significativamente el grado de oxidación (Figura 5), mientras que la concentración de proteínas oxidadas no aumentó significativamente, aunque sí se observó una tendencia al incremento de este parámetro (Figura 6). En los tejidos expuestos a una concentración de 3% de H_2O_2 , no se observó incremento significativo en la oxidación de estas biomoléculas, comparadas con los grupos control.

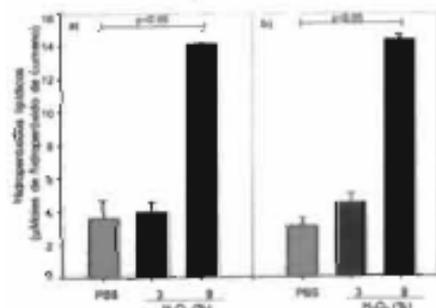


Figura 6. Concentración de hidroperóxidos típicos en tejido de *C. corteziensis* expuesto durante 24 h a buffer fosfato salino y H_2O_2 al 3 y 9%. (a) branquia, (b) glándula digestiva ($\bar{X} \pm EE$)

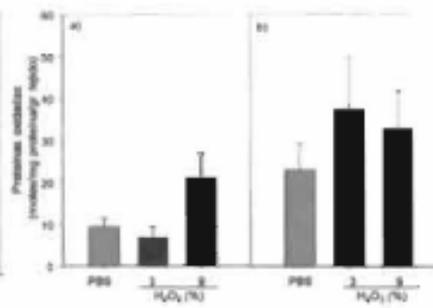


Figura 5. Concentración de proteínas oxidadas en tejido de *C. corteziensis* expuesto durante 24 h a buffer fosfato salino y H_2O_2 al 3 y 9%. (a) branquia, (b) glándula digestiva ($\bar{X} \pm EE$)

Los resultados obtenidos sugieren que los tejidos de ostiones tienen cierto grado de resistencia *per se* a los agentes oxidantes, ya que el H_2O_2 a una concentración del 3% no indujo incremento en la oxidación de las biomoléculas. Sin embargo, para evaluar el grado de resistencia es necesario realizar estudios comparativos con otros agentes oxidantes, otras especies de moluscos así como con diferentes concentraciones de H_2O_2 .

La diferencia en el grado de oxidación detectado en lípidos y proteínas de tejidos expuestos a H_2O_2 al 9%, está relacionado a la estructura de los dos tipos de moléculas, ya que los dobles enlaces presentes en las estructuras lipídicas confieren a éstas mayor susceptibilidad a la oxidación, en contraste con las proteínas que son moléculas más estables, además existen algunos mecanismos de reparación de proteínas, como la reparación de puentes disulfuro en cisteínas y la formación de sulfóxidos en metioninas (Hermes-Lima 2005; Díaz-Acosta 2006).

6.2. Efecto de naftaleno sobre la concentración de proteínas

En lo que respecta a la concentración de proteínas evaluada en los ostiones expuestos a naftaleno, no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control, lo que indica que el naftaleno en las condiciones evaluadas, no afecta la concentración de estas biomoléculas. La concentración promedio de proteínas en branquia, para todos los grupos fue de 3.07 ± 1.02 mg/L (Figura 7), mientras que en glándula digestiva fue de 3.96 ± 1.32 mg/mL (Figura 8).

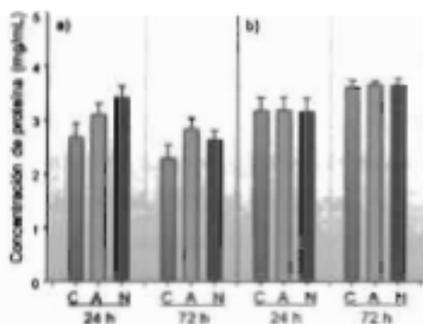


Figura 7 Concentración de proteínas totales en branquia de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno $\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

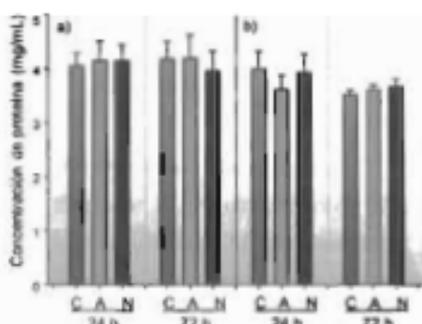


Figura 8 Concentración de proteínas totales en glándula digestiva de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno $\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

6.3. Efecto de naftaleno sobre la concentración de hidroperóxidos lipídicos

Por otra parte, tras la exposición de los ostiones a naftaleno (1 y 20 µg/L, durante 24 y 72 h), no se detectó diferencia significativa en la concentración de hidroperóxidos lipídicos presentes en branquia (Figura 9) y glándula digestiva (Figura 10) con respecto al grupo control.

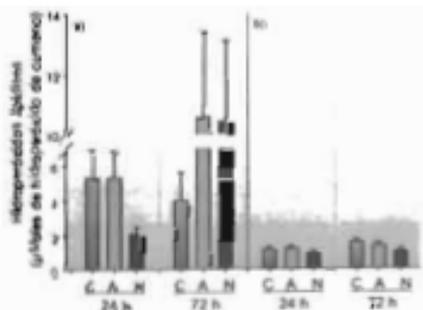


Figura 9 Concentración de hidroperóxidos lipídicos en branquia de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

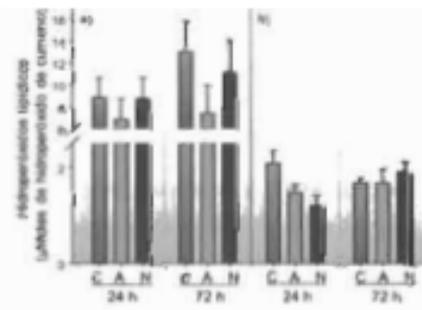


Figura 10 Concentración de hidroperóxidos lipídicos en glándula digestiva de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado en el ostión *Crassostrea brasiliana* al ser expuesto a diesel (2.5, 5, 10 y 20%) durante 96 h, donde no se encontraron cambios significativos en la oxidación de lípidos presentes en branquia y glándula digestiva (Lüchmann *et al.*, 2011). Por su parte Pichaud *et al.* (2008), reportaron resultados similares al exponer bivalvo *Mya arenaria* a una mezcla de PAHs (metilfenantreno, naftaleno, 2-metilnaftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, pireno y fluoranteno) a una concentración de 47.6 ng/L aplicada a través del consumo de fitoplancton durante 9 días.

Contario a lo descrito en el párrafo anterior, se ha reportado que la exposición de *Mytilus galloprovincialis* a benzo[a]pireno durante 7 días, provocó un aumento en la peroxidación lipídica en branquia (Maria y Bebianno, 2011). Mientras que la exposición del molusco *Pecten maximus* a concentraciones subletales de fenantreno (50, 100 y 200 µg/L) provocó un aumento de los niveles de peroxidación lipídica en hemolinfa (Hannam *et al.*, 2010). Ansaldo *et al.*, (2005) después de exponer al molusco *Nacella concinna* a diesel (0, 0.05 y 0.1%) durante 24, 48 y 168 h, detectaron un aumento significativo en la concentración de lípidos oxidados con diesel en ambas concentraciones después de 168 h de exposición.

Además del potencial efecto pro-oxidante que pueden tener los PAHs sobre los moluscos, existen factores ambientales que pueden modular el daño oxidativo. En experimentos realizados con *C. gigas* expuesto a diesel (0.01, 0.1 y 1.0 mL/L), en diferentes condiciones de salinidad (35, 25, 15 y 9 ups), se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones, excepto para la salinidad de 25 ups (Zanette *et al.*, 2011). En el presente trabajo, la salinidad establecida para la realización de los bioensayos fue de 28 ups, factor que pudo haber influido en el potencial oxidativo de naftaleno.

6.4. Efecto de naftaleno sobre la concentración de proteínas oxidadas

En lo que respecta a la concentración de proteínas oxidadas en branquias y glándula digestiva, en el presente trabajo no se observaron cambios significativos entre los ostiones expuestos a naftaleno (1 y 20 $\mu\text{g/L}$) respecto a los grupos control, en ninguno de los dos tiempos de exposición probados (Figura 11 y 12).

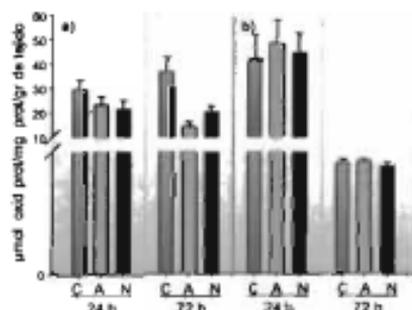


Figura 11. Concentración de proteínas oxidadas en branquia de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 $\mu\text{g/L}$, b) naftaleno 20.0 $\mu\text{g/L}$. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm \text{EE}$). $p > 0.05$

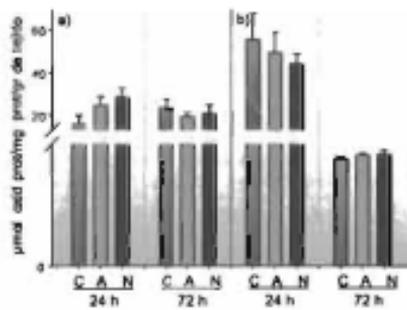


Figura 12. Concentración de proteínas oxidadas en glándula digestiva de *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 $\mu\text{g/L}$, b) naftaleno 20.0 $\mu\text{g/L}$. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm \text{EE}$). $p > 0.05$

Por su parte Ansaldo *et al.* (2005) detectaron un aumento significativo de proteínas oxidadas al exponer a *N. concinna* a diesel al 0.05% durante 168 h.

6.5. Efecto de naftaleno sobre la estabilidad membranal

En lo que respecta a la estabilidad membranal en hemocitos de *C. corteziensis* expuestos a 1 $\mu\text{g/L}$ de naftaleno durante 24 y 72 h, no se observó alteración en este parámetro (Figura 13). Sin embargo, a 20 $\mu\text{g/L}$ por 72 h, se observó una disminución significativa en la estabilidad de la membrana de los hemocitos (Figura 14 b).

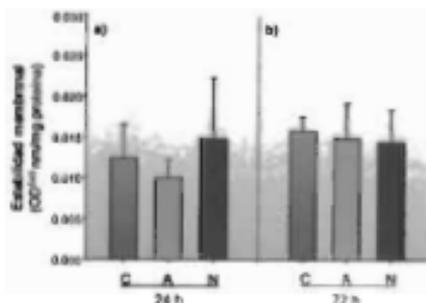


Figura 13. Estabilidad membranial a) naftaleno 1.0 µg/L, 24 h, b) naftaleno 1.0 µg/L, 72 h. A= control agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$.

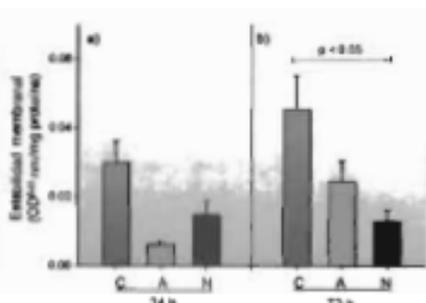


Figura 14. Estabilidad membranial a) naftaleno 20.0 µg/L, 24 h, b) naftaleno 20.0 µg/L, 72 h. C = Control, agua de mar filtrada, A= control agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p < 0.05$.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hannam *et al.* (2010) al exponer a vieiras de la especie *P. maximus* a concentraciones subletales de fenantreno (50, 100 y 200 µg/L), quienes reportan una reducción de la estabilidad de la membrana celular. Por su parte, Anton en 2011, también reportó desestabilización en membranas lisosomales de hemocitos de *Pinctada imbricata*, posterior a la exposición (durante 7 días) a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos a una concentración del 20%.

Uno de los posibles mecanismos a través de los cuales el naftaleno puede alterar la estructura de la bicapa lipídica y proteínas membranales, es a través de la inducción de ROS, moléculas que pueden alterar las funciones biológicas de la membrana y ocasionar daño celular (Bagchi *et al.*, 1998; de la Haba *et al.*, 2013).

6.6. Efecto de naftaleno sobre la actividad de enzimas antioxidantes

En lo que respecta al efecto de naftaleno sobre la actividad de enzimas antioxidantes, en el presente estudio, los ostiones expuestos al hidrocarburo no mostraron diferencias significativas en la actividad de CAT en ninguno de los dos tejidos con respecto a los grupos control (Figuras 15 y 16)

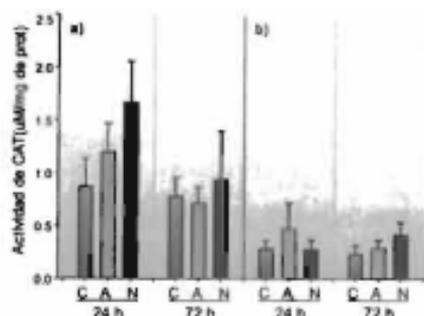


Figura 15. Actividad de CAT en branquia de *C. corteziensis*. a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

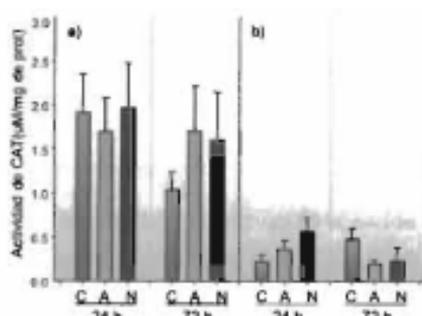


Figura 16. Actividad de CAT en glándula digestiva *C. corteziensis*. a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

Resultados similares se han reportado en otras especies del género *Crassostrea*. En un estudio publicado por Zanette *et al.* (2011), se observó que al exponer a *C. gigas* a diesel (0.01, 0.1 y 1 mL/L) no se alteró la actividad de CAT. Por su parte, Lúchmann *et al.* (2011), reportaron resultados similares en la especie *C. brasiliana* expuesta a diesel al 2.5, 5, 10 y 20 % durante 96 h. Sin embargo, en otras especies de moluscos bivalvos, como *M. galloprovincialis* se ha reportado que la exposición a benzo[a]pireno, durante 48 h, induce un incremento en la actividad de CAT (Banni *et al.*, 2010), lo que podría estar relacionado con el potencial oxidante de cada PAHs, así como de la resistencia individual de las especies de molusco.

Otros estudios realizados en almejas de la especie *M. arenaria*, expuestas a una mezcla de PAHs (47.6 ng/L) (metilfenantreno, naftaleno, 2-metilnaftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, pireno y fluoranteno), aplicada a través del consumo de fitoplancton durante 9 días, indicaron que la actividad de esta enzima no se alteró significativamente (Pichaud *et al.*, 2008). Sin embargo, la exposición directa (15 días) de la mezcla de hidrocarburos sobre este molusco, provocó alteraciones significativas en la actividad de CAT en almejas macho, mientras que en hembras, no se alteró la actividad de esta enzima, lo que sugiere que la actividad de enzimas antioxidantes está influenciada por factores

hormonales de estos moluscos. Particularmente, se ha reportado que la producción de testosterona y la etapa reproductiva de este tipo de organismos, influye en la sensibilidad de los organismos al daño oxidativo provocado por los contaminantes (Frouin *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la actividad de SOD, no se alteró significativamente en los ostiones expuestos a naftaleno, en ninguno de los dos tejidos con respecto al grupo control (Figura 17 y 18).

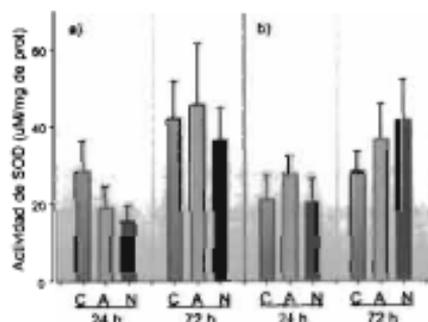


Figura 17. Actividad de SOD en branquia *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

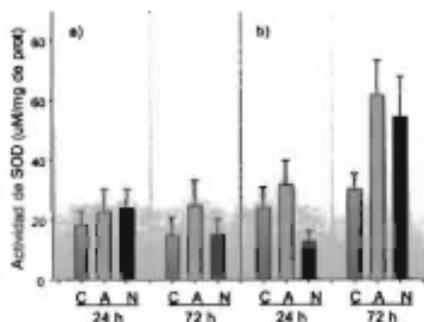


Figura 18. Actividad de SOD en glándula digestiva *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$) $p > 0.05$

Estos resultados son similares a los reportados por Luchmann *et al.* (2011), quienes al evaluar la actividad de SOD en branquia de *C. brasiliana* expuesto a diesel durante 96 h, no observaron cambios significativos en este parámetro, sin embargo, en glándula digestiva detectaron un aumento significativo en la actividad de esta enzima al exponer a diesel al 10 y 20%. En otro estudio realizado por Ansaldo *et al.* (2005), detectaron un aumento significativo en SOD en glándula digestiva de *N. concinna* después de su exposición a diesel al 0.05 % a las 48 h.

El realizar estudios *in vivo* bajo condiciones controladas de un laboratorio permite descartar el efecto de otros contaminantes presentes en el ambiente sobre las variables de estudio, así como también se elimina el efecto de fluctuaciones en los

factores abióticos. En este sentido, se puede mencionar como ejemplo, el efecto de la variación estacional sobre la actividad de CAT y SOD en la especie *M. galloprovincialis* y *Crassostrea* sp; ya que se ha observado que estas enzimas tienen una mayor actividad en verano en comparación con la temporada invernal, lo cual indica la sensibilidad de estos parámetros a las variaciones del clima, lo que afecta en ocasiones en mayor medida que los niveles de contaminación (Orbea et al., 2002). Adicional a esto, existe evidencia que incluso factores geográficos como la latitud pueden generar diferentes respuestas de biomarcadores en ostiones de la misma especie (Zanette et al., 2006).

Además de la influencia de los factores ambientales, organismos de diferentes especies, aun del mismo género, pueden generar distintas reacciones al ser expuestos a contaminantes en condiciones idénticas. Por ejemplo, en la exposición *in situ* de *C. gigas* y *C. rhizophorae* a descargas domésticas, se han observado diferentes respuestas en enzimas antioxidantes, siendo *C. rhizophorae* la especie que mostró mayores cambios en la actividad de CAT, lo que sugiere que esta especie puede ser un mejor organismo bioindicador (Zanette et al., 2008).

Asimismo, se ha relacionado a los PAHs presentes en los ecosistemas con el estrés oxidativo de los moluscos. Un monitoreo realizado en el estuario Hooghly, India, demostró que en ostiones *Saccostrea cucullata*, la concentración de PAHs en el agua, tiene una estrecha correlación con la actividad de CAT y SOD, ya que se observó un aumento significativo respecto a un sitio de referencia no contaminado (Niyogi et al., 2001). Sin embargo, dada la complejidad debida al número de variables presentes en un ecosistema, no siempre es posible encontrar correlaciones entre contaminantes presentes en los ecosistemas y biomarcadores. Por ejemplo, en un estudio realizado en el estero Boca de Camichín se detectaron niveles de PAHs en el área de la zona de cultivo del ostión, no obstante, no se observó correlación entre el nivel de estos contaminantes y las alteraciones en los

parámetros de estrés oxidativo de ostiones de la especie *C. corteziensis* (Ibarra-Guzmán, 2012).

Por otra parte, en lo que respecta a la actividad de GST evaluada en el presente estudio, los ostiones expuestos a naftaleno no mostraron diferencias significativas en la actividad de la enzima, con respecto a los grupos control (Figura 19 y 20).

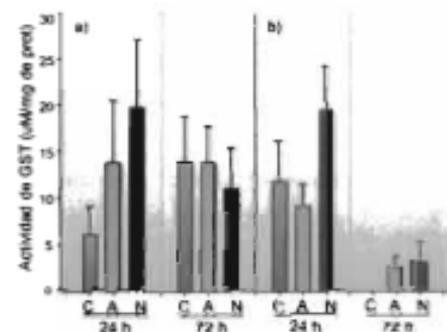


Figura 19. Actividad de GST en branquia *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control; agua de mar filtrada, A= Control; agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$). $p > 0.05$

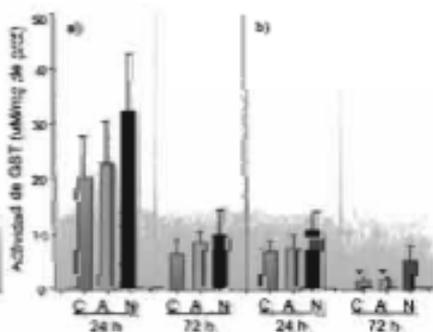


Figura 20. Actividad de GST en glándula digestiva *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 µg/L, b) naftaleno 20.0 µg/L. C = Control; agua de mar filtrada, A= Control; agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm EE$). $p > 0.05$

Ansaldi *et al.* (2005) reportaron resultados similares al exponer al molusco *N. concinna* a diesel a 0.05 y 0.1%, durante 168 h de exposición sin detectar cambios significativos en la actividad de esta enzima.

En contraste con estos resultados, Lüchmann *et al.* (2011), al exponer a *C. brasiliana* a diesel al 10 y 20 % por 96 h detectaron alteraciones en la actividad de GST en glándula digestiva. Por otro lado, al exponer a *C. gigas* a diesel (0.01, 0.1 y 1 mL/L), en diferentes condiciones de salinidad (35, 25, 15 y 9 ups), se observaron cambios en la actividad de GST en ostiones expuestos a 0.1 y 1 mL/L de esta sustancia a una salinidad de 25 ups (Zanette *et al.*, 2011).

La enzima GST presenta respuestas variables, de esta forma al monitorear la actividad de esta enzima, en *M. galloprovincialis* obtenidos de tres sitios mar

diferentes grados de contaminación por PAHs (alto, moderado y bajo), no se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática entre los moluscos de los sitios muestreados, no obstante que la concentración de PAHs en tejido de los organismos en cada punto de muestreo fue de 56.05, 32.72 y 14.05 ng/g, respectivamente (Trisciani *et al.*, 2012).

Al igual que con el resto de las enzimas evaluadas en este estudio, un comportamiento similar se observó en GPx, ya que al exponer a *C. corteziensis* a naftaleno en las diferentes condiciones evaluadas, no se registraron cambios significativos en su actividad con respecto al grupo control (Figura 21 y 22) en ninguno de los dos tejidos evaluados.

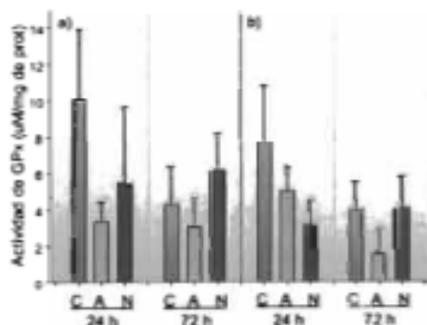


Figura 21. Actividad de GPx en branquia *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 $\mu\text{g/L}$, b) naftaleno 20.0 $\mu\text{g/L}$. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm \text{EE}$). $p > 0.05$

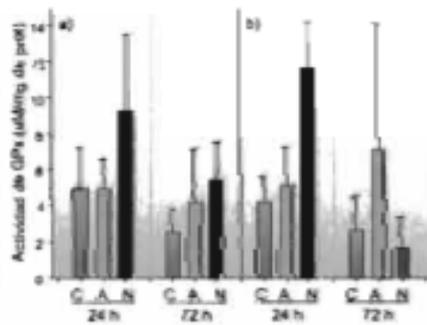


Figura 22. Actividad de GPx en glándula digestiva *C. corteziensis*, a) naftaleno 1.0 $\mu\text{g/L}$, b) naftaleno 20.0 $\mu\text{g/L}$. C = Control, agua de mar filtrada, A= Control, agua de mar filtrada + acetona, N= Naftaleno ($\bar{X} \pm \text{EE}$). $p > 0.05$

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por Luchmann *et al.* (2011), al exponer a *C. brasiliana* a diesel (2.5, 5, 10 y 20 %) durante 96 h, ya que no detectaron cambios significativos en la actividad de GPx presente en glándula digestiva y branquia de este molusco. Contrario a esto, Ansaldo *et al.*, (2005) encontraron aumentos significativos en la actividad de esta enzima en branquia de *N. concinna* al exponer a diesel al 0.1%, durante 168 h.

Con el objetivo de representar el efecto de naftaleno sobre todos los parámetros y condiciones evaluadas, se analizó una Respuesta de Biomarcadores Integrada (RBI). Los resultados mostraron tendencias similares para ambos tejidos en cada una de las concentraciones y tiempos de exposición. Además, como se muestra, no se observó una respuesta significativa diferente en los parámetros entre los grupos de ostiones expuestos al hidrocarburo respecto a los grupos control (Figura 23, 24, 25 y 26).

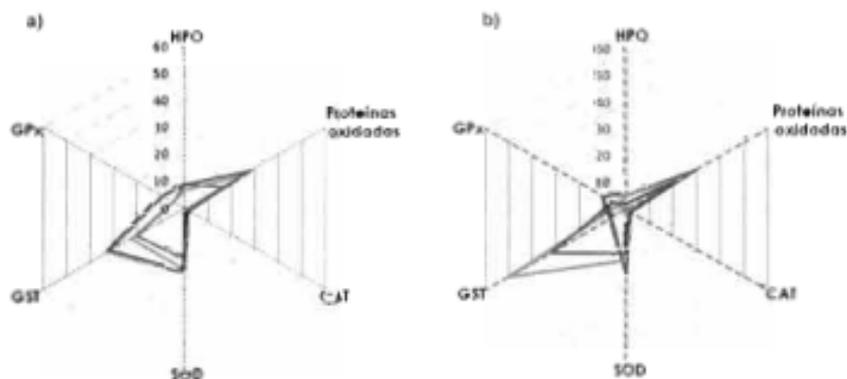


Figura 23. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia (a) y glándula digestiva (b) de *C. corteziensis*, después de 24 h de exposición a naftaleno (1.0 µg/L), control agua de mar filtrada —, control agua de mar filtrada + acetona ····, naftaleno —·—·—.

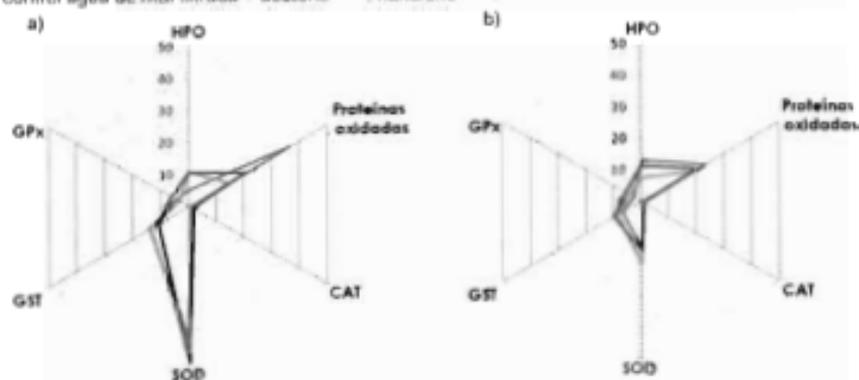


Figura 24. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia (a) y glándula digestiva (b) de *C. corteziensis*, después de 72 h de exposición a naftaleno (1.0 µg/L), control agua de mar filtrada —, control agua de mar filtrada + acetona ····, naftaleno —·—·—.

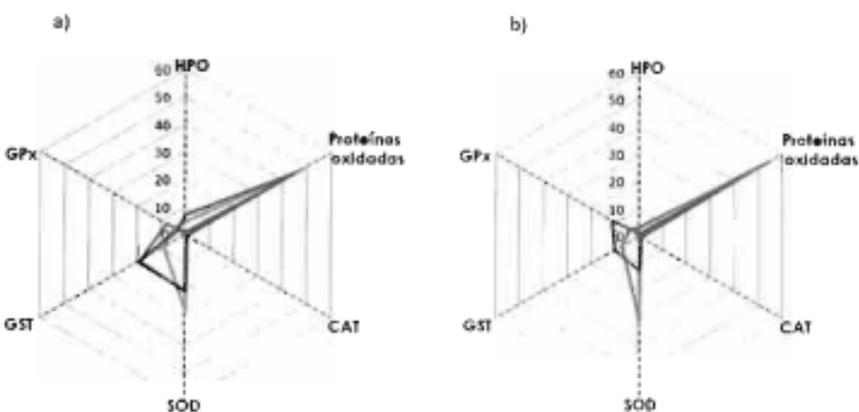


Figura 25. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia (a) y glándula digestiva (b) de *C. corteziensis*, después de 24 h de exposición a naftaleno (20.0 µg/L), control agua de mar filtrada —, control agua de mar filtrada + acetona - - -, naftaleno ···.

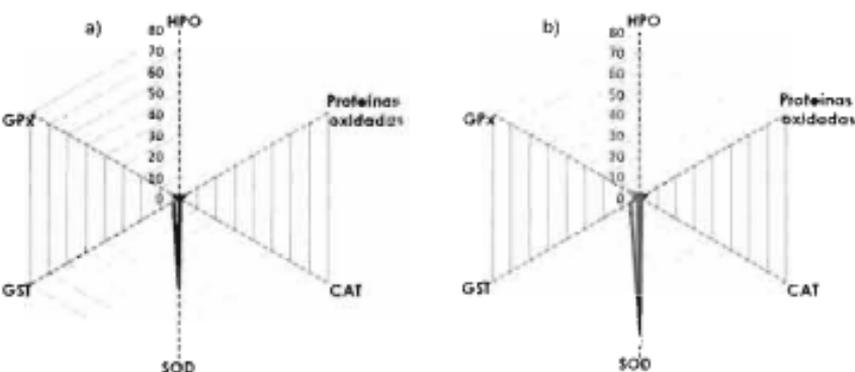


Figura 26. Respuesta de biomarcadores integrada, branquia (a) y glándula digestiva (b) de *C. corteziensis*, después de 72 h de exposición a naftaleno (20.0 µg/L), control agua de mar filtrada —, control agua de mar filtrada + acetona - - -, naftaleno ···.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que bajo las condiciones evaluadas, el naftaleno no induce estrés oxidativo sobre *C. corteziensis*. Sin embargo, esta resistencia al estrés oxidativo pudo ser influenciada por algunos factores, entre ellos las concentraciones probadas de naftaleno, los tiempos establecidos para los bioensayos y/o la resistencia de la especie de ostión de interés empleada en los bioensayos.

De los parámetros evaluados en el presente trabajo, la estabilidad membranal, parece ser un biomarcador más sensible al efecto de este tipo de contaminantes, ya que este parámetro se alteró significativamente en hemocitos de ostiones expuestos a 20 µg/L de naftaleno durante 72 h, mientras que el resto de los parámetros no se alteraron de manera significativa en los ostiones expuestos al hidrocarburo respecto a los ostiones control.

Hasta el momento, no existen estudios publicados acerca del efecto de naftaleno sobre la respuesta oxidante en el género *Crassostrea*. Este es el primer trabajo de investigación acerca del efecto de este hidrocarburo sobre la especie de ostión *C. corteziensis*. De esta manera, los resultados obtenidos constituyen una primera aproximación acerca del efecto del naftaleno sobre esta especie endémica de ostión, los resultados sugieren que el naftaleno en comparación con otros hidrocarburos, tiene un bajo potencial de daño sobre parámetros oxidativos, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía.

Por otra parte, para conocer el grado de resistencia de esta especie al efecto de contaminantes, es necesario realizar estudios comparativos entre especies de ostiones, lo que permitiría conocer la susceptibilidad de cada una a un xenobiótico en particular.

7. CONCLUSIONES

Los niveles de proteínas en branquia y glándula digestiva del ostión *Crassostrea corteziensis* no son afectados por la exposición a naftaleno bajo las condiciones evaluadas.

La exposición a naftaleno a las concentraciones y tiempos probados no induce daño oxidativo a nivel de lípidos y proteínas, tanto en branquia como glándula digestiva de *C. corteziensis*.

La exposición a naftaleno a 20.0 µg/L durante 72 h provoca pérdida de la estabilidad membranal en *C. corteziensis*.

El naftaleno en las condiciones probadas no altera la actividad de las enzimas antioxidantes evaluadas (CAT, SOD, GPx y GST) en el ostión *C. corteziensis*.

8. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, y no obstante que no se observó inducción de estrés oxidativo en los moluscos expuestos a naftaleno, se sugiere aumentar el rango de concentraciones del hidrocarburo y tiempos de los bioensayos.

Por otra parte, se recomienda realizar bioensayos con distintos PAHs que han sido detectados en las zonas de cultivo de ostión, sobre la respuesta antioxidante y daño oxidativo en *C. corteziensis*.

Además, sería importante realizar estudios comparativos de estrés oxidativo diferentes especies de ostión, para determinar así la diferencia en el grado de resistencia a este tipo de contaminantes.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, E., A. Dias, Melo, L., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L. F., Machado, G. C. C., Manso, P. F., Ronsein, G. E., Sigolo, C. A., Barbosa, B. C., Gracioso, M. A. M., Gennari, M. M. H., Di Mascio, P. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 588–600.
- Ansaldo, M., Najle, R., Luquet, C. M. (2005). Oxidative stress generated by diesel seawater contamination in the digestive gland of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Marine Environmental Research* 59(4): 381-390.
- Ansaldo, M., Sacristán, H., Wider, E. (2007). Does starvation influence the antioxidant status of the digestive gland of *Nacella concinna* in experimental conditions? *comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146(1-2): 118-123.
- Anton, M. M. J. (2011). Parámetros citológicos, inmunológicos y estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo *Pinctada imbricata* expuesto a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela 38 pp.
- Armendáriz, R. C., Álvarez, M. R., Hardisson, A. (2006). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en productos de la pesca: revisión. *Revista de toxicología* 23: 1-6.
- ATSDR (1995). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Department of Health and

Human Services, Public Health Service. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=122&tid=25> [Consultado en septiembre de 2012].

Auffret, M. (2005). Bivalves as Models for Marine Immunotoxicology. Investigative Immunotoxicology: Models & Approaches in Immunotoxicology. CRC Press, Boca Ratón 29-48 pp.

Ávila, P. P., Zarazúa G. O. (1993). Concentración de metales pesados en ostiones (*Crassostrea virginica* Gmelin), del canal El Chijol, Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental* 9(2): 53-64.

Bado-Nilles, A., Gagnaire B., Thoma-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, Y. (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.

Bagchi, M., Bagchi, D., Balmoori, J., Ye, X., Stohs, S. J. (1998). Naphthalene-Induced Oxidative Stress and DNA Damage in Cultured Macrophage J774A.1 Cells. *Free Radical Biology and Medicine* 25(2): 137-143.

Banni, M., A. Negri, Dagnino, A., Jebali, J., Ameur, S., Bousseta, H. (2010). Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(5): 842-848.

Baqueiro-Cárdenas, E. R., Borabe, L. J., Goldaracena-Islas, C. G., Rodríguez-Navarro, J. (2007). Los moluscos y la contaminación. Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 1S- 7S.

- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J. C., Burgeot, T., Beffecq, J. (1998). Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36(12): 951-960.
- Becker, W., M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. (2007). *El mundo de la célula* (Sexta ed.). Madrid: Pearson Educación, S. A.
- Belcheva, N., Zakhartsev M., Dovzhenko, N., Zhukovskaya, A., Kavun, V., Chelomin, V. (2011). Anthropogenic pollution stimulates oxidative stress in soft tissues of mussel *Crangomylus grayanus* (Dunker 1853). *Ocean Science Journal* 46(2): 85-94.
- Borabe, L., Sericano, J. L., Garcia-Munillo, A., Carrillo-Romo, F. J. (2003). Biomonitoring de Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares en el sistema estuarino-lagunar del río Pánuco, México. Instituto Politécnico Nacional 8 pp.
- 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(8): 942-956.
- Botello, A. V., Calva B. L. G. (1998). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua, and Tampamachoco Lagoons in the Southern Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60(1): 98-103.
- Botello, A. V., Calva B. L. G., Ponce, V. G. (2001). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Coastal Lagoons of Veracruz State, Gulf

of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67(6): 889-897.

Botello, A. V., García-Ruelas, C., Ponce-Velez, G. (2002). PAH Levels in Bivalve Mollusks from the Mexican Subtropical Pacific. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69(4): 486-493.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Castillo, R. Z. G., García-Cubas, A. (1984). Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. <http://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1986-2/articulo230.html> [Consultado en diciembre de 2013]

Canty, M. N., Hagger, J. A., Moore, R. T. B., Cooper, L., Galloway, T. S. (2007). Sublethal impact of short term exposure to the organophosphate pesticide azamethiphos in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 54(4): 396-402.

Céspedes, M. E. M., Hernández, L. I., López, J. N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001996000200001&nrm=iso [Consultado en enero de 2014]

Collin, H., Meistertzheim, A., David, E., Moraga, D., Boutet, I. (2010). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *The Journal of Experimental Biology* 123: 4010-4017.

- CONAPESCA (2011). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario>. 33. 73 pp [Consultado en julio de 2013]
- CONAPESCA (2014). Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Consulta específica por especie. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_pr oduccion [Consultado en febrero de 2014]
- D'Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P., Sansone, G. (1997). Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56(1-2): 45-49.
- de la Haba, C., Palacio, J. R., Martínez, P., Morros, A. (2013). Effect of oxidative stress on plasma membrane fluidity of THP-1 induced macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828 (2): 357-364
- Díaz-Acosta, A. E., Membrillo-Hernández, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas* 9(1): 34-44.
- Díaz, M. N. E., Alfaro, B. J., Garza, U. H. (2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL* 4: 420-425.
- Eduok, S. I., Ebong, G. A., Udoinyang, E. P., Njoku, J. N., Eyen, E. A. (2010). Bacteriological and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Mangrove Oyster (*Crassostrea tulipa*) from Douglas Creek, Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition* 9(1): 35-42.



- FAO (2007). Food and Agriculture Organization. The state of world fisheries and aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 180 pp.
- FAO. (2013). Food and Agriculture Organization. Vision general del sector acuicola nacional, México. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es [Consultado en septiembre de 2013].
- Farrington, J. W., Goldberg, E. D., Risebrough, F. W., Martin, J. H., Bower, V. T. (1983). U.S. "Mussel Watch" 1976-1978: an overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environmental Science & Technology* 17(8): 490-496.
- Frouin, H., Pellerin, J., Fournier, M., Pelletier, E., Richard, P., Pichaud, N., Rouleau, C., Garnerot, F. (2007). Physiological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on soft-shell clam *Mya arenaria*. *Aquatic Toxicology* 82(2): 120-134.
- Girón-Pérez, M. I., Romero-Bañuelos, C. A., Toledo-Ibarra, G. A., Rojas-García, A. E., Medina-Díaz, I. M., Robledo-Marenco, M. L., 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: Molecular & Integrative Physiology* 165(4): 476-482.
- Gomez, A. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel hemocytes. *Toxicology in vitro* 17: 539-546.

- Guo, J., Wu, F., Luo, X., Liang, Z., Liao, H., Zhang, R., Li, W., Zhao, X., Chen, S., Mai, B. (2010). Anthropogenic input of polycyclic aromatic hydrocarbons into five lakes in Western China. *Environmental Pollution* 158(6): 2175-2180.
- Guo, W., He, M., Yang, Z., Lin, C., Quan, X., Wang, H. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere* 68(1): 93-104.
- Hannam, M. L., Bamber, S. D., Galloway, T. S., John Moody, A., Jones, M. B. (2010). Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78(7): 779-784.
- Hannam, M. L., Bamber, S. D., Sundt, R. C., Galloway, T. S. (2009). Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. *Environmental Pollution* 157(6): 1939-1944.
- Hermes-Lima, M. (2005). *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism*, John Wiley & Sons, Inc. 319-368 pp.
- IARC (2002). International Agency for Research on Cancer. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene, and styrene*, World Health Organization 82: 590.
- Ibarra-Guzmán, C. (2012). Evaluación del daño oxidativo en ostión *Crassostrea corteziensis* y determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el estero Boca de Camichín, Nayarit. Tesis en Licenciatura en Químico farmacobiólogo, Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, Nayarit, Mexico. 42 pp.

- Iniesta, R., Blanco, J. (2005). Bioacumulación de hidrocarburos y metales asociados a vertidos accidentales en especies de interés comercial de Galicia. *Galician Journal of Marine Resources* 2: 200.
- Kanaly, R. A., S. Harayama (2000) Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology* 182: 2059-2067.
- Klassen, D. C., Watkins, J. B. (2001). Disposición de tóxicos. In Mc. Graw. Hill, *Manual de toxicología* 5 edición, 87 - 150
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42(8): 656-666.
- Livingstone, D. R., Lips, F., Martinez, P. G., Pipe, R. K. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112(2): 265-276.
- Lizárraga, M. (2011). Técnicas aplicadas en el cultivo de moluscos en América Latina. *La Acuicultura en América Latina*. <http://www.fao.org/docrep/005/AC867S/AC867S08.htm> [Consultado en mayo 2011]
- Lledías, F., Rangef, P., Hansberg, W. (1998). Oxidation of Catalase by Singlet Oxygen. *Journal of biological chemistry* 273(17): 10630-10637.
- Lüchmann, K. H., Mattos, J. J., Siebert, M. N., Granucci, N., Dorrington, T. S., Bicego, M. C., Taniguchi, S., Sasaki, S., Daura-Jorge, F. G., Bairy, A. C. D. (2011). Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the

mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquatic Toxicology* 105(3-4): 652-660.

- Manduzio, H. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal* 2(2): 91-104.
- Manoli, E., Samara, C. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 18(6): 417-428.
- Maria, V. L., Bebianno, M. J. (2011). Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154(1): 56-63.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím Clínica Latinoamericana* 39(1): 27-36
- Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 5(2): 23-29.
- Maskaoui, K., Hu, Z. (2009). Contamination and Ecotoxicology risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Shantou Coastal Waters, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82(2): 172-178.
- Misra, H. P., Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of biological chemistry* 247: 6960-6962.
- Monserrat, J. M., Geracitano, L. A., Pinho, L., Vinagre T. M. (2003). Determination of Lipid Peroxides in Invertebrates Tissues Using the Fe(III) Xylenol Orange

Complex Formation. *Archives of environmental contamination and toxicology* 45: 177-183.

- Ngabe, B., Bidleman, T. F., Scott, G. I. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in storm runoff from urban and coastal South Carolina. *Science of The Total Environment* 255(1-3): 1-9.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A. G. (2001). Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Science of The Total Environment* 281(1-3) 237-246.
- Noreña-Barroso, E., Gold-Bouchot, G., Zapata-Pérez, O., Sericano, J. L. (1999). Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in American Oysters *Crassostrea virginica* from the Terminos Lagoon, Campeche, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 38(8): 637-645.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M. P. (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Pientzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology* 58 (1-2): 75-98
- Piazza, R., Ruiz-Fernández, A., Frignani, M., Zangrando, R., Bellucci, L., Moret, I., Páez-Osuna, F. (2008). PCBs and PAHs in surficial sediments from aquatic environments of Mexico City and the coastal states of Sonora, Sinaloa, Oaxaca and Veracruz (Mexico). *Environmental Geology* 54(7): 1537-1545.
- Pichaud, N., Pellerin, J., Fournier, M., Gauthier-Clerc, S., Pascal, R. (2008). Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*. *Chemistry Central Journal* 2(1): 23-23

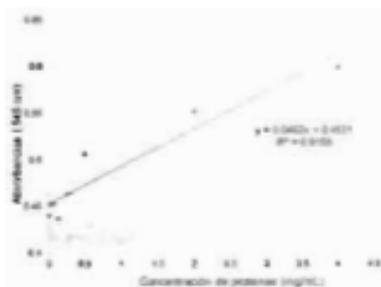
- Polanco, T., Guerra, A., Díaz, O., Ledesma, B. (2002). Impulso, Desarrollo y Potenciación de la Ostricultura en España. *Fundación Alfonso Martín Escudero*. 350 pp.
- Quayle, D. B. (1981). Ostras tropicales: cultivo y métodos. Ottawa, Ont. 80 pp.
- Quayle, D. B. (1989). Farming Bivalve Molluscs: Methods for Study and Development (Vol. 1). Canada. 294 pp.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., Freeman, B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of biological chemistry* 266 22028-22034.
- 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(0): 80-89.
- Regoli, F., Giuliani, M. E. (2013). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G. W. (2002). Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54(3-5): 419-423.
- Reznick, A., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*. P. Lester, Academic Press, Volume 233. 357-363 pp.

- Rodríguez, A., Arellano, J., González, M., Blasco, J., Sarasquete, C. (2005). Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*. *Ciencias marinas* 31: 455-456.
- Romo-Gómez, C., Monks, S., Pulido-Flores, G., Gordillo-Martínez, A. J. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial water and sediment of lake Tecocomulco, Mexico. *Interciencia* 35(12): 905-911.
- Salazar-Coria, L., Amezcua-Allien, M. A., Tenorio-Torres, M., González-Macias, C. (2007). Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and metal evaluation after a diesel spill in Oaxaca, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79(4): 462-467.
- Soriano, S. J. A. (2009). Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y cantábrico, antes y después del vertido del b/t prestige. Tesis en Doctor en Química, Universidade da Coruña. 323 pp.
- Stuardo, J., Martínez, A. (1974). Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* herlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. *Anales del centro de ciencias del mar y limnología* 2, 89-130
- Timbrell, J. A. (1985). *Principles of biochemical toxicology*. London, UK, Taylor & Francis.
- Thomson, J. M. (1954). *Handbook for Oyster-farmers*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia. 19 pp.

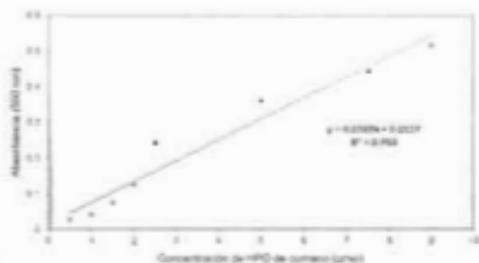
- Trisciani, A., Perra, G., Caruso, T., Focardi, S., Corsi, I. (2012). Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. *Marine Environmental Research* 79(0): 29-36.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2): 178-189.
- Warholm, M., Alexandrie, A. K., Högberg, J., Sigvardsson, K., Rannug, A. (1994). Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood. *Pharmacogenetics* 4(6): 307-311.
- Widdows, J., Moore, S. L., Clarke, K. R., Donkin, P. (1983). Uptake, tissue distribution and elimination of [1-14C] naphthalene in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 76(2): 109-114.
- Zanette, J., de Almeida, E. A., da Silva, A. Z., Guzenski, J., Ferreira, J. F., Di Mascio, P., Freire, M. M. R., Bairy, A. C. D. (2011). Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Science of The Total Environment* 409(10): 1976-1983.
- Zanette, J., Goldstone, J., Bairy, A., Stegeman, J. (2010). Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Marine Environmental Research* 69(0): S1-S3

- Zanette, J., Monserrat, J. M., Bianchini, A. (2006). Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology* 143: 187-195.
- Zanette, J., Nunes, F. F., Medeiros, I. D., Siebert, M. N., Mattos, J. J., Luchmann, K. H., Rodrigues, M. C. M., Bairy, A. C. D. (2008). Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. *Marine Environmental Research* 66(1): 196-198.
- Zhang, Y., Fu, D., Yu, F., Liu, Q., Yu, Z. (2011). Two catalase homologs are involved in host protection against bacterial infection and oxidative stress in *Crassostrea hongkongensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 31(6): 894-903.

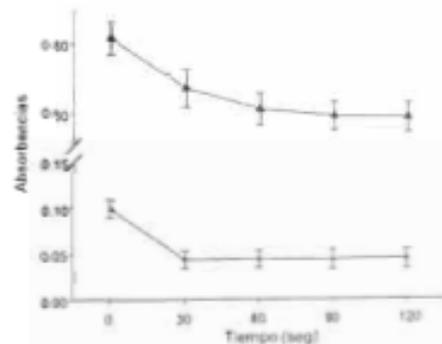
10. ANEXOS



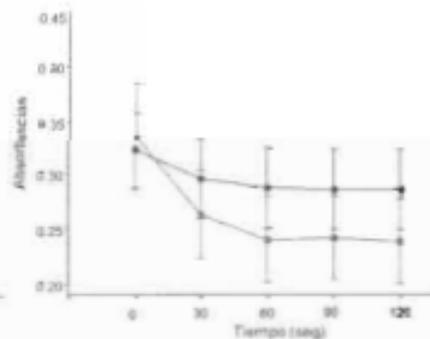
Anexo 1. Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) sobre la cual se interpolaron los datos obtenidos de ostras expuestas a naltaxeno.



Anexo 2. Curva estándar de hidroperóxido de cumero (0.5 - 9 µmoles) a 550 nm.



Anexo 3. Curva tipo que representa la actividad enzimática de CAT (▲) (240 nm) y GST (■) (414 nm) durante 120 segundos ($\bar{X} \pm EE$).



Anexo 4. Curva tipo que representa la actividad enzimática de SOD (▲) y GPx (■) a 340 nm durante 120 segundos ($\bar{X} \pm EE$).