



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



SALUD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA  
CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (SOWERBY, 1835)  
(MOLLUSCA: BIVALVIA) EN EL PUERTO MINERO  
DE SANTA ROSALÍA, BCS, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

JOSUÉ ALONSO YEE DUARTE

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2017.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 06 del mes de Diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"SALUD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (SOWERBY, 1835) (MOLLUSCA: BIVALVIA) EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BCS, MÉXICO**

Presentada por el alumno:

**YEE** **DUARTE** **JOSUÉ ALONSO**  
Apellido paterno materno nombre(s)

Con registro: 

A	1	4	0	6	2	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

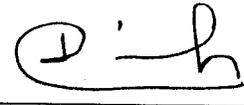
**LA COMISION REVISORA**

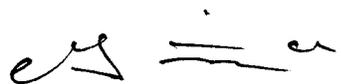
Directores de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ**  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**DR. EVGUENI CHOUMILINE**  
2º. Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA DINORAH HERRERO PEREZRUL**

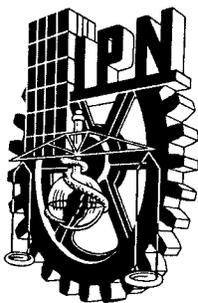
  
\_\_\_\_\_  
**DRA. GRISELDA MARGARITA RODRÍGUEZ FIGUEROA**

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**



**I.P.N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCIÓN**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. el día 07 del mes de Diciembre del año 2017

El (la) que suscribe MC. JOSUÉ ALONSO YEE DUARTE Alumno (a) del Programa  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro A140622 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ y DR. EVGUENI CHOUMILINE

y cede los derechos del trabajo titulado:

"SALUD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida*

(SOWERBY, 1835) (MOLLUSCA: BIVALVIA) EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BCS, MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: casa\_yee@hotmail.com - marellam@ipn.mx - eshumili@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. JOSUÉ ALONSO YEE DUARTE

*Nombre y firma del alumno*

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	36
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
<b>6. RESULTADOS</b> .....	39
<b>CAPÍTULO 1. CONDICIÓN DE SALUD GENERAL DE <i>Megapitaria squalida</i> EN COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR (Publicación 1)</b> .....	39
<b>CAPÍTULO 2. CASTRACIÓN PARASITARIA DE <i>Megapitaria squalida</i> EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO (Publicación 2)</b> .....	57
<b>CAPÍTULO 3. SALUD REPRODUCTIVA DETERIORADA DE <i>Megapitaria squalida</i> EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO</b> .....	76
1. NEOPLASIA TESTICULAR (Publicación 3).....	76
2. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA GÓNADA (Publicación 4).....	85
3. FALLAS REPRODUCTIVAS Y RESERVAS ENERGÉTICAS (Publicación 5).....	107
<b>7. DISCUSIÓN INTEGRATIVA</b> .....	132

<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	135
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	137
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	139
<b>ANEXOS (productos derivados de la tesis)</b> .....	165

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Relación entre la concentración de metales esenciales y no esenciales con la respuesta biológica de los organismos.....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema general de algunas actividades antropogénicas y naturales que aportan metales pesados al medio marino y su depositación en el sedimento y captación por la biota.....	9
<b>Figura 3.</b> Proceso de bioacumulación en el tiempo (A) y biomagnificación (B) de contaminantes a través de la cadena trófica.....	11
<b>Figura 4.</b> Imagen satelital del pueblo de Santa Rosalía y su dársena (imagen izquierda). Cúmulos de escoria (flechas). Imagen frontal de un cúmulo de escoria dentro del pueblo de Santa Rosalía (imagen derecha).....	14
<b>Figura 5.</b> Ultraestructura de células espermatogénicas del mejillón <i>Modiolus kurilensis</i> en un ambiente contaminado. A) Espermátida conteniendo el núcleo (n), vesícula acrosomal (av) y mitocondria (m). B) Espermatozoide maduro conteniendo el núcleo (n) y el acrosoma (a). Ambas micrografías corresponde a organismos de zonas control. C) Espermatozoide con el acrosoma destruido (a), núcleo (n). D) Espermatozoide con doble acrosoma (a), núcleo (n). Escala: 2 µm. Imagen tomada de Yurchenko & Vaschenko (2010).....	23
<b>Figura 6.</b> Rutas generales del ciclo gametogénico en moluscos bivalvos tanto en condiciones ambientales favorables, como en condiciones desfavorables.....	24

<b>Figura 7.</b> Desarrollo del ovocito en bivalvos. En condiciones ambientales óptimas, el ovocito crece de manera normal y llega a su máxima madurez como ovocito postvitelogénico. En condiciones ambientales desfavorables, se pueden presentar alteraciones tales como núcleo picnótico, vacuolas en el citoplasma y deformación de la célula, así como atresia ovocitaria y ruptura del ovocito.....	25
<b>Figura 8.</b> Fenómeno de imposexo manifestado en <i>Rapana Venosa</i> como consecuencia de la exposición a tributilestaño. (Tomado de Zhou <i>et al.</i> , 2008).....	29
<b>Figura 9.</b> Crecimiento (diámetro) de los ovocitos en el tiempo. La línea continua representa el incremento de los ovocitos en condiciones normales. La línea punteada representa el crecimiento de los ovocitos bajo condiciones ambientales desfavorables.....	30
<b>Figura 10.</b> Esquema general del costo metabólico; en presencia de un estresor tóxico, se destinará una mayor cantidad de energía hacia el mantenimiento básico de los organismos expuestos, dejando menos energía disponible para el crecimiento y la reproducción. (Modificado de Smolder <i>et al.</i> , 2005).....	33
<b>Figura 11.</b> Ejemplar de <i>Megapitaria squalida</i> (Sowerby, 1835).....	34
<b>Figura 12.</b> Producción en peso vivo (toneladas) de almeja chocolata <i>Megapitaria squalida</i> con concha en Baja California Sur, México.....	35
<b>Figura 13.</b> Valor de producción (\$) de la captura de la almeja chocolata <i>Megapitaria squalida</i> en Baja California Sur, México.....	36

## CAPÍTULO 1

### CONDICIÓN DE SALUD GENERAL DE *Megapitaria squalida* EN COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Localización geográfica de las zonas de estudio.....	43
<b>Figura 2.</b> Distribución de frecuencias de tallas (longitud de la concha) de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de muestreo.....	47
<b>Figura 3.</b> Variación del índice de condición de <i>Megapitaria squalida</i> entre los sitios de muestreo. Las medias con diferente letra indican diferencia significativa (ANDEVA y prueba de Tukey, $P < 0.05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar.....	48
<b>Figura 4.</b> Frecuencia del índice de condición de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de muestreo.....	49
<b>Figura 5.</b> Relaciones peso–longitud de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de muestreo.....	50
<b>Figura 6.</b> Dendograma construido a partir del análisis de cluster para mostrar la similitud entre las zonas de estudio con base en la longitud de la concha, peso total, peso húmedo y el índice de condición de <i>Megapitaria squalida</i> . La línea punteada indica el nivel de corte para la selección de los grupos.....	52

## CAPÍTULO 2

### CASTRACIÓN PARASITARIA DE *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

**Figura 1.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales de la gónada de *Megapitaria squalida*. A) Estructura histológica normal, de un ovario con gametos en distintas fases de desarrollo, ovogonias (OO) y ovocitos previtelogénicos (PO) adheridos a la pared del folículo, ovocitos vitelogénicos (VO) y ovocitos postvitelogénicos (PVO) sueltos en el lumen de los folículos. B) Estructura histológica normal, de un testículo con una capa de espermatogonias (SO) adheridas a la pared del folículo y espermatozoides (SZ) en el lumen. Escala: 50 µm..... 63

**Figura 2.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales del ovario de *Megapitaria squalida* parasitado por tremátodos. A-C) Dentro de los folículos se presentan esporocistos (S) que contienen sacos germinales (GB) y cercarias en desarrollo (DC). Se observan algunas ovogonias (OO), ovocitos vitelogénicos (VO) y postvitelogénicos (PVO) remanentes. D) Presencia de granulocitomas (\*) en ovario parasitado. Escala: 50 µm..... 64

**Figura 3.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales del testículo de *Megapitaria squalida* parasitado por tremátodos. A-D) Dentro de los folículos se presentan esporocistos (S) con bolas germinales (GB) y cercarias en desarrollo (DC) que desplazan a los espermatozoides (SZ). Se observan diferentes grados de intensidad de infección ligera (A), moderada (B), alta (C) y muy alta (D). Escala: 50 µm..... 65

**Figura 4.** Metacercaria enquistada en el tejido conectivo del ovario de *Megapitaria squalida*. Se observa la pared del quiste (CW), la ventosa

oral (OS); la faringe (P); el acetábulo (AC); el ciego intestinal (CG); y el poro excretor (EP). Escala: 50  $\mu$ m..... 66

**Figura 5.** Porcentaje de área ocupada por parásitos en folículos testiculares de *Megapitaria squalida* y área ocupada por gametos en cada nivel de intensidad de infección. Las barras indican el error estándar..... 68

**Figura 6.** Frecuencia de cada nivel de intensidad de infección de parásitos en la gónada de *Megapitaria squalida*. Las barras indican el error estándar..... 68

**Figura 7.** Variación mensual (mayo de 2012 a abril de 2013) de la temperatura del mar y la prevalencia de parásitos en la gónada de *Megapitaria squalida*..... 71

### CAPÍTULO 3

#### SALUD REPRODUCTIVA DETERIORADA DE *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

##### 1. NEOPLASIA TESTICULAR

**Figura 1.** Fotomicrografías de secciones histológicas (H&E) del testículo de *Megapitaria squalida*. (A) Estructura folicular normal de un testículo conteniendo espermatogonías adheridas a la pared del folículo y espermatozoides en el lumen. (B) Baja intensidad de masas neoplásicas (asteriscos) dentro del lumen de los folículos. (C) Intensidad moderada de neoplasia en casi el 50% de los folículos; es evidente la gran invasión neoplásica, pero sin afectar la estructura. (D) La mayoría de los folículos están afectados y aparecen completamente invadidos por la neoplasia; se pierde la estructura folicular. (E) y (F) Formación de masas de células neoplásicas con citoplasma acidófilo y algunos

basófilos, con núcleos teñidos intensamente de diferentes tamaños. Se presentaron algunas figuras mitóticas (flechas). Escala: 50 µm..... 81

## 2. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA GÓNADA

**Figura 1.** Presencia de gránulos de hierro y cobre en la gónada de *Megapitaria squalida* del puerto de Santa Rosalía (A, C, E y G) y la playa San Lucas (B, D, F y H). Gránulos de hierro (flechas) en testículo (A y B) y ovario (E y F), tinción azul Prussia de Perls. Gránulos de cobre (flechas) en testículo (C y D) y ovario (G y H), tinción hemateína de Mallory. Escala: 50 µm..... 92

**Figura 2.** Alteraciones histopatológicas en el ovario de *Megapitaria squalida*. A) Presencia de ovocitos atrésicos en degeneración. Gran intensidad de células cafés dentro del tejido conectivo interfolicular (flechas). B) Numerosas vacuolas en el citoplasma nuclear de los ovocitos. El recuadro en la parte superior izquierda indica un ovocito con la cromatina nuclear condensada adherido a la parte germinal del folículo. C) Pérdida de la cromatina nuclear (flechas) de algunos ovocitos posvitelogénicos. D) Presencia de ovocitos posvitelogénicos con el núcleo picnótico. E) Ovocito hipertrofiado adherido a la pared germinal del folículo. Nótese la diferencia de tamaño entre los demás ovocitos presentes en el folículo. F) Ovocitos adheridos a la pared folicular por medio de un pedúnculo largo y filamentoso (flechas). El recuadro en la parte superior izquierda indica un ovocito con pedúnculo largo en un proceso de degeneración. G) Intensa infiltración hemocítica en el tejido conectivo. La línea punteada indica la formación de un granulocitoma rodeando una estructura parasitaria no identificada. H) Granulocitoma rodeando un cuerpo de inclusión dentro del tejido conectivo del ovario. El recuadro en la esquina superior derecha indica la presencia de un cuerpo de inclusión rodeado de células cafés. Escala: 50 µm..... 96

**Figura 3.** Alteraciones histopatológicas en el testículo de *Megapitaria squalida*. A) Presencia de acumulaciones de células cafés dentro del tejido conectivo interfolicular. Nótese la presencia de cuerpos de inclusión (flechas) dentro del tejido conectivo del testículo. B) Intensa infiltración hemocítica en el tejido conectivo del testículo. La línea punteada indica la formación de un granulocitoma rodeando una estructura parasitaria no identificada. C) Cuerpo de inclusión (flecha) en el tejido conectivo interfolicular rodeado por un granulocitoma. D) Cuerpos de inclusión dentro del folículo (línea punteada) ocupando el lugar de los espermatozoides. Escala: 50  $\mu\text{m}$ ..... 98

**Figura 4.** Niveles de intensidad de cada alteración histopatológica en el ovario y testículo de *Megapitaria squalida* del puerto de Santa Rosalía. Las medias con diferente letra son significativamente diferentes. Las barras indican el error estándar..... 101

### 3. FALLAS REPRODUCTIVAS Y RESERVAS ENERGÉTICAS

**Figura 1.** Temperatura superficial del mar (A) y concentración de clorofila a (B) por sitio de muestreo..... 117

**Figura 2.** Variación de la concentración de metales en sedimento y tejidos de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo..... 119

**Figura 3.** Apariencia externa de la concha de *Megapitaria squalida* de Santa Rosalía (A) y San Lucas (B)..... 120

**Figura 4.** Ciclo reproductivo de hembras de *Megapitaria squalida* de Santa Rosalía (A) y San Lucas (B)..... 121

**Figura 5.** Diámetro por tipo de ovocito (A), área folicular (B) y número de ovocitos por folículo (C) de hembras de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo. Letras diferentes representan diferencias significativas entre sitios. Las barras indican el error estándar..... 123

**Figura 6.** Variación estacional y por sitios de muestreo de la concentración ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco) de carbohidratos, proteínas y lípidos totales en las tejidos de *Megapitaria squalida*. Diferentes letras representan diferencias significativas entre sitios. Las barras indican el error estándar..... 125

**Figura 7.** Cantidad de energía aportada por carbohidratos, proteínas y lípidos en los tejidos (suma de todos los tejidos) de *Megapitaria squalida* por sitio de estudio, así como el total de energía aportada por los tres componentes bioquímicos (suma de los tres componentes). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los sitios. Las barras indican el error estándar..... 126

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Metales pesados que llegan al ambiente marino, fuentes antropogénicas, función biológica y su toxicidad.....	7
<b>Tabla 2.</b> Concentración de metales pesados en algunas especies de moluscos (bivalvos marinos, cefalópodos) y macroalgas en costas del Golfo de California y el Pacífico mexicano. Los valores están expresados en mg kg <sup>-1</sup> de peso seco y corresponden a la media ± desviación estándar y en algunos casos al valor medio.....	16
<b>Tabla 3.</b> Alteraciones histopatológicas de algunos moluscos relacionadas con diversos contaminantes.....	21

### CAPÍTULO 1

#### CONDICIÓN DE SALUD GENERAL DE *Megapitaria squalida* EN COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR

	Página
<b>Tabla 1.</b> Parámetros biométricos de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de muestreo.....	46
<b>Tabla 2.</b> Parámetros de las relaciones peso–longitud y tipos de crecimiento de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de muestreo.....	51

### CAPÍTULO 2

#### CASTRACIÓN PARASITARIA DE *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

<b>Tabla 1.</b> Características morfométricas (valores promedio) de las metacercarias enquistadas (n = 7) en el tejido conectivo de ovario de <i>Megapitaria squalida</i> .....	67
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 2.</b> Prevalencia de parásitos en la gónada de <i>Megapitaria squalida</i> . Se muestra la prevalencia (%) total, por intervalo de talla, sexo, fase de desarrollo gonádico y por estación del año. Los análisis corresponden a la correlación de Spearman ( <i>r</i> ) y a la prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). Los valores de <i>P</i> significativos (< 0.05) se indican con un asterisco (*).....	70
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### CAPÍTULO 3

#### SALUD REPRODUCTIVA DETERIORADA DE *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

##### 2. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de área ocupada por cobre y fierro obtenidos por histoquímica en la gónada de 16 especímenes de <i>Megapitaria squalida</i> por sitio de estudio. En la parte superior, se expresa la media total $\pm$ error estándar. Categorías de acumulación: *menor, **moderada y ***extensa.....	93
<b>Tabla 2.</b> Variables morfométricas de <i>Megapitaria squalida</i> (media $\pm$ error estándar; mínimo–máximo) y proporción de sexos por sitio de estudio.....	95
<b>Tabla 3.</b> Prevalencia (%) de las alteraciones histopatológicas de la gónada (ovario y testículo) de <i>Megapitaria squalida</i> de cada sitio de estudio.....	99
<b>Tabla 4.</b> Prevalencia total de las alteraciones histopatológicas por sexo, etapa de desarrollo gonadal y estación por sitio de estudio.....	100

## RESUMEN

Los organismos que están expuestos crónicamente a altas concentraciones de metales pesados pueden presentar alteraciones en sus funciones biológicas. El puerto minero de Santa Rosalía, Golfo de California, es una zona que presenta concentraciones anómalamente altas de metales pesados en sus sedimentos marinos. A pesar de la evidencia de contaminación y de riesgo toxicológico potencial, se sabe poco sobre los efectos adversos sobre la biota marina local. El presente trabajo, evalúa por primera vez el estado de salud reproductiva de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* en la región minera de Santa Rosalía. Los resultados de esta tesis, están plasmados en tres capítulos que abordan aspectos sobre la condición de salud general, parasitológicos, histopatológicos, reproductivos y bioquímicos, que en conjunto nos proporcionan un panorama de la condición de salud reproductiva de *M. squalida* en esta zona contaminada. En el capítulo 1, se evaluó la condición de salud general mediante el análisis de tallas, índice de condición y relaciones peso–longitud. Los resultados de este capítulo revelaron que las almejas de Santa Rosalía tienen un estado de salud deteriorado en comparación con las de otras zonas costeras de BCS, evidenciado por su menor tamaño, baja condición y un crecimiento alométrico negativo. El capítulo 2 muestra una inusual castración parasitaria dentro de los folículos gonadales, causada por el desarrollo de larvas de tremátodos digéneos. Su alta intensidad provocó una respuesta inflamatoria, evidenciada por una intensa infiltración hemocítica y la formación de granulocitomas. El capítulo 3 muestra la salud reproductiva de *M. squalida* deteriorada. Se registra por primera vez la ocurrencia de neoplasia en la gónada de *M. squalida* y su efecto en la reproducción. Dicha neoplasia corresponde al tipo germinoma y únicamente se observó en machos (6.2% de prevalencia). La afectación tumoral se presentó con una intensidad desde baja hasta alta, y en algunos casos, se observó la pérdida de la arquitectura gonadal con la ruptura de la pared del folículo. Se encontraron alteraciones histopatológicas en la gónada de *M. squalida*, las cuales corresponden a respuestas inflamatorias, procesos degenerativos/progresivos, muerte celular y respuesta a agentes tipo bacteria. Por último, en este capítulo, se muestran alteraciones en la reproducción de *M. squalida*, como la modificación en tiempo, aparición y duración de cada fase reproductiva, así

como la intensidad de desove. Se observó que el ciclo reproductivo de las hembras de *M. squalida* es interrumpido por una intensa reabsorción de ovocitos y una fase de reposo y el porcentaje de almejas en madurez (3%) y en desove (27%) fue más bajo que las almejas de San Lucas, al igual que el diámetro de los ovocitos, el área folicular, el número de ovocitos por folículo y las reservas energéticas. En conclusión, los resultados de esta tesis indican que *M. squalida* en la región minera de Santa Rosalía presenta un estado de salud reproductiva deteriorado, lo cual sugiere un efecto adverso en la gametogénesis, en la calidad de los gametos y por lo tanto en su potencial reproductivo, correlacionado con la exposición crónica a la alta contaminación por metales pesados.

**Palabras clave:** reproducción, histopatología, reservas energéticas, contaminación marina, metales pesados, Golfo de California, bivalvos.

## ABSTRACT

Organisms that are chronically exposed to high concentrations of heavy metals may exhibit alterations in their biological functions. The mining port of Santa Rosalia, Gulf of California, is an area that has anomalously high concentrations of heavy metals in its marine sediments. Despite evidence of contamination and potential toxicological risk, little is known about the adverse effects on local marine biota. The present work, evaluates for the first time the state of reproductive health of the chocolate clam *Megapitaria squalida* in the Santa Rosalía mining region. The results of this thesis, are embodied in three chapters that address aspects of the general health condition, parasitological, histopathological, reproductive and biochemical, which together provide an overview of the reproductive health condition of *M. squalida* in this contaminated area. In chapter 1, the general health condition was evaluated through size analysis, condition index and weight–length relationships. The results of this chapter revealed that the clams of Santa Rosalía have a deteriorated state of health in comparison with those of other coastal zones of BCS, evidenced by their smaller size, low condition and negative allometric growth. Chapter 2 shows an unusual parasitic castration within the gonadal follicles, caused by the development of digenetic trematode larvae. Its high intensity trigger an inflammatory response, evidenced by an intense hemocytic infiltration and the formation of granulocytomas. Chapter 3 shows the reproductive health impaired of *M. squalida*. The occurrence of neoplasia in the gonad of *M. squalida* and its effect on reproduction is recorded for the first time. This neoplasm corresponds to the germinoma type and was only observed in males (6.2% prevalence). The tumor involvement was presented with an intensity from low to high, and in some cases, the loss of the gonadal architecture with the rupture of the wall of the follicle was observed. Histopathological alterations were found in the *M. squalida* gonad, which correspond to inflammatory responses, degenerative/progressive processes, cell death and response to bacterial agents. Finally, in this chapter, alterations in the reproduction of *M. squalida* are shown, such as the modification in time, appearance and duration of each reproductive phase, as well as the spawning intensity. It was observed that the reproductive cycle of the females of *M. squalida* is interrupted by an intense resorption of oocytes and a resting phase and the percentage

of clams in maturity (3%) and in spawning (27%) was lower than the clams of San Lucas, as well as the diameter of the oocytes, the follicular area, the number of oocytes per follicle and the energy reserves. In conclusion, the results of this thesis indicate that *M. squalida* in the Santa Rosalia mining region presents a deteriorated reproductive health status, which suggests an adverse effect on the gametogenesis, on the quality of the gametes and therefore on their reproductive potential, correlated with chronic exposure to high contamination by heavy metals.

**Key words:** reproduction, histopathology, energy reserves, marine pollution, heavy metals, Gulf of California, bivalves.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras y las comunidades bentónicas son de los ecosistemas de mayor productividad biológica, con gran importancia económica y ecológica; sin embargo, también son de los más gravemente afectados por la presencia de mezclas complejas de contaminantes que impactan la salud de la biota y se manifiestan en el detrimento de sus valores ecológicos, lo cual plantea una preocupación ambiental significativa (Ruiz *et al.*, 2011; Sheir *et al.*, 2013). En México, muchos ecosistemas costeros están impactados por la contaminación producto de diversas actividades antropogénicas y muestran signos de degradación ambiental (García-Gasca *et al.*, 2010). Entre los contaminantes más comunes que llegan a la zona costera provenientes de diversas fuentes se encuentran los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs) y los metales pesados (Botello & Páez-Osuna, 1986).

Particularmente, la exposición crónica a altas concentraciones de contaminantes está típicamente asociada con efectos deletéreos en los organismos, los cuales se pueden observar en varias escalas de tiempo. A mediano y largo plazo, se presentan alteraciones histológicas, bioquímicas y fisiológicas que no involucran estrictamente la muerte instantánea del organismo (Brungs *et al.*, 1978), pero sí afectan de manera adversa e irreversible su estado de salud, lo cual se ve reflejado en la poca capacidad de llevar a cabo algunas funciones biológicas vitales para su desarrollo, tales como el crecimiento y la reproducción, además de una disminución en la resistencia a situaciones de estrés, lo que aumenta la susceptibilidad a presentar agentes patógenos y parásitos (Dillon & Lynch, 1981; Paul-Pont *et al.*, 2010; Vaschenko *et al.*, 2013). De manera particular, el deterioro de la reproducción es una de las consecuencias más devastadoras de la contaminación ambiental, ya que puede conducir a cambios negativos a nivel poblacional (Weng & Wang, 2015). En general, la reproducción está regulada por factores ambientales naturales como la temperatura y la disponibilidad de alimento; sin embargo, la exposición a contaminantes puede interferir y con frecuencia dar lugar a su consecuente deterioro (Voets *et al.*, 2006; Giarratano *et al.*, 2010). Lo anterior trae como consecuencia, alteraciones histopatológicas en la gónada (Tay *et al.*, 2003), gónadas indiferenciadas (Vaschenko

*et al.*, 2013), retraso en la gametogénesis y la madurez sexual (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Siah *et al.*, 2003), intersexualidad (ovotestis), imposexo y hermafroditismo (Stentiford & Feist, 2005; Zhou *et al.*, 2008; Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2010), baja producción de gametos, frecuencias de desove bajas y de corta duración (Mouneyrac *et al.*, 2008; Tlili *et al.*, 2011), atresia de ovocitos y disminución en el éxito de fertilización (Vaschenko *et al.*, 1997; Baussant *et al.*, 2011), bajas concentraciones de proteínas, deficiente movilidad de lípidos y disminución de glucógeno esenciales para la reproducción (Leavitt *et al.*, 1990; Ketata *et al.*, 2007; Tlili *et al.*, 2011).

Las investigaciones sobre las alteraciones en la reproducción de moluscos bivalvos son ecológicamente relevantes, ya que estos organismos representan uno de los grupos más abundantes y diversos del bentos marino y son de gran importancia en el funcionamiento de estos ecosistemas (DeFur *et al.*, 1999; Nevesskaja, 2009), además de formar una parte importante en la alimentación y economía de los habitantes de zonas costeras de todo el mundo (FAO, 2001). Además de su abundancia, su amplia distribución geográfica, la forma de vida sésil, su modo de alimentación (filtradores de partículas en suspensión), su amplia tolerancia a fluctuaciones ambientales y a la capacidad para acumular contaminantes en sus tejidos, ha llevado al uso de estos organismos como los más importantes bioindicadores de contaminación en diferentes programas de monitoreo ambiental alrededor del mundo (Goldberg, 1975; Rainbow, 1995; Boening, 1999; Zhou *et al.*, 2008).

La almeja chocolate *Megapitaria squalida* es uno de los bivalvos marinos de mayor importancia comercial y de consumo a lo largo de las costas del Pacífico mexicano (Arellano-Martínez *et al.*, 2006). Esta especie ha sido usada como bioindicador en estudios de salud del medio ambiente debido a su capacidad de acumular metales pesados en sus tejidos (Méndez *et al.*, 2006; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009). Sin embargo, estos estudios solo se han enfocado en cuantificar la concentración de metales sin analizar un posible efecto biológico y hasta el momento, no existen estudios relacionados con la interrupción de la reproducción de *M. squalida* ocasionada por algún agente estresante.

La región minera de Santa Rosalía, en el Golfo de California, México es una zona que presenta altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos en los sedimentos marinos provenientes de la antigua minería y en el que se han reportado valores anormales de Cu ( $3,390 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $1,916 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Co ( $166 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $6,770 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Pb ( $226 \text{ mg kg}^{-1}$ ), y U ( $11.8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Shumilin *et al.*, 2013), los cuales son hasta unos órdenes de magnitud más altos que en diversas áreas costeras paralelas dentro del Golfo de California (Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz, 2013) y exceden significativamente los valores de referencia para la corteza terrestre y de las guías de calidad ecotoxicológica, lo que sugiere una alta posibilidad de riesgo toxicológico para la biota marina. En consecuencia, se ha reportado que en esa zona los mejillones *Modiolus capax* (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz, 2013) y *Mytilus edulis* (Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009) presentan concentraciones de Cu hasta 11 veces más altas que las de otras áreas de la península de Baja California.

A pesar de la clara evidencia de contaminación en el puerto minero de Santa Rosalía y del riesgo toxicológico potencial, se sabe poco sobre los efectos en la biota bentónica marina local. Bajo este escenario, y considerando la importancia de analizar el estado reproductivo de especies de importancia comercial y de consumo, el objetivo del presente estudio fue examinar los efectos potenciales de la exposición a largo plazo a la contaminación por metales pesados sobre algunas respuestas fisiológicas, reproductivas y bioquímicas de *M. squalida* de la región minera de Santa Rosalía.

Los resultados de esta tesis, están plasmados en diferentes capítulos que abordan por primera vez de manera conjunta el estado de salud general y reproductiva de *M. squalida* relacionado con la contaminación por metales pesados. En el capítulo 1, se analizó la condición fisiológica general de *M. squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía mediante el análisis de tallas, índice de condición y relaciones peso-longitud, lo cual permitió elaborar un primer diagnóstico de la condición de salud de la almeja. Adicionalmente, estos resultados se compararon con los datos de almejas de cuatro áreas costeras de Baja California Sur (Laguna Guerrero Negro, Bahía Magdalena, Bahía de La Paz y San Lucas) consideradas prístinas. El capítulo 2 corresponde al hallazgo de parásitos en la gónada de *M. squalida* y a su efecto en la

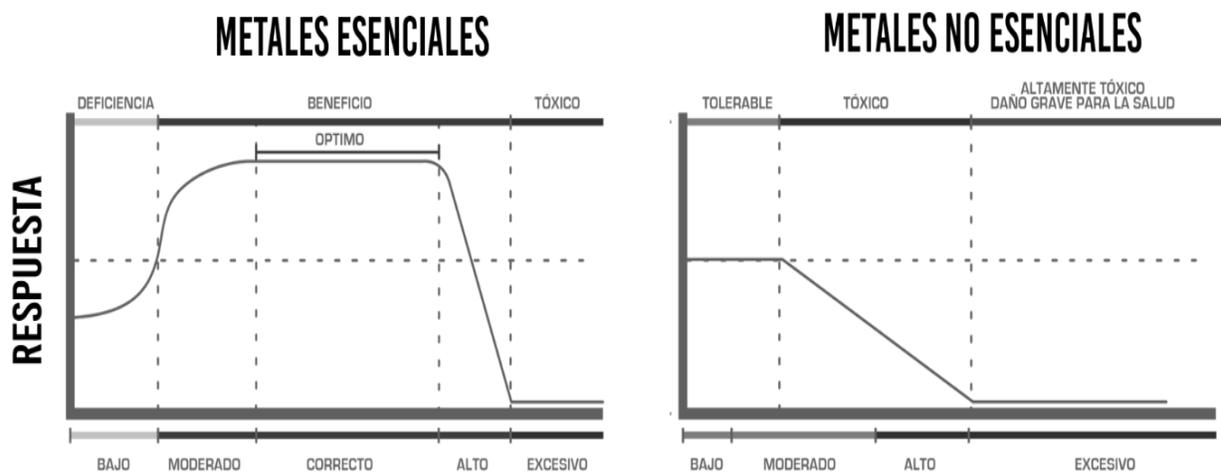
salud reproductiva. Cabe destacar que los resultados de este capítulo corresponden al primer registro de parásitos en *M. squalida*. El capítulo 3 se divide en tres subtemas: 1) el primer registro de la ocurrencia de neoplasia en los testículos de *M. squalida* y su efecto en la reproducción. 2) el hallazgo de diversas alteraciones histopatológicas en la gónada de *M. squalida* mediante un análisis cuantitativo y cualitativo, lo cual permitió establecer el estado de salud del tejido gonádico. 3) cuantificación de algunos metales pesados (Co, Cu, Mn, Pb, U y Zn) en el sedimento superficial marino de la zona costera de Santa Rosalía, así como en los tejidos de *M. squalida* (gónada, glándula digestiva, branquias, manto y músculo aductor). Además, se evaluó su condición reproductiva mediante el análisis de las características del ciclo reproductivo (modificación en tiempo, aparición y duración de cada fase reproductiva, intensidad de desove), el análisis cuantitativo de los ovocitos y del tejido gonádico, así como el análisis de la composición bioquímica (carbohidratos, lípidos y proteínas) de los tejidos de *M. squalida* y sus reservas energéticas esenciales para llevar a cabo su reproducción.

## **2. ANTECEDENTES**

### **Aspectos generales de los metales pesados**

El término de metales pesados no está bien definido científicamente, diversos autores los clasifican con base en distintas características. Por ejemplo, dependiendo del tipo de elemento, de sus concentraciones y de diversos criterios químicos y físicos, los metales se pueden clasificar en ligeros, semi-metales y metales pesados. Clark (2002), definió a los metales pesados como aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg) y presentan una densidad superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$ , así como un cierto grado de toxicidad, pudiendo causar efectos nocivos en el ambiente en que se encuentran. De manera genérica, el término metal pesado es empleado para definir a un conjunto de elementos químicos a los cuales se les atribuyen diferentes efectos de contaminación, toxicidad y/o ecotoxicidad. Phipps (1981) definió como metal tóxico a aquel que pertenece a un grupo de elementos que no tiene un efecto esencial ni es benéfico, pero que tiene efectos nocivos en las funciones metabólicas normales, incluso estando presente en cantidades muy pequeñas. También, algunos autores los clasifican como esenciales y

no esenciales (Barile, 2008). Los esenciales son necesarios en los organismos para llevar a cabo el metabolismo celular, síntesis de proteínas, participación en la elaboración de energía en las mitocondrias, ciclo de Krebs, metabolismo de carbohidratos y lípidos, transporte de nutrientes y oxígeno a nivel celular y maduración celular, entre otras funciones. A pesar de la participación como elementos esenciales, un exceso en las concentraciones de estos elementos resulta perjudicial a la salud de los organismos (Fig. 1) (Barile, 2008). Los no esenciales son aquellos que los organismos no requieren para los procesos fisiológicos y que aún en bajas concentraciones, pueden resultar tóxicos y perjudiciales para la salud (Kennish, 1997).



**Figura 1.** Relación entre la concentración de metales esenciales y no esenciales con la respuesta biológica de los organismos. (Modificado de Soto *et al.*, 2003).

En la Tabla 1, se mencionan algunos de los principales metales pesados que llegan al ambiente marino, sus fuentes de aporte, su participación como elementos esenciales y su toxicidad. En el ambiente marino, los metales son emitidos y distribuidos a través de diversas fuentes de aporte. De manera natural, estos elementos son movilizados al mar por intemperismo y erosión de rocas, emisiones volcánicas, incendios forestales, a través de ventilas hidrotermales y vía atmosférica principalmente. Las fuentes antropogénicas más comunes son el aporte por drenaje de residuos urbanos, actividades industriales, portuarias, turísticas, a través de la quema de combustibles del petróleo, incineración de desechos, uso de plaguicidas,

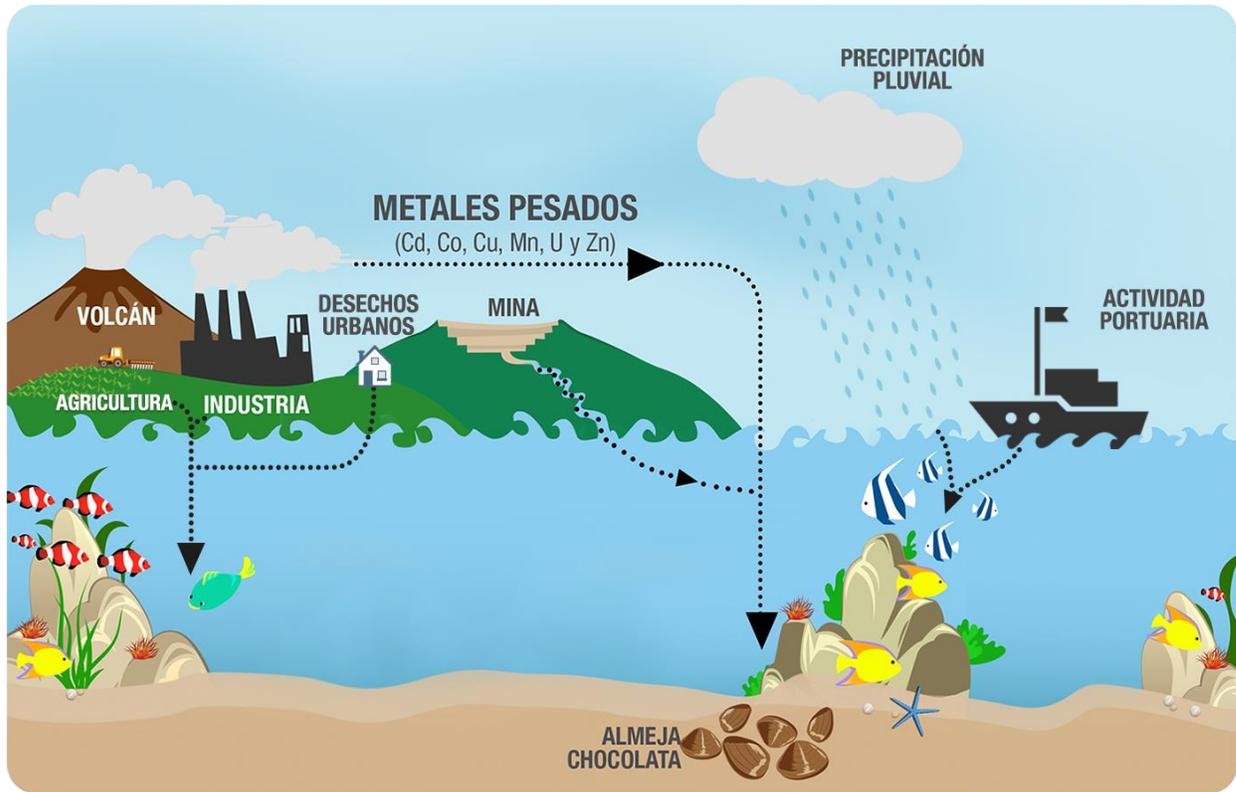
fertilizantes utilizados en agricultura y actividades mineras. Los diferentes desechos producidos durante la extracción, fundición y procesamiento de materiales metalíferos, contribuyen como fuente importante de metales que finalmente entran al ecosistema marino vía arroyos, ríos, escorrentías fluviales y vía atmosférica (Adriano, 2001). Una vez en el medio marino, los metales pesados se movilizan o transfieren por medio de procesos fisicoquímicos en los cuerpos de agua; una fracción de estos elementos se mantiene disuelta o particulada y suspendida en la columna de agua, otra fracción es depositada en los sedimentos del fondo y otra fracción biodisponible es capturada por la biota (Fig. 2). Los metales que son bioacumulados y concentrados en los organismos, pueden llegar a afectar la homeostasis de los procesos fisiológicos y a su vez, biomagnificarse en la cadena trófica.

**Tabla 1.** Metales pesados que llegan al ambiente marino, fuentes antropogénicas, función biológica y su toxicidad.

Elemento	Fuente antropogénica	Función biológica o esencial	Toxicidad
Cadmio	Minería y fundición, acabado de metales, industria del plástico, microelectrónica, fabricación de pilas, vertederos y eliminación de desechos, fertilizantes de fosfato.	No esencial	Alteración renal, hepática, altamente cancerígeno, vómitos, diarreas, disfunción renal, deformidades esqueléticas, alteraciones en el sistema nervioso, alteraciones en la reproducción y en el crecimiento.
Cobre	Minería y fundición, acabado de metales, tratamiento de madera, pesticidas, desagües de minas.	Forma parte de sistemas enzimáticos, contribuye a la formación de glóbulos rojos, constituye el núcleo de la hemocianina, pigmentos respiratorios en algunos invertebrados.	Degeneración hepática, irritación en el tracto gastrointestinal, úlceras e irritación cutánea, envenenamiento.
Cromo	Acabados de metales, industria del plástico, tratamiento de madera, refineras, desechos urbanos, aguas residuales.	Participa en el metabolismo de la glucosa, cofactor de la insulina, participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.	Mutaciones genéticas, transformaciones celulares, ulceración de la mucosa, inhibición de las funciones respiratorias, cáncer de pulmón, daños al ADN.
Fierro	Manipulación de residuos, minería y fundición, drenaje de minería.	Átomo central de la hemoglobina, esencial para el crecimiento, forma parte de algunas enzimas, importante en el metabolismo celular.	Irritación gastrointestinal, siderosis, acumulación en el hígado, alteraciones hepáticas, alteraciones en el crecimiento.
Manganeso	Minería y fundición, incineración de desechos, industria cristalera, fertilizantes, manufactura de pilas.	Forma parte de tejidos conectivo y óseo, importante en el crecimiento, metabolismo de lípidos y carbohidratos, cofactor de enzimas.	Calambres, alucinaciones, convulsiones, neumonitis, alteraciones al sistema nervioso, sintomatología neurotóxica.
Mercurio	Actividades mineras y fundición, acabado de metales, microelectrónica, tratamiento de madera, vertederos y eliminación de desechos, industria pirometalúrgica, pesticidas, desagüe de minas.	No esencial	Parálisis, alteraciones de vista y oído, manifestaciones neurológicas. Envenenamientos prenatales incluso en ausencia de sintomatología de la madre. Daños en el riñón, hígado y sistema cardíaco.

Níquel	Humo del tabaco, industria del hierro y acero, acabado de metales, manufactura de baterías, joyería, fundición.	Participación en procesos enzimáticos, activación hormonal, metabolismo celular.	Dermatitis, desórdenes respiratorios y actividad cancerígena, asma, irritación pulmonar, retraso en el crecimiento, hiperglucemia.
Plomo	Minería y fundición, industria del hierro y acero, refineras, industrias de pinturas, escape automotrices, plomería, manufactura de baterías, pesticidas.	No esencial	Desórdenes neurológicos, envenenamiento, convulsiones, parálisis, inhibe el transporte de oxígeno en la hemoglobina, crecimiento anómalo y efectos teratogénicos.
Zinc	Minería y fundición, acabado de metales, pesticidas, fabricación de baterías, recubrimiento de tejados, incineración de residuos,	Cofactor enzimático, metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos, colabora en el funcionamiento del sistema inmunitario.	Escalofríos, fiebres y nauseas, efectos en el crecimiento y la reproducción.

---



**Figura 2.** Esquema general de algunas actividades antropogénicas y naturales que aportan metales pesados al medio marino y su depositación en el sedimento y captación por la biota. (Ilustración: Josué Yee).

### **Biodisponibilidad, bioacumulación, biomagnificación y destoxificación**

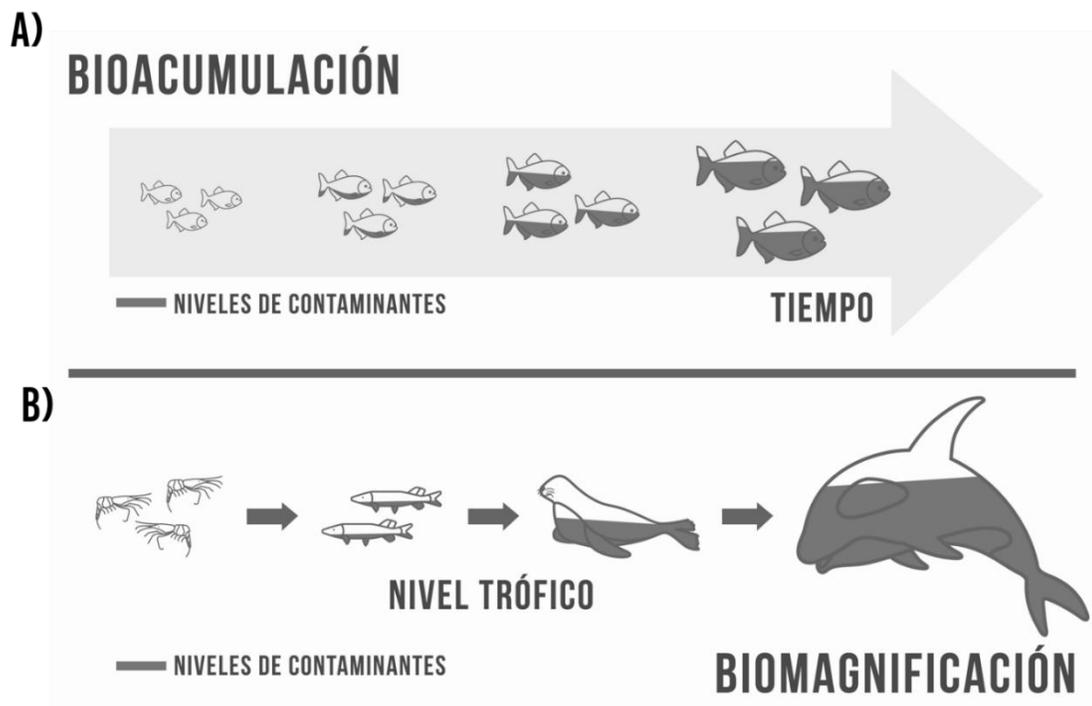
Se define biodisponibilidad como la afinidad de un contaminante para ser absorbido por un organismo vivo mediante procesos biológicos activos o procesos pasivos de tipo físico o químico (Newman, 2014). Todos los organismos vivos están separados del medio en que viven por membranas celulares o epitelios compuestos por una doble membrana lipídica con moléculas proteicas y canales cargados electroquímicamente (Casado-Martínez, 2006). Por lo tanto, aquellos compuestos que sean biodisponibles serán introducidos a través de las membranas biológicas de forma pasiva o serán transportados mediante gradientes físico-químicos o sistemas enzimáticos y pueden ser así acumulados en los tejidos de los organismos (Casado-Martínez, 2006). Todos los seres vivos incorporan cierta cantidad de algunos metales para satisfacer los requerimientos mínimos para su metabolismo (esenciales). Las

concentraciones en los tejidos de estos organismos marinos pueden ser reguladas dentro de un intervalo natural de concentraciones, excepto cuando las concentraciones ambientales alcanzan valores casi letales. Muchos de estos elementos esenciales son incorporados a través de las membranas biológicas mediante bombas proteicas, aunque la biodisponibilidad de un metal en solución va a depender de su actividad, entendida como la proporción de metal que está en su forma más biodisponible (Casado-Martínez, 2006).

La bioacumulación es un mecanismo celular basado en un sistema de transporte de membrana mediante el cual se incorpora y retiene un contaminante biodisponible en el tiempo a través de cualquier fuente externa, tales como el agua, alimento, sustrato o aire (Fig. 3A). Por lo tanto se considera el resultado neto de la incorporación, distribución y eliminación de una sustancia en un organismo debido a las múltiples fuentes de exposición (ECETOC, 1996). Una vez en el citoplasma de la célula, el metal puede ser “secuestrado” por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos o tiol (formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno) o bien englobados en las vacuolas para posteriormente ser excretados o eliminados (Lovley, 2000). Algunos compuestos muy solubles pueden ser rápidamente excretados por difusión, por transformación metabólica o transporte activo y por lo tanto, las concentraciones en los tejidos se mantienen a niveles más o menos constantes independientemente de la concentración ambiental en el medio. Por el contrario, la exposición continua de un organismo a concentraciones más o menos constantes puede causar la incorporación de contaminantes en los tejidos hasta una determinada concentración más o menos estable. La concentración de equilibrio entre la entrada y salida de un contaminante se conoce normalmente como el factor de bioacumulación, calculado como el cociente entre la concentración de un contaminante en el tejido y la concentración en los distintos compartimentos ambientales en equilibrio con el organismo (Páez-Osuna & Osuna-Martínez, 2011).

Los organismos marinos son capaces de bioacumular la mayoría de formas biodisponibles de contaminantes orgánicos y metales como parte de su alimento, es lo que se denomina bioacumulación a través de la cadena trófica (Casado-Martínez, 2006). Lo anterior da lugar al proceso de biomagnificación, el cual se define como el

incremento en la concentración de un contaminante de un nivel trófico inferior a uno superior, es decir, la transferencia del contaminante a través de las redes tróficas y la acumulación de los contaminantes adquiridos por la dieta (Fig. 3B) (Newman, 2014; Jorgensen, 2016). El grado de biomagnificación puede cuantificarse mediante el factor de biomagnificación, el cual consiste en calcular la proporción de un contaminante en un nivel trófico con respecto a la que presenta el nivel trófico inferior inmediato. Este factor puede ser estimado con individuos cuyo nivel trófico se conozca o se asuma (Newman, 2014). Existen dos condiciones para que se produzcan efectos de biomagnificación. En primer lugar, el compuesto debe ser incorporado fácilmente en los procesos digestivos y después unido y retenido en los tejidos del consumidor. Si ambas condiciones se cumplen, el compuesto químico permanece durante largo tiempo y, si el consumidor sigue alimentándose repetidamente de alimentos contaminados, puede llegar a acumular concentraciones superiores a las encontradas en su alimento (Casado-Martínez, 2006).



**Figura 3.** Proceso de bioacumulación en el tiempo (A) y biomagnificación (B) de contaminantes a través de la cadena trófica. (Modificado de [www.worldwildlife.org](http://www.worldwildlife.org)).

La mayoría de los organismos tiene la capacidad de eliminar los contaminantes cuando sobrepasan el umbral de tolerancia. Para esto, existen diversas formas y rutas de detoxificación que reducen las concentraciones de tóxicos y van a variar dependiendo del tipo de organismo y del contaminante. Ahearn *et al.* (2004) proponen tres tipos de mecanismos generales:

1.- Mecanismos fisiológicos de regulación en los que se equilibran las tasas de excreción con las tasas de captura.

2.- Mecanismos de secuestro intracelular de metales que involucran sitios de enlace de alta afinidad con proteínas de bajo peso molecular conocidas como metalotioneínas, seguido de su eliminación a través de un sistema lisosomal.

3.- Procesos de secuestro intracelular de metales que involucra vacuolas específicas que producen gránulos, los cuales posteriormente se eliminan por medio de exocitosis.

Por ejemplo, los metales y otros cationes también pueden ser retenidos o eliminados a través de la biomineralización. Algunos metales, tales como el Pb pueden ser incorporados en tejidos relativamente inertes como las testas calcáreas, el exoesqueleto o los huesos; cuando son incorporados en el exoesqueleto de los invertebrados pueden ser eliminados por medio de la muda. Otros metales como el Cu pueden ser incorporados en las valvas o conchas de moluscos y ser eliminados a través del perióstraco. De igual forma, los metales pueden ser secuestrados por una gran variedad de gránulos o concreciones en los tejidos estructurales (Simkiss & Taylor, 1981). Tales gránulos usualmente se asocian con la glándula digestiva, hepatopáncreas y los riñones. También son encontrados en algunas células especializadas de invertebrados y en los tejidos conectivos de vertebrados. La excreción de un contaminante resulta en una disminución en la cantidad del contaminante dentro del organismo. Los animales pueden eliminar los contaminantes por medio de su transporte a través de las branquias, exhalación, secreciones del hepatopáncreas, secreción de la mucosa intestinal, mudas, excreción vía los riñones, deposición de huevos, pérdida de pelo, plumas y piel, etc. (Roesijadi & Robinson, 1994).

## **Actividad minera en la región de Santa Rosalía, Baja California Sur, México**

Santa Rosalía es un puerto pesquero localizado en la parte central de la costa este de la península de Baja California (27° 20' N, 112° 16' O), 450 km al norte de la ciudad de La Paz (Rodríguez-Figueroa, 2004). La zona costera de la región minera de Santa Rosalía colinda al este con el Golfo de California y está limitado al sur por Punta Chivato y al norte por Punta Baja. Su cuenca hidrográfica está limitada al norte por el sistema volcánico Las Tres Vírgenes-La Caldera-La Reforma y al sur, por la Sierra de Santa Lucía. Presenta un clima árido, con temperaturas promedio de 23.4°C y una máxima de 44°C, así como lluvias escasas y variables, con una media anual de 117.2 mm (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003; Rodríguez-Figueroa, 2004).

Desde 1868, fueron descubiertos depósitos de cobre y comenzaron a ser explotados por mineros alemanes que, para 1874, produjeron 6,000 toneladas de mineral cuprífero (Romero-Gil, 1991). Para 1885, las minas comenzaron a ser explotadas por la compañía minera de propiedad francesa “Compagnie du Boleo, S.A.”, que para 1900 llegó a aportar la mayor parte de la producción cuprífera del país (Mendoza-Arroyo, 2003), con una producción promedio anual máxima de 11,297 toneladas de cobre (Romero-Gil, 1991). En 1985, las actividades mineras cerraron y generaron aproximadamente 370 millones de toneladas de escoria que fueron depositados en tierra, en la zona costera y el mar adyacente (Shumilin *et al.*, 2011). Actualmente, permanecen algunos desechos mineros que están depositados en el centro del pueblo (Fig. 4). En 2010, contratistas de “Ingeniería, Compra y Construcción” iniciaron un nuevo proyecto con el nombre de “Minera y Metalúrgica del Boleo S.A. de C.V”, con el propósito de reanudar las operaciones de la mina en 2014, aunque en una zona al norte de la ciudad (CAM, 2011).



**Figura 4.** Imagen satelital del pueblo de Santa Rosalía y su dársena (imagen izquierda). Cúmulos de escoria (flechas). Imagen frontal de un cúmulo de escoria dentro del pueblo de Santa Rosalía (imagen derecha).

#### **Metales pesados en bivalvos marinos y otros organismos en costas mexicanas**

En México, particularmente en las zonas costeras del Pacífico, existen numerosos estudios sobre la concentración de metales pesados en bivalvos marinos, principalmente de importancia comercial (ver Tabla 2) (Frías-Espericueta *et al.*, 1999; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Ruelas-Inzunza & Páez-Osuna, 2000; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009; Cantú-Medellín *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2002; Méndez *et al.*, 2006; Páez-Osuna & Osuna-Martínez, 2015). La mayor parte de los estudios se han realizado en especies de mejillones y ostras, tales como el ostión de mangle *Crassostrea corteziensis* (Ruelas-Inzunza & Páez-Osuna, 2000; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009; Jara-Marini *et al.*, 2009), la ostra de piedra *Saccostrea iridescens* (Páez-Osuna & Marmolejo-Rivas, 1990), el ostión *Crassostrea palmula* (Páez-Osuna *et al.*, 1993), el ostión japonés *Crassostrea gigas* (Frías-Espericueta *et al.*, 2008), los mejillones *Mytilus edulis* (Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009), *Mytella strigata* (Páez-Osuna *et al.*, 1988; Ruelas-Inzunza & Páez-Osuna, 2000) y *Mytilus californianus* (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Lares *et al.*, 2005), el choro *Modiolus capax* y *Modiolus modiolus* (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999), en el hacha *Pinna rugosa* (García-Hernández *et al.*,

2005) y en algunas almejas, principalmente *Chione californiensis* (Páez-Osuna *et al.*, 1993; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009), *Chione gnidia* (Méndez *et al.*, 2002), *Laevicardium elatum* (Méndez *et al.*, 2002; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009), *Chione subrugosa*, *Tellina* sp. (Páez-Osuna *et al.*, 1993), la almeja hidrotermal *Vesicomya gigas* (Ruelas-Inzunza *et al.*, 2003), así como en la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Méndez *et al.*, 2006; Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009; Cantú-Medellín *et al.*, 2009). También, se ha cuantificado la concentración de metales pesados en otros organismos invertebrados marinos tales como, el balano *Fistulobalanus dentivarians* (Ruelas-Inzunza & Páez-Osuna, 2000), el caracol chino rosado *Hexaplex erythrostomus* (García-Hernández *et al.*, 2005), el pulpo *Octopus hubbsorum* (Roldán-Wong *et al.*, 2017), el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Jara-Marini *et al.*, 2009), y en algunos vertebrados como la raya espinosa *Dasyatis disptera*, la guitarra *Rhinobatos productus*, *Zapteryx exasperata*, la raya eléctrica *Narcine entemedor* y la raya mariposa *Gymnura marmorata* (Ruelas-Inzunza *et al.*, 2013), el tiburón sedoso *Carcharhinus falciformis* (Terrazas-López *et al.*, 2016), el tiburón ángel del Pacífico *Squatina californica* (Escobar-Sánchez *et al.*, 2016), el pez vela *Istiophorus platypterus* (Bergés-Tiznado *et al.*, 2015) y algunos mamíferos marinos como la ballena gris *Eschrichtius robustus* y el cachalote *Physeter catodon* (Ruelas-Inzunza & Páez-Osuna, 2002), así como algunas macroalgas como *Padina durvillaei* (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2009), *Codium amplivesiculatum*, *Gracilaria textorii* y *Zostera marina* (Riosmena-Rodríguez *et al.*, 2010).

**Tabla 2.** Concentración de metales pesados en algunas especies de moluscos (bivalvos marinos, cefalópodos y macroalgas en costas del Golfo de California y el Pacífico mexicano. Los valores están expresados en mg kg<sup>-1</sup> de peso seco y corresponden a la media ± desviación estándar y en algunos casos al valor medio.

Especie	Localidad	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	Referencia
<b>Bivalvos</b>									
<i>Chione californiensis</i>	Golfo de Santa Clara, Sonora	0.42 ± 0.14	5.70 ± 0.84	189 ± 20	3.68 ± 0.48	4.4 ± 0.9	9.2 ± 1.5	–	Cadena-Cárdenas <i>et al.</i> (2009)
<i>Mytilus edulis</i>	Santa Rosalía, BCS	3.51 ± 0.23	17.1 ± 3.86	150 ± 24	0.84 ± 0.23	6.4 ± 0.70	4.8 ± 0.5	52.9 ± 4.8	
<i>Laevicardium elatum</i>	Mulegé, BCS	1.70 ± 0.47	3.9 ± 0.99	408 ± 52	1.21 ± 0.54	7.6 ± 1.3	< 0.03	62.4 ± 4.2	
<i>Megapitaria squalida</i>	Loreto, BCS	4.66 ± 0.14	181 ± 20	572 ± 132	2.93 ± 0.34	5.6 ± 0.5	< 0.03	49.8 ± 2.3	
	Bahía de La Paz, BCS	11.05 ± 1.24	7.53 ± 0.58	385.44 ± 31.2	4.33 ± 0.58	5.24 ± 0.62	0.31 ± 0.21	55.1 ± 3.97	Cantú-Medellín <i>et al.</i> (2009)
	Bahía de La Paz, BCS	7.0 ± 0.6	7.1 ± 0.4	258 ± 15	3.3 ± 0.7	5.1 ± 0.6	2.5 ± 0.8	49.5 ± 1.9	Méndez <i>et al.</i> (2006)
	Santa Rosalía, BCS	1.3 ± 0.06	14.6 ± 1.8	193 ± 5	3.7 ± 1.4	1.7 ± 0.04	0.24 ± 0.03	25 ± 1.4	Roldán-Wong <i>et al.</i> (2017)
<i>Mytella strigata</i>	Costas de Sinaloa	6.30 ± 2.17	24.88 ± 5.02	–	–	–	5.22 ± 1.37	67.0 ± 7.9	Frías-Espéricueta <i>et al.</i> (2008)
<i>Modiolus capax</i>	Bahía de Los Ángeles, BC	–	4.9	–	65.7	–	–	126	Gutiérrez-Galindo <i>et al.</i> (1999)

	Santa Rosalía, BCS	15	58.6	–	500	–	–	160	
<i>Crassostrea corteziensis</i>	Estero de Urías, Sinaloa	0.27 ± 0.08	46.0 ± 6.31	–	–	–	0.51 ± 0.14	348.0 ± 33.5	Jara-Marini <i>et al.</i> (2009)
<i>Pinna rugosa</i>	Bahía Kun Kaak, Sonora	3.61	1.60	–	–	–	–	17.63	García-Hernández <i>et al.</i> (2005)
<i>Anadara multicosata</i>		8.82	1.60	–	–	–	–	8.82	
<i>Saccrostrea iridescens</i>	Playa Cerritos, Sinaloa	3.6	20.4	93	9.4	1.7	–	402	Páez-Osuna & Marmolejo-Rivas (1990)
<i>Tellina</i> sp.	Altata-Ensenada de Pabellones, Sinaloa	6.0	119.0	895	27	3.8	–	66	Páez-Osuna <i>et al.</i> (1993)
<b>Cefalópodos</b>									
<i>Octopus hubbsorum</i>									
Manto	Santa Rosalía, BCS	< 0.13	25	10	1.3	< 0.13	< 0.77	58	Roldán-Wong <i>et al.</i> (2017)
	La Paz, BCS	< 0.13	20	9	0.9	< 0.13	< 0.77	64	
Glándula digestiva	Santa Rosalía, BCS	76	3296	314	17	1.3	6.2	877	
	La Paz, BCS	53	2104	454	6	2.4	2.7	802	
Corazones branquiales	Santa Rosalía, BCS	43	4	1028	52	263	<0.77	130	

Branquias	La Paz, BCS	12	2	618	11	186	<0.77	158	
	Santa Rosalía, BCS	0.7	136	91	7	0.8	<0.77	87	
	La Paz, BCS	0.4	130	44	6	0.3	<0.77	80	
<b>Algas</b>									
<i>Padina durvillaei</i>	Puerto minero de Santa Rosalía, BCS	3.6 ± 1.6	53 ± 38	2,243 ± 2,325	295 ± 269	10.0 ± 5.3	7.8 ± 6.2	63 ± 43	Rodríguez-Figueroa <i>et al.</i> (2009)
<i>Codium amplivesiculatum</i>	Bahía Magdalena, BCS	0.2	0.9	362.2	52.9	8	1.8	7	Riosmena-Rodríguez <i>et al.</i> (2010)
<i>Gracilaria textorii</i>		1.5	1.6	325	48.5	4.8	1.4	14.4	
<i>Zostera marina</i>		–	0.4	51.1	78.6	3.1	2.5	13.5	

---

## **Efectos en la reproducción relacionados al estrés por contaminantes en moluscos**

Las respuestas de los organismos hacia los contaminantes son muy variadas y se pueden presentar desde los primeros niveles de organización biológica (moléculas, orgánulo, célula, tejido), hasta nivel población y ecosistema (Van der Oost *et al.*, 2003). Desde el punto de vista de monitoreo ambiental, se han implementado diversas herramientas para evaluar los efectos biológicos de los contaminantes principalmente a nivel bioquímico, celular y fisiológico, ya que resultan una señal de alerta temprana para evaluar la salud de los organismos y en última instancia de la población y el ecosistema. A estas herramientas se les conocen como “biomarcadores” o “marcadores biológicos” los cuales se definen como un cambio o respuesta biológica que relaciona el grado de disfunción que el contaminante produce en tiempo o dosis a los organismos (Stegeman *et al.*, 1992).

Particularmente, la reproducción es una de las funciones más importantes de los sistemas vivos. Este proceso está estrechamente ligado a complejas interacciones entre las condiciones del medio ambiente circundante y procesos endógenos, las cuales van a regir el curso de esta función biológica. La inhibición de la reproducción en los organismos es considerada como uno de los efectos más nocivos que pueden inducir los contaminantes. Dada la importancia que presenta el proceso de reproducción, cada vez se hace más hincapié en determinar los efectos que el ambiente, y sobre todo los contaminantes puedan provocar en el éxito reproductivo y a su vez, estas respuestas son incorporadas a los programas de monitoreo ambiental.

### *Análisis histopatológico y alteraciones tisulares a nivel ultraestructura*

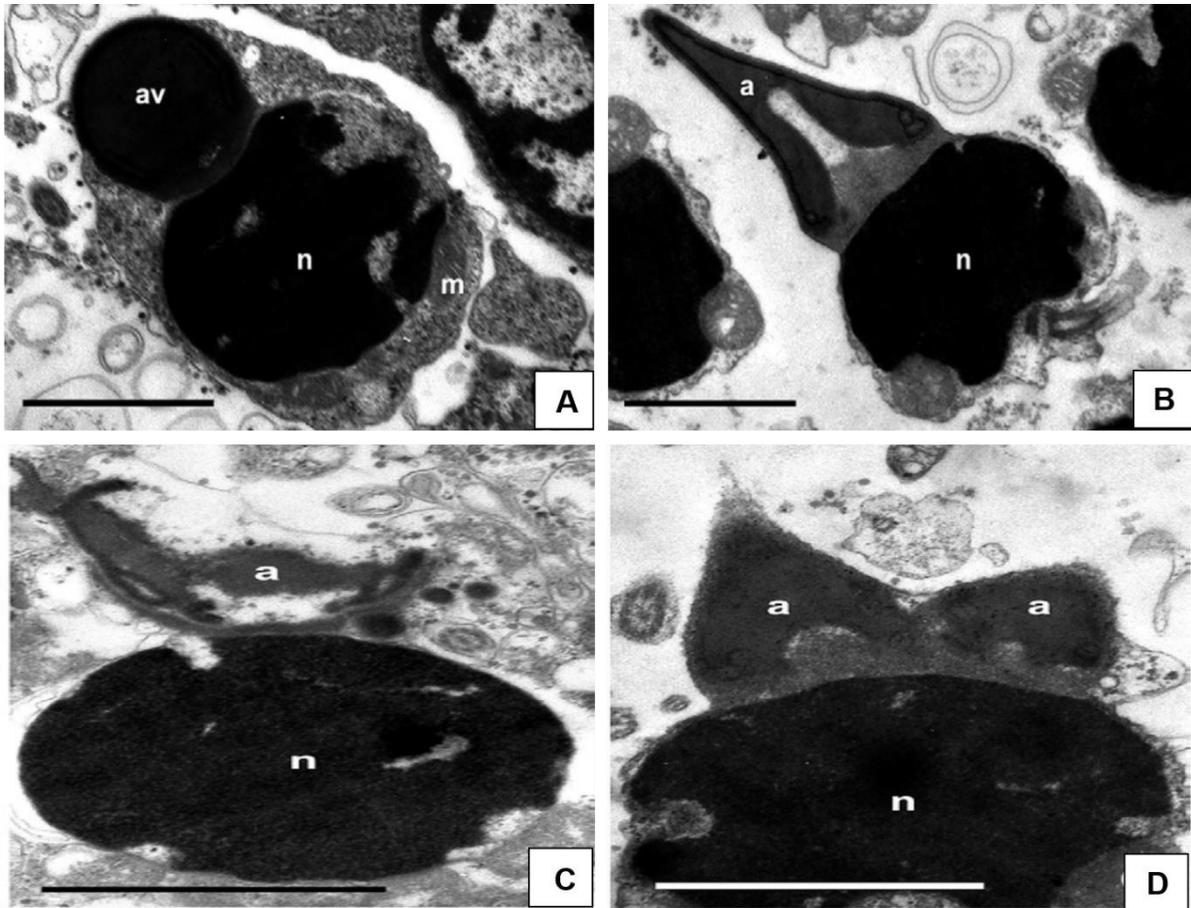
Las evaluaciones histopatológicas, ya sea a nivel ultraestructural o con histología convencional, son consideradas excelentes herramientas como indicadores de salud y de calidad ambiental, ya que reflejan los efectos de la exposición a una variedad de contaminantes (Costa *et al.*, 2013; Boscolo *et al.*, 2014). Además, es un método fácil de aplicar tanto a corto, como a largo plazo, el cual ha sido ampliamente utilizado en programas de monitoreo ambiental y es complementario a otras técnicas evaluadoras de efectos biológicos por contaminación.

La histopatología permite analizar las modificaciones estructurales patológicas a nivel celular y de tejidos. Los avances en la investigación histopatológica, han permitido discernir entre alteraciones causadas por enfermedades infecciosas u otros factores ambientales, de las provocadas por la exposición a contaminantes. La base de estos análisis es el cambio bioquímico o fisiológico provocado por un contaminante en los organismos, y que deriva en la formación de una lesión o daño en las células, tejidos u órganos (Frías-Espéricueta *et al.*, 2008). En la Tabla 3, se enumeran algunas de las alteraciones histopatológicas más comunes relacionadas con contaminantes en distintos moluscos.

**Tabla 3.** Alteraciones histopatológicas de algunos moluscos relacionadas con diversos contaminantes.

Especie	Contaminantes	Efectos histopatológico	Referencia
<b>Gasterópodos</b> <i>Nacella concinna</i>	Cd	<b>Glándula digestiva:</b> Pérdida de células digestivas e intensa infiltración hemocítica.	Najle <i>et al.</i> (2000)
<b>Bivalvos</b> <i>Mytilus edulis</i>	PAHs	<b>Glándula digestiva:</b> Atrofia de los túbulos digestivos e infiltración hemocítica.	Ruiz <i>et al.</i> (2014)
<i>Perna viridis</i>	Metales pesados	<b>Branquias:</b> Infiltración hemocítica, necrosis, hipertrofia, ruptura de la capa epitelial. <b>Glándula digestiva:</b> Células necróticas, ruptura de los túbulos digestivos e infiltración hemocítica. <b>Músculo aductor:</b> Degeneración del tejido conectivo, vacuolización, separación de las fibras musculares.	Vasanthi <i>et al.</i> (2012)
<i>Crassostrea rizophorae</i>	Mezcla de contaminantes	<b>Branquias:</b> Decremento en el número de cilios, hiperplasia, hipertrofia, necrosis y fusión de los filamentos branquiales.	Valdez <i>et al.</i> (2007)
<i>Crassostrea angulata</i>	Cu	<b>Branquias:</b> Desorganización del tejido conectivo, alteraciones en las células ciliadas y fusión de los filamentos branquiales. <b>Glándula digestiva:</b> Adelgazamiento del epitelio y dilatación de los túbulos digestivos.	Rodríguez de la Rúa <i>et al.</i> (2005)
<i>Macoma balthica</i>	Metales pesados	<b>Glándula digestiva:</b> Presencia de macrófagos, dilatación de los túbulos digestivos y necrosis de las células digestivas. <b>Gónada:</b> Agregación de macrófagos, necrosis del tejido conectivo y atresias de las células gaméticas.	Tay <i>et al.</i> (2003)
<i>Ostrea edulis</i>	Hg	<b>Branquias:</b> Retracción celular, lisis celular e hipertrofia.	Bigas <i>et al.</i> (2001)

Los análisis a nivel ultraestructural sirven como parámetros para la determinación de alteraciones en los orgánulos celulares. Estas herramientas son reconocidas como piezas importantes para la evaluación de los efectos por contaminantes a niveles mucho más finos que la histología convencional. Particularmente en moluscos bivalvos, existen muchos estudios de alteraciones a nivel ultraestructura relacionadas a diversos contaminantes. Park & Lee (2010), analizaron la toxicidad del cloruro de tributil estaño sobre la ultraestructura de la glándula digestiva de *Gomphina veneriformis*. Estos autores reportan la presencia de lisosomas anómalamente alargados y malformaciones en las mitocondrias. Por su parte, Yurchenko & Vaschenko (2010) analizaron el proceso de espermatogénesis del mejillón *Modiolus kurilensis* en un ambiente contaminado, principalmente por PAHs. Ellos encontraron diversas alteraciones, sobre todo en el desarrollo de los espermatozoides y reportaron la presencia de malformaciones en los componentes de estas células, tales como la destrucción del acrosoma y la ocurrencia de espermatozoides con doble acrosoma (Fig. 5).

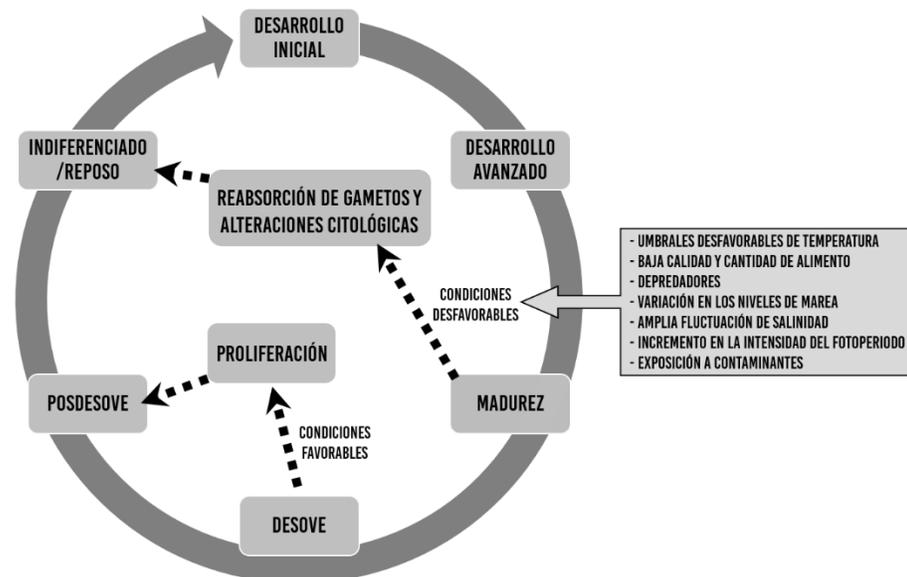


**Figura 5.** Ultraestructura de células espermatogénicas del mejillón *Modiolus kurilensis* en un ambiente contaminado. A) Espermátida conteniendo el núcleo (n), vesícula acrosomal (av) y mitocondria (m). B) Espermatozoide maduro conteniendo el núcleo (n) y el acrosoma (a). Ambas micrografías corresponden a organismos de zonas control. C) Espermatozoide con el acrosoma destruido (a), núcleo (n). D) Espermatozoide con doble acrosoma (a), núcleo (n). Escala: 2  $\mu$ m. Imagen tomada de Yurchenko & Vaschenko (2010).

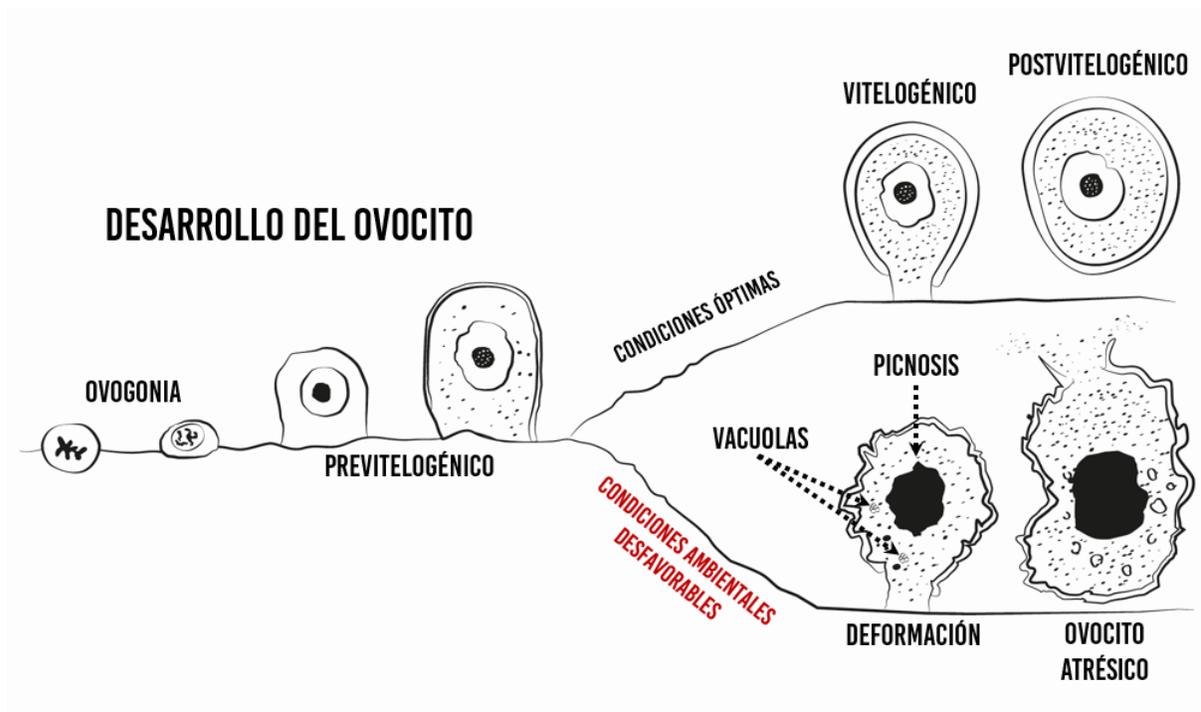
### *Gametogénesis*

La gametogénesis es el proceso en el cual se da la formación y la proliferación de las células gaméticas, tanto óvulos (ovocitos en invertebrados) como espermatozoides. En un proceso normal y bajo condiciones ambientales óptimas, la diferenciación celular en la ovogénesis y la espermatogénesis dará lugar a células sexuales viables que serán expulsadas durante el desove (Román *et al.*, 2001). Es un

evento crucial en lo que respecta a la viabilidad y desarrollo de los gametos. Se sabe que las condiciones ambientales pueden modificar el desarrollo gametogénico, el cual puede tomar distintas rutas dependiendo de la señal ambiental (Fig. 6). Cualquier anomalía en la gametogénesis va a repercutir en la reproducción de los organismos. Por ejemplo, la formación de los ovocitos en los bivalvos se puede generalizar en tres etapas muy bien diferenciadas: la etapa premeiótica, en la cual las células germinales dan origen a las ovogonias adheridas a las paredes de los folículos; etapa previtelogénica, donde las ovogonias entran en división meiótica y dan lugar a los ovocitos previtelogénicos; y la etapa vitelogénica, en donde los ovocitos inician la vitelogénesis y llegan a su máxima maduración (y tamaño) (Román *et al.*, 2001). Sin embargo, tanto el crecimiento como la maduración de los ovocitos van a depender de las condiciones ambientales, que cuando son adversas, pueden interferir en la formación normal de los gametos (Fig. 7) y reducir el éxito reproductivo (Barber & Blake, 2006; Vaschenko *et al.*, 2013). En especímenes expuestos a contaminantes, se ha reportado que el desarrollo de los gametos se inhibe por diferentes alteraciones (metabólicas y fisiológicas), por lo tanto se modifica la capacidad reproductiva (Barber & Blake, 2006).



**Figura 6.** Rutas generales del ciclo gametogénico en molusco bivalvos tanto en condiciones ambientales favorables, como en condiciones desfavorables (Modificado de Arellano-Martínez, 2005).



**Figura 7.** Desarrollo del ovocito en bivalvos. En condiciones ambientales óptimas, el ovocito crece de manera normal y llega a su máxima madurez como ovocito postvitelogénico. En condiciones ambientales desfavorables, se pueden presentar alteraciones tales como núcleo picnótico, vacuolas en el citoplasma y deformación de la célula, así como atresia ovocitaria y ruptura del ovocito. (Modificado de Duinker, 2002).

### *Ciclo reproductivo*

Distintas características reproductivas son analizadas para conocer de manera más amplia e integral como es este proceso en los organismos. Dentro de los parámetros más comunes se encuentra el ciclo reproductivo, el cual está representado por la frecuencia de aparición de las fases gametogénicas que por lo general, consta de una fase vegetativa, proliferación de células, madurez, desove o expulsión de gametos y reposo. En ambientes contaminados, se ha determinado que los ciclos reproductivos pueden verse modificados, ya sea en tiempo, sincronización, aparición y duración de cada fase reproductiva. Por ejemplo, Mouneyrac *et al.* (2008), analizaron el ciclo reproductivo del bivalvo *Scrobicularia plana* provenientes de tres sitios con diferente grado de contaminación. Ellos encontraron un ciclo reproductivo similar en

las tres zonas; sin embargo, en la zona más impactada el periodo de desove fue menos intenso. En *Donax trunculus*, se comparó el ciclo reproductivo de organismos provenientes de una zona contaminada principalmente por PCBs y una zona de referencia. Se encontró que los organismos de la zona de referencia presentan dos temporadas reproductivas al año, a diferencia de la zona contaminada, en donde los organismos solo presentan un solo pico reproductivo. Lo anterior indica que las posibles interferencias de los contaminantes sobre la producción de gametos retrasan la fase de madurez (Tlili *et al.*, 2011). Por su parte, Ruiz *et al.* (2011) evaluaron el efecto de los PAHs sobre el ciclo reproductivo del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y reportaron un periodo de reposo amplio en los organismos de la zona contaminada en comparación con zonas de referencia, en donde los ciclos se presentaron continuos. Izaguirre *et al.* (2014), analizaron el estado de salud del mejillón *M. galloprovincialis* en dos sitios costeros de la Bahía de Galicia, España, que fueron afectados por el derrame de petróleo del buque “Prestige”. Ellos encontraron una diferenciación marcada entre los ciclos reproductivos, ya que en la zona más cercana al derrame se presentó un ciclo con un amplio periodo de reposo, en contraste en la zona menos impactada se presentó un periodo de desove continuo.

### *Integridad gamética*

El análisis de la morfología e integridad de los productos gametogénicos se ha tomado como una medida cualitativa de la salud y viabilidad de los gametos, así como la capacidad reproductiva. Regularmente, la integridad gamética se mide por medio de observaciones histológicas con la finalidad de evidenciar algún tipo de anomalía o alteración a nivel celular y de tejido. En muchos estudios sobre biomarcadores de efectos por contaminantes, este tipo de análisis es sumamente utilizado, relativamente fácil de medir y resulta un indicador sensible de exposición y efecto por contaminantes. Por ejemplo, Baussant *et al.* (2011) reportaron una alta prevalencia de ovocitos atrésicos y de material gonádico desintegrado en el mejillón azul *Mytilus edulis* expuesto a 0.25 mg L<sup>-1</sup> de petróleo, comparado con un control. En otra especie de mejillón (*M. galloprovincialis*), se reportó un alto porcentaje de folículos gonadales con infiltración de células neoplásicas (multiplicación anormal de células) en el tejido

conectivo, procesos de fibrosis (lesión) y alta prevalencia de núcleos celulares picnóticos (indicativo de comienzo necrótico) correlacionadas con concentraciones de PAHs (Ruiz *et al.*, 2011). Puy-Azurmendi *et al.* (2010), reportaron altas prevalencias de distintas alteraciones histológicas en la gónada de *M. galloprovincialis* y *Crassostrea* sp. en diferentes localidades con sedimentos contaminados por diversos compuestos orgánicos. Las alteraciones más frecuentes fueron los ovocitos atrésicos (se formaron masas de ovocitos dañados), necrosis gonádica y alta infiltración de hemocitos dentro de los folículos. Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville (2006), expusieron mejillones a una mezcla de contaminantes orgánicos y analizaron el cambio gradual en las características del material gamético. Ellos reportan que al exponerlos al bisfenol ocurre un proceso de reabsorción gonadal tanto en hembras como en machos.

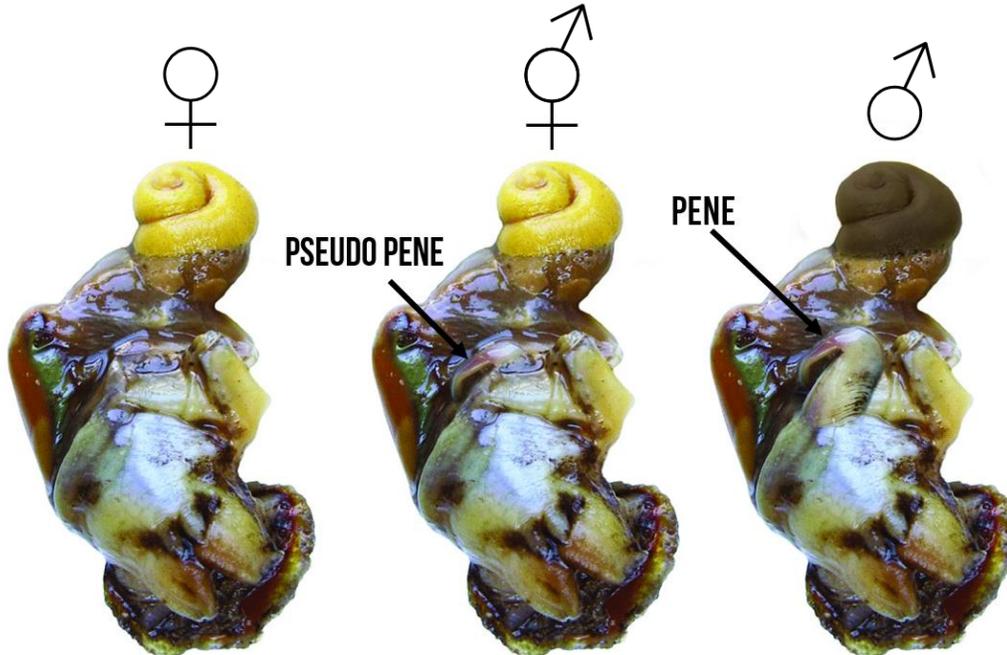
#### *Proporción de sexos*

La proporción de sexos es la relación entre el número total de hembras y el número total de machos de una población. Este parámetro es utilizado en diversos estudios de aspectos reproductivos y proporciona una medida de estructura poblacional. Por lo regular, en poblaciones de organismos marinos la proporción es 1 a 1, es decir, hay una hembra por cada macho presente. Esta estructura se puede ver modificada debido a presiones del ambiente que en conjunto con variables endógenas, van a dar lugar a que se presente en mayor proporción un sexo en específico. Por ejemplo, Gagné *et al.* (2003) reportaron que la proporción de sexos de la almeja *Mya arenaria* se ve sesgada significativamente hacia los machos, como posible efecto del tributil estaño.

#### *Incidencia de hermafroditismo e imposexo*

Los animales exhiben una amplia variación y formas en su sexualidad. Específicamente, los organismos marinos en su mayoría son esencialmente gonocóricos (sexos separados); sin embargo, algunos grupos experimentan cambios en su sexualidad ya sea de manera accidental o por característica propia de la especie. La ocurrencia del hermafroditismo accidental se atribuye a las desviaciones del desarrollo durante la diferenciación sexual (Coe, 1943). En este sentido, se ha

comprobado que a causa de la exposición a contaminantes los organismos pueden presentar modificaciones en su sexualidad, que van desde la transformación de un sexo a otro (protándricos: cambio de macho a hembra y protogínicos: cambio de hembra a macho) o compartir los dos tipos sexuales funcionales dentro del mismo organismo. Por ejemplo, Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville (2010) reportaron una prevalencia relativamente alta (50% de los organismos muestreados presentaron hermafroditismo) en el mejillón *M. galloprovincialis* proveniente de una zona costera contaminada por PAHs. Cabe destacar, que esta especie ha sido reportada en muchos trabajos como gonocórica y que la alta incidencia de hermafroditismo se debe a que los contaminantes actúan como disruptores endocrinos provocando así la producción de una u otra hormona (femenina o masculina). Smaoui-Damak *et al.* (2006), analizaron el efecto de la contaminación por Cd en la reproducción de la almeja *Ruditapes decussatus*, la cual es estrictamente de sexos separados y reportaron un 6.6% de hermafroditas atribuible al efecto del Cd. El fenómeno del “imposexo” se presenta principalmente en gasterópodos prosobranquios (Zhou *et al.*, 2008). Este fenómeno se caracteriza por la formación de un pene y/o conducto deferente en hembras de especies de caracoles estrictamente gonocóricas (sexos separados) (Fig. 8), el cual bloquea gradualmente el oviducto hasta llegar a la esterilidad y en muchos casos hasta la muerte y por consiguiente cambios a nivel poblacional (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2002). La inducción específica de esta alteración por contaminantes orgánicos ha sido comprobada en pruebas de laboratorio y en campo, en donde muestran la estrecha relación entre el grado de imposexo y los niveles de tóxicos en el ambiente (Zhou *et al.*, 2008). Al ser una respuesta específica a ciertos contaminantes, el uso de esta anomalía como marcador ha sido utilizado ampliamente en muchos programas de monitoreo ambiental.

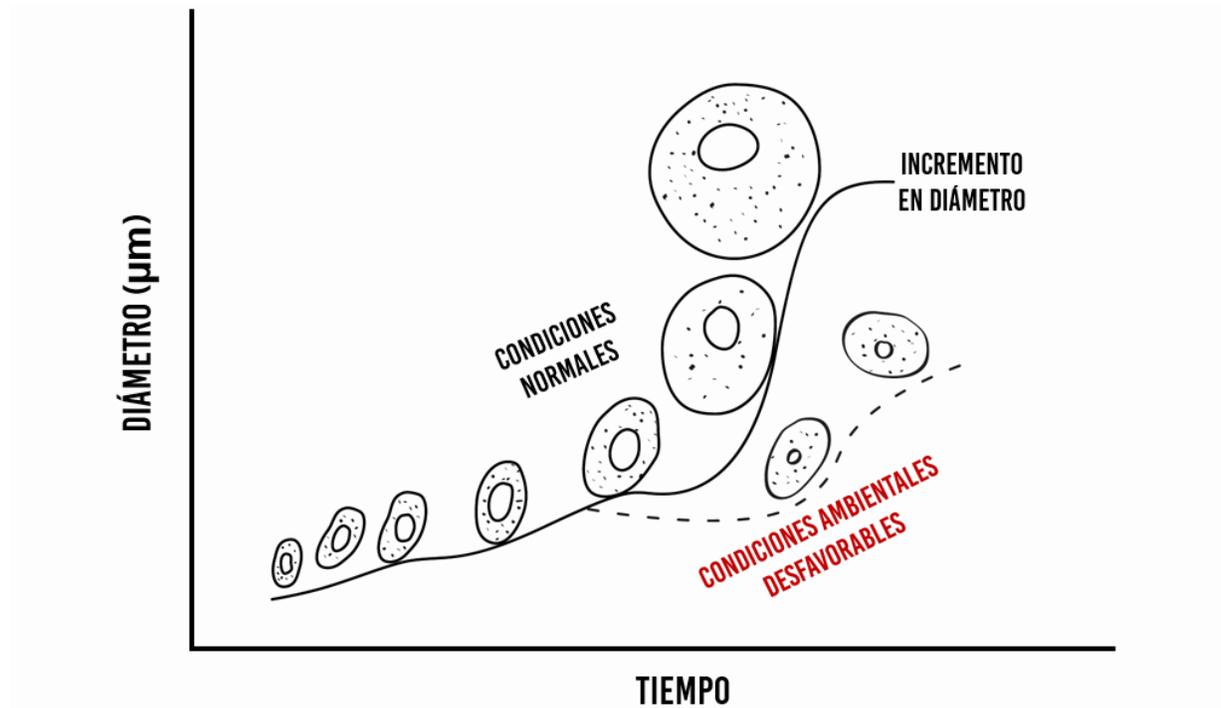


**Figura 8.** Fenómeno de imposexo manifestado en *Rapana venosa* como consecuencia de la exposición a tributilestaño. (Tomado de Zhou *et al.*, 2008).

#### *Diámetro de ovocitos*

El ovario tiene como función primordial generar las células femeninas, en los cuales ocurre la elaboración del material nutritivo (vitelo) esencial para el desarrollo embrionario. El diámetro de los ovocitos es una medida cuantitativa para caracterizar a estas células gaméticas. Se asume que un ovocito tamaño grande y buena forma, es funcionalmente viable y por lo tanto, repercutirá también en la viabilidad de las larvas. En condiciones ambientales óptimas, el ovocito crece de manera normal y aumenta su diámetro hasta llegar a su máxima madurez (ovocito postvitelogénico) para posteriormente ser desovado; sin embargo, en condiciones desfavorables, se pueden presentar diámetros de los ovocitos más bajos (Fig. 9). Como ya se mencionó anteriormente, cualquier alteración en la integridad de los ovocitos se verá reflejada en el desarrollo y en la capacidad reproductiva de las especies. Binelli *et al.* (2004) caracterizaron a los ovocitos del mejillón zebra *Dreissena polymorpha* provenientes de

una zona contaminada por DDT. Se encontró que los organismos con mayores concentraciones de contaminantes presentaron diámetros de ovocitos significativamente más bajos y se le atribuyó a un retraso en la maduración de los ovocitos debido a la inferencia del DDT. Por su parte, Lowe & Pipe (1988) encontraron disminuciones en el diámetro de los ovocitos de *Mytilus edulis* expuesto a diversas concentraciones de contaminantes (PAHs, PCBs y metales pesados). Además, se presentó una alta prevalencia de ovocitos degenerados.



**Figura 9.** Crecimiento (diámetro) de los ovocitos en el tiempo. La línea continua representa el incremento de los ovocitos en condiciones normales. La línea punteada representa el crecimiento de los ovocitos bajo condiciones ambientales desfavorables. (Modificado de [www.biologydiscussion.com](http://www.biologydiscussion.com)).

#### *Talla de madurez*

La talla a la que por lo menos el 50% de los organismos de una población se encuentra reproductivamente madura (en actividad reproductiva) es conocida como talla de primera madurez. Ésta se calcula a partir de las frecuencias de los organismos sexualmente maduros (adultos) y se ajustan a un modelo logístico. Esta medida se

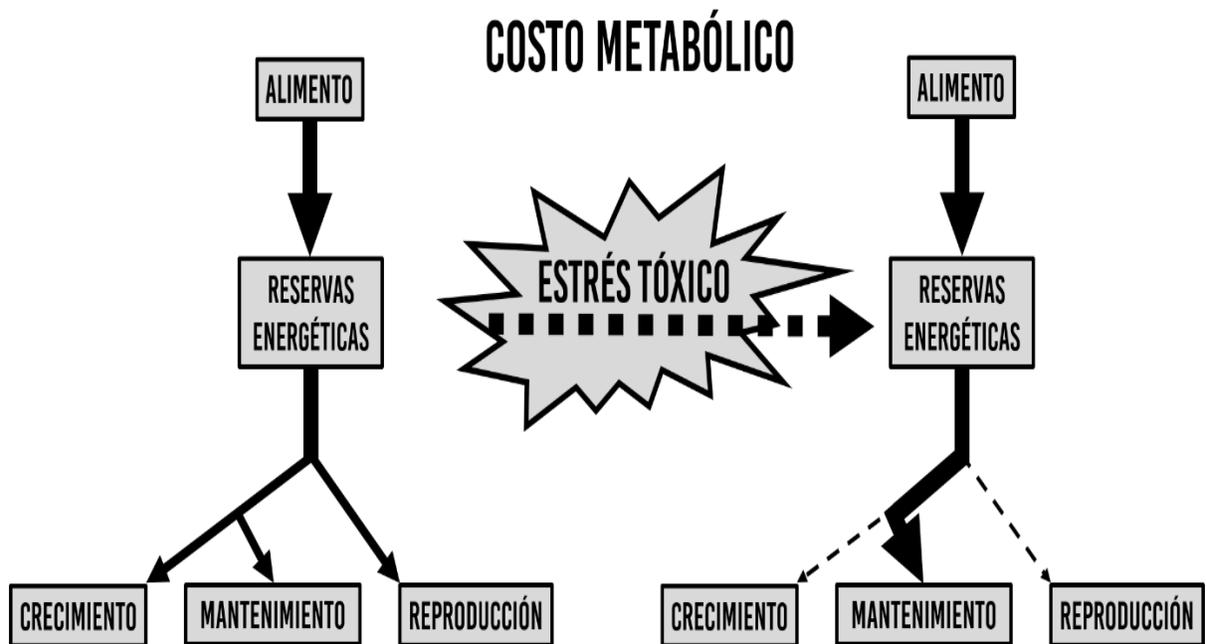
utiliza comúnmente para establecer la talla mínima de captura en programas de manejo pesquero, el cual resulta un parámetro importante para regular el esfuerzo pesquero en muchas especies de importancia comercial. La talla mínima de captura debe ser mayor que la talla de primera madurez para así garantizar que los individuos puedan reproducirse al menos una vez, asegurando así un stock parental lo suficientemente grande para mantener la población. Al estar directamente relacionadas con la actividad reproductiva, las alteraciones en la madurez sexual tendrán un impacto sobre la talla de primera madurez. Por ejemplo, Gauthier-Clerc *et al.* (2002) se basan en la hipótesis de que hay un retraso en la maduración sexual de *Mya arenaria* debido al efecto de los contaminantes provenientes de una marina y aguas residuales municipales, los cuales afectan la producción hormonal involucrada en la activación de la madurez. Lo anterior tendrá efectos en la talla de madurez, ya que al retrasar el proceso de la maduración los organismos seguirán creciendo normalmente hasta alcanzar cierta talla (talla supuesta de un adulto), pero no estarán listos para reproducirse.

### *Fecundidad*

La fecundidad es considerada un carácter adaptativo que mide el potencial reproductivo de una población que, por lo regular, es cuantificado por el número de gametos o huevos producidos, así como la subsecuente sobrevivencia desde el huevo al adulto. El conocimiento de las variaciones en la fecundidad resulta de importancia primordial en el manejo de pesquerías, debido a que se puede determinar el número de individuos necesarios para mantener un stock a nivel sostenible. McDowell *et al.* (1999) analizaron los efectos de algunos contaminantes orgánicos en la reproducción de *Mytilus edulis* y *Mya arenaria* y reportaron que la fecundidad se reduce, así como la viabilidad de las larvas y el desarrollo embrionario. Mencionan que probablemente, los contaminantes están interfiriendo en las reservas energéticas de los bivalvos y, por consiguiente, la producción de huevos se ve afectada.

### *Metabolismo energético*

El análisis de la composición bioquímica de distintos tejidos proporciona información sobre el nivel energético que presenta un organismo. Por lo general, esta energía es almacenada en forma de lípidos, carbohidratos y proteínas, para que en cualquier evento de alta demanda energética éstas sean movilizadas y utilizadas. Las variaciones en el almacenamiento y utilización de reservas energéticas están estrechamente ligadas con procesos como la reproducción y variables ambientales como la disponibilidad de alimento (Barber & Blake, 2006). La reproducción es un proceso que demanda una gran cantidad de energía y está fuertemente ligado a ciclos de almacenamiento y uso de reservas energéticas (Bayne, 1976; Barber & Blake, 1991). Aunque ambas actividades metabólicas están reguladas por factores ambientales naturales como la temperatura y la disponibilidad de alimento, la exposición a contaminantes puede interferir y con frecuencia dar lugar al agotamiento de las reservas energéticas como resultado del alto costo de la homeóstasis (activación de mecanismos de defensa y/o reparación) y del gasto energético del proceso de desintoxicación, lo que podría conducir a una reducción de la energía destinada para la reproducción y a su consecuente deterioro (Voets *et al.*, 2006; Giarratano *et al.*, 2010). Es decir, desde un punto de vista teórico, un organismo activo tiene una cierta cantidad de energía disponible que obtiene a través de su alimentación y que posteriormente invertirá en el crecimiento somático, mantenimiento o reproducción. Sin embargo, al estar sometidos a un estrés tóxico, los organismos canalizan mayormente la energía para mantener la homeóstasis (Fig. 10) (Smolders *et al.*, 2005). Ketata *et al.* (2007) analizaron los niveles de proteínas, lípidos y glucógeno en *Ruditapes decussatus* con relación a niveles de Cd en los tejidos y observaron una disminución en el estatus energético (principalmente de lípidos y glucógeno). En la tellina (*Donax trunculus*), se presentaron concentraciones significativamente más bajas de glucógeno y lípidos en las zonas con mayor grado de contaminación (Tlili *et al.* 2011). Por su parte, Mouneyrac *et al.* (2008), observaron concentraciones de glucógeno significativamente más bajas en la glándula digestiva de *Scrobicularia plana* de una zona contaminada, esto en comparación con organismos de una zona control.



**Figura 10.** Esquema general del costo metabólico; en presencia de un contaminante, se destinará una mayor cantidad de energía hacia el mantenimiento básico de los organismos expuestos, dejando menos energía disponible para el crecimiento y la reproducción. (Modificado de Smolder *et al.*, 2005).

### **Generalidades de la almeja chocolata *Megapitaria squalida***

*Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) es llamada comúnmente “almeja chocolata” o “almeja chocolata café” (Fig. 11). Pertenece a Phylum Mollusca, Clase Bivalvia y a la familia Veneridae (Brusca & Brusca, 2002). Se distribuye desde Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur (incluyendo el Golfo de California), hasta las costas de Macora, Perú (Keen, 1971). Presenta una concha relativamente gruesa y alargada anteroposteriormente, de color café y con un perióstraco brillante (Baqueiro & Stuardo, 1977).



**Figura 11.** Ejemplar de *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835). (Foto: Josué Yee).

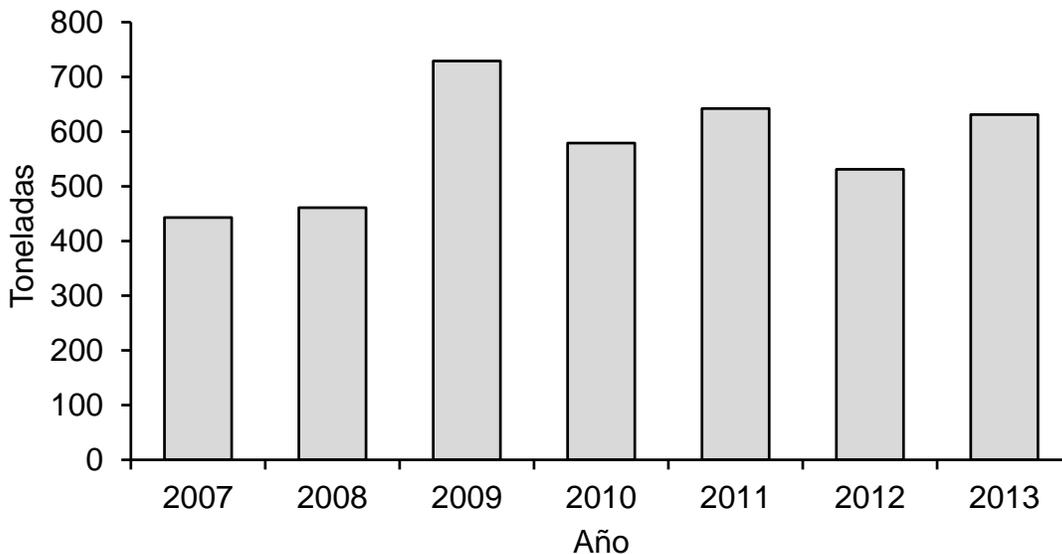
Se distribuye cerca de la línea de costa, sobre fondos arenosos y lodosos enterrada en el sedimento, a profundidades de entre 1 y 15 m cerca a la costa (Poutiers, 1995) y hasta los 120 m fuera de ésta (Singh *et al.*, 1991, Poutiers, 1995). Llega a formar grandes bancos y alcanza densidades de 0.04–10 individuos/m<sup>2</sup> (Baqueiro & Stuardo, 1977), 1–3 individuos/m<sup>2</sup> (Gutiérrez-Barrera *et al.*, 1999) o de 1.81–2.45 individuos/m<sup>2</sup> (Schweers *et al.*, 2006), dependiendo del sitio donde se encuentre. Es una especie relativamente longeva (edad estimada entre 6 y 7 años), con un crecimiento lento y tallas máximas reportadas de 120 mm de longitud de concha (Singh *et al.*, 1991; Schweers *et al.*, 2006).

### ***Megapitaria squalida* como recurso pesquero**

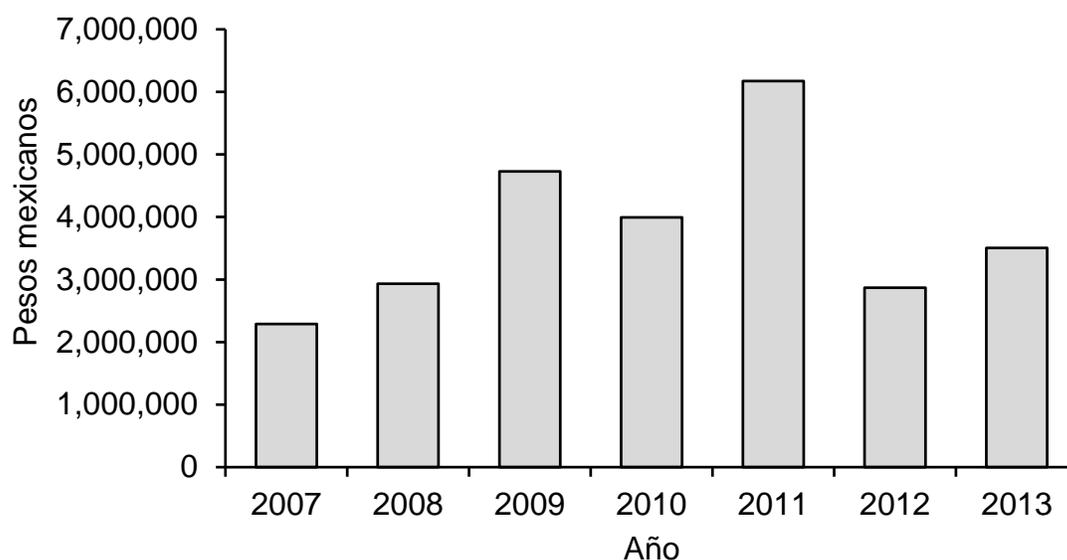
La captura de moluscos bivalvos en Baja California Sur (exceptuando las familias Ostreidae y Mytilidae) representa 78% del total de capturas de este recurso en México (SAGARPA, 2006). Según la Carta Nacional Pesquera (SAGARPA, 2004), la almeja chocolate *Megapitaria squalida* ocupó el tercer lugar en capturas en Baja California Sur durante el periodo 1966–2001 con 10.5%, ubicándose solo por debajo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (54.5%) y de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (11.1%), y por encima de la almeja pata de mula *Anadara*

*tuberculosa* (9.5%) y de las hachas *Pinna rugosa* y *Atrina maura* (3.3%) (López-Rocha *et al.*, 2010).

Las principales zonas de captura comercial de *M. squalida* en Baja California Sur están representadas por seis regiones: en la costa occidental destaca la Laguna Ojo de Liebre, Laguna San Ignacio y Bahía Magdalena-Almejas; en la costa oriental se pesca principalmente en Bahía de La Paz, Bahía de Loreto y Santa Rosalía (López-Rocha *et al.*, 2010). De 1999 a 2006 se capturaron 8,014 t de almeja chocolata en Baja California Sur: Bahía de La Paz (36.0%), Laguna Ojo de Liebre (34.5%), Bahía Magdalena (25.0%), Bahía de Loreto (2.8%), Laguna San Ignacio (1.4%) y Santa Rosalía (0.3%). *M. squalida* se comercializa como almeja entera (\$ 0.29 dólares/kg) o sin concha (\$1.42 dólares/kg) y se ha estimado un valor total de captura (1996-2006) de \$2,214,000 dólares (Romo-Piñera, 2010). Del 2007 al 2013, la producción en peso vivo (con todo y concha) ha variado en un intervalo entre 443,817 y 729,870 kg (producción total en BCS) (Fig. 12) y un valor de producción entre \$2,290,019 y \$6,174,230 (Fig. 13) (CONAPESCA, 2014).



**Figura 12.** Producción en peso vivo (toneladas) de almeja chocolata *Megapitaria squalida* con concha en Baja California Sur, México.



**Figura 13.** Valor de producción (\$) de la captura de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* en Baja California Sur, México.

### 3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la importancia de las zonas costeras y las comunidades bentónicas, durante los últimos 30 años estas zonas se han convertido en receptores de todo tipo de contaminantes generados por actividades industriales, agrícolas, petroleras, de extracción minera, domésticas, portuarias y turísticas, lo que ha provocado alteraciones ecológicas y ha contribuido en la degradación de estos ecosistemas (García-Gasca *et al.*, 2010). En ocasiones, estas actividades incrementan las concentraciones de ciertos componentes que ocurren naturalmente y que llegan a ser tóxicos para la biota marina en altos niveles; dichos contaminantes pueden ser acumulados por la biota y ser transferidos a la cadena trófica hasta llegar a los niveles más altos incluido el ser humano.

Particularmente, las comunidades bentónicas son altamente susceptibles y sensibles a las alteraciones inducidas por agentes contaminantes. En ellas coexisten una gran cantidad de grupos particularmente de macroinvertebrados que pasan la mayor parte de su desarrollo en la zona bentónica y dependen totalmente de las condiciones que imperen en ese ambiente. De manera específica, los moluscos

bivalvos son de los grupos mayormente afectados ya que su forma de vida sésil, su tipo de alimentación y su hábitat cercano a la costa, los hace muy vulnerables al impacto de la contaminación marina. Uno de los efectos más devastadores que puede inducir los contaminantes es la inhibición de la reproducción, ya que se pone en riesgo el éxito reproductivo y en general la permanencia de la especie.

La almeja chocolate *M. squalida* es uno de los bivalvos más abundantes en Baja California Sur y destaca por presentar una gran importancia como recurso pesquero debido a su alta demanda de consumo a nivel local y regional. Esta almeja se encuentra en la zona costera del puerto minero de Santa Rosalía, el cual está bien documentado que es un sitio altamente contaminado por metales pesados en sus sedimentos marinos (Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). A pesar de la clara evidencia de contaminación en la zona costera de Santa Rosalía y la importancia de la almeja chocolate como recurso pesquero, no existen estudios que evalúen su salud reproductiva. Además, aunque existen algunos estudios que han analizado la concentración de metales pesados en esta almeja, éstos no han determinado si los metales tienen algún impacto biológico sobre el organismo. Bajo ese contexto, es fundamental hacer estudios que proporcionen información sobre el estado de salud de los organismos y que permitan administrar adecuadamente sus zonas costeras, para evitar un deterioro ambiental y así preservar sus recursos, que son una fuente primordial de desarrollo.

#### **4. OBJETIVOS**

##### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la salud reproductiva de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía, Baja California Sur, México a través del análisis del índice de condición y relaciones alométricas, además del análisis histopatológico de la gónada, características reproductivas y de reservas energéticas.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la condición fisiológica general de *M. squalida* mediante análisis de tallas, índice de condición y relaciones peso–longitud.

- Analizar la presencia de parásitos en la gónada de *M. squalida* y evaluar el efecto en su salud reproductiva.
- Analizar la ocurrencia de neoplasia en la gónada de *M. squalida* y su repercusión en la reproducción.
- Evaluar el estado de salud del tejido gonádico de la almeja chocolata *M. squalida* mediante un análisis histopatológico.
- Examinar los efectos potenciales de la exposición a largo plazo a la contaminación por metales pesados sobre algunas respuestas reproductivas (ciclo reproductivo, diámetro de los ovocitos) y bioquímicas (reservas energéticas de carbohidratos, lípidos y proteínas) de *M. squalida*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los materiales y métodos de cada objetivo específico se encuentran descritos en cada capítulo.

## 6. RESULTADOS

---

### CAPÍTULO 1

---

#### CONDICIÓN DE SALUD GENERAL DE *Megapitaria squalida* EN COSTAS DE BAJA CALIFORNIA SUR

Este capítulo fue publicado bajo la siguiente referencia:

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez, B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. 2017. **EVIDENCE OF HEALTH IMPAIRMENT IN *Megapitaria squalida* (BIVALVIA: VENERIDAE) NEAR THE “HOT SPOT” OF A MINING PORT, GULF OF CALIFORNIA.** *Hidrobiológica*. 27: 1–8.

## RESUMEN

Se sabe que los organismos que habitan zonas marinas contaminadas pueden experimentar efectos fisiológicos adversos. El puerto de Santa Rosalía, Golfo de California, se caracteriza por presentar altas concentraciones de metales pesados en los sedimentos, particularmente Cu, Zn, Co, Mn, Pb y U, los cuales son potencialmente tóxicos para la biota marina. También, este puerto recibe aguas residuales urbanas que contribuyen a la contaminación orgánica de la zona costera. El principal objetivo de este trabajo fue determinar si las almejas de la región minera presentan efectos adversos como resultado de la contaminación. A través del análisis de parámetros biométricos, el índice de condición y la relación peso–longitud, se evaluó la salud general de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* en la zona costera del puerto de Santa Rosalía y se compararon con datos de almejas de cuatro áreas libres de minería. Los resultados revelaron que las almejas de Santa Rosalía tienen salud deteriorada, evidenciada por su menor tamaño, baja condición y un crecimiento alométrico negativo en comparación con las almejas de todos los otros sitios, incluyendo San Lucas, un sitio localizado a pocos kilómetros del punto de contaminación y donde las condiciones de temperatura y disponibilidad de alimentos son similares a las del área portuaria. Todo lo anterior sugiere efectos fisiológicos negativos de esta especie, posiblemente causados por la contaminación por metales. Particularmente, es probable que *M. squalida* en el sitio minero destine más energía para depurar o almacenar metales, lo que a su vez conduce a una condición más pobre y un crecimiento deficiente.

**Palabras clave:** bivalvos, condición fisiológica, índice de condición, contaminación por metales pesados, relaciones peso–longitud.

## INTRODUCCIÓN

Se ha comprobado que los organismos que habitan en ambientes contaminados por metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, etc., pueden presentar efectos adversos en su condición fisiológica (Mazik *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2014; Rzymiski *et al.*, 2014; Saghali *et al.*, 2014). Los índices biológicos o somáticos y las relaciones peso-longitud son algunas de las herramientas más utilizadas para evaluar la condición general de salud (estado nutricional y de reservas energéticas) y actividad fisiológica (crecimiento, reproducción, etc.) de los organismos, ya que proporcionan información sobre los efectos del estrés, de factores ambientales y contaminación sobre la biota (Bayne *et al.*, 1979; Lucas & Beninger, 1985; Filgueira *et al.*, 2013). Algunas ventajas de estos indicadores son su bajo costo y la obtención rápida de los resultados de análisis. Estas mediciones son representativas y sensibles a cambios ambientales, por lo cual son muy útiles para elaborar un diagnóstico inicial de la condición fisiológica de organismos que habitan zonas contaminadas (Lawrence & Scott, 1982; Van der Oost *et al.*, 2003; Mercado-Silva, 2005).

El puerto de Santa Rosalía, situado dentro del Golfo de California, en la parte central de la costa oriental de la península de Baja California, México, es una zona que presenta altas concentraciones de metales pesados en los sedimentos y suelos asociadas con las actividades de minería y fundición del cobre que se realizaron durante casi un siglo (Wilson & Rocha, 1955; Huerta-Díaz *et al.*, 2014). La contaminación de los sedimentos marinos superficiales generada como resultado de esta actividad ha sido evidenciada por niveles anómalamente altos de algunos metales pesados en la zona costera, particularmente Cu, Co, Mn, Pb, Zn y U (Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). Estos registros sobrepasan los valores medios reportados para la corteza terrestre y son potencialmente tóxicos para la biota marina (Wedepohl, 1995; Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). Asimismo, el puerto de Santa Rosalía está situado en el delta de arroyos que desembocan en el mar, por lo que son comunes las descargas naturales de agua durante la temporada de lluvia, aunado a las aguas residuales del sistema de alcantarillado urbano que se vierten regularmente en este mismo sistema, lo cual podría contribuir a la presencia de otros contaminantes principalmente de tipo orgánico (Huerta-Díaz *et al.*, 2014).

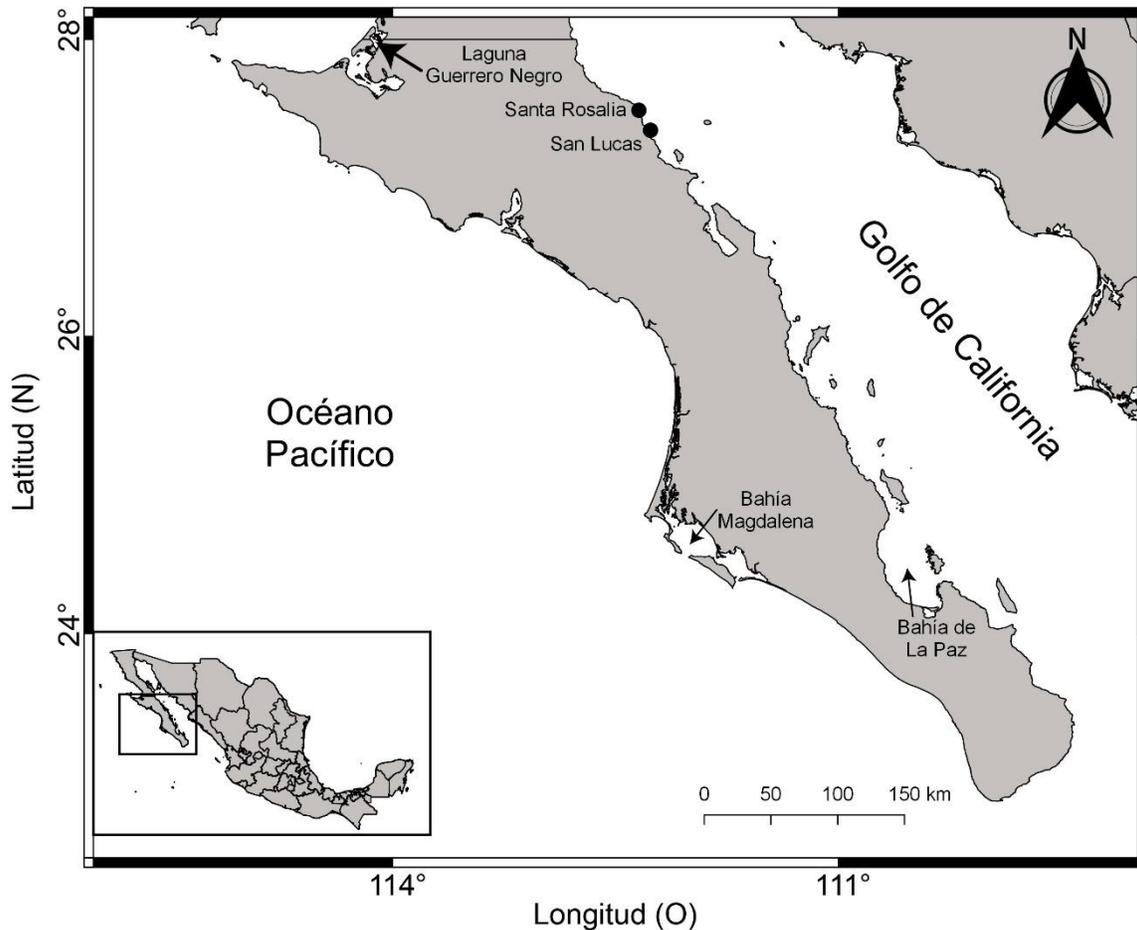
La almeja chocolate *Megapitaria squalida* es uno de los bivalvos más abundantes en Baja California Sur, y en años pasados funcionaba como un recurso alternativo cuando las especies de mayor valor comercial no están disponibles debido a las regulaciones pesqueras (vedas) (Arellano-Martínez *et al.*, 2006). Sin embargo, en años recientes se captura durante todo el año, debido a su alta demanda a nivel local y regional; por lo que se ha convertido en un recurso pesquero de gran importancia. *M. squalida* puede ser considerada un buen bioindicador en estudios de salud ambiental debido a su capacidad para concentrar metales pesados y por lo tanto, puede proveer un panorama integral de la salud del ecosistema donde habita (Méndez *et al.*, 2006; Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Cantú-Medellín *et al.*, 2009).

En el presente estudio se evalúa el estado de salud de *M. squalida* de la zona costera del puerto minero de Santa Rosalía, Golfo de California, México, mediante el análisis de tallas, índice de condición y relaciones peso-longitud. Adicionalmente, estos resultados se compararon con los datos de almejas de cuatro áreas costeras de Baja California Sur consideradas prístinas. El objetivo principal fue determinar si la almeja en la región minera muestra efectos adversos debido a la contaminación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Muestreo***

El muestro mensual (30 individuos en promedio) se realizó desde mayo de 2012 a abril de 2013 en una zona marina adyacente al “hot spot” (área con mayor concentración de metales pesados en los sedimentos) del puerto de Santa Rosalía, Golfo de California (27°20' N y 112°16' W) (Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). También se recolectaron muestras de San Lucas, una localidad situada a 13 km al sur del puerto de Santa Rosalía, de Bahía de La Paz, Laguna Guerrero Negro y Bahía Magdalena (Fig. 1). En estas últimas zonas, no hay actividades mineras asociadas a metales pesados, por lo que se consideran áreas prístinas o poco impactadas (Shumilin *et al.*, 2000; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009). De cada organismo se obtuvo la longitud de la concha (distancia máxima antero-posterior de la concha) ( $\pm 0.1$  mm), así como el peso total, peso húmedo (peso sin concha) y peso de la concha ( $\pm 0.1$  g).



**Figura 1.** Localización geográfica de las áreas de estudio.

***Frecuencia de tallas, índice de condición y relaciones peso-longitud***

Para analizar la distribución de tallas de *M. squalida* en cada zona, se realizaron histogramas de frecuencias a partir de la longitud de la concha. Se estimó el estado fisiológico calculando el índice de condición como la relación relativa (porcentaje) entre el peso húmedo (sin concha) y el peso total (Mouneyrac *et al.*, 2008). Para conocer la distribución de los valores del índice de condición, se realizaron histogramas de frecuencias en intervalos de 5% para cada sitio de muestreo (Malathi & Thippeswamy, 2011). Como otro indicador del estado de salud, se examinó el tipo de crecimiento en peso (peso total, peso húmedo y peso de la concha) de cada organismo con respecto a la longitud de la concha (Tiili *et al.*, 2011). Para ello, se calcularon las relaciones

peso–longitud de la concha utilizando la función potencial  $y = aX^b$ , donde:  $y$  es el peso,  $a$  y  $b$  son constantes del modelo y  $X$  es la longitud. El valor de  $b$  se considera como el coeficiente de alometría y es utilizado como un indicador del tipo de crecimiento que exhibe una especie (Gaspar *et al.*, 2001). Para todas las relaciones, se calculó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) con la finalidad de ver el grado de asociación entre las variables (peso y talla).

### **Análisis estadísticos**

Para detectar diferencias significativas en las tallas, pesos e índice de condición entre las zonas de estudio se utilizó un análisis de variancia (ANDEVA) de una vía, seguida de una prueba *a posteriori* de Tukey para comparación de medias cuando se encontraron diferencias significativas. Debido a que los valores del índice de condición son porcentajes se aplicó una transformación arcoseno para normalizar los datos (Zar, 1996). Para determinar si el crecimiento de *M. squalida* es isométrico ( $b = 3$ ; aumento en la misma proporción en peso y talla), alométrico negativo ( $b < 3$ ; mayor aumento en talla que en peso) o alométrico positivo ( $b > 3$ ; mayor aumento en peso que en talla), se utilizó una prueba  $t$  de Student ( $H_0, b = 3$ ) (Ricker, 1975; Zar, 1996). Asimismo, con la finalidad de comparar el tipo de crecimiento de *M. squalida* entre zonas, se llevó a cabo un análisis de suma de cuadrados residuales (ARSS de Ratkowsky) para la comparación de pendientes de funciones no lineales (Chen *et al.*, 1992). Este análisis compara si dos o más curvas son diferentes estadísticamente mediante un valor de  $F$  estimado. Finalmente, para visualizar la similitud entre las zonas de estudio con base en las variables analizadas (longitud de la concha, peso total, peso húmedo e índice de condición), se construyó un dendograma a partir de un análisis multivariado de cluster (Joining tree clustering) empleando el algoritmo de agrupación de enlace completo y el coeficiente de distancia euclidiana. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA para Windows (Versión 10, Statsoft). El nivel de significancia fue establecido en  $\alpha = 0.05$  para todos los análisis.

## RESULTADOS

Se analizaron un total de 1687 individuos: 370 almejas de Santa Rosalía, 326 de San Lucas, 305 de Bahía de La Paz, 333 de Laguna Guerrero Negro y 353 de Bahía Magdalena.

### **Biometría**

Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros biométricos de *M. squalida* entre las áreas de estudio (ANDEVA,  $P < 0.05$ ) (Tabla 1). En Laguna Guerrero Negro y Bahía Magdalena se presentaron los organismos más grandes en longitud ( $F_{(4, 1687)} = 385.6$ ,  $P < 0.05$ ), seguidos de San Lucas. Las almejas más pequeñas se presentaron en Santa Rosalía y Bahía de La Paz. Por otro lado, las almejas más pesadas se presentaron en Bahía Magdalena ( $F_{(4, 1687)} = 235$ ,  $P < 0.05$ ), seguido de San Lucas y Laguna Guerrero Negro. Las almejas más livianas se presentaron en Santa Rosalía y en Bahía de La Paz. El mayor valor del peso húmedo ( $F_{(4, 1687)} = 471.2$ ,  $P < 0.05$ ) se presentó en Bahía Magdalena, seguido de Laguna Guerrero Negro y San Lucas. Los valores más bajos del peso húmedo se presentaron en Bahía de La Paz y Santa Rosalía.

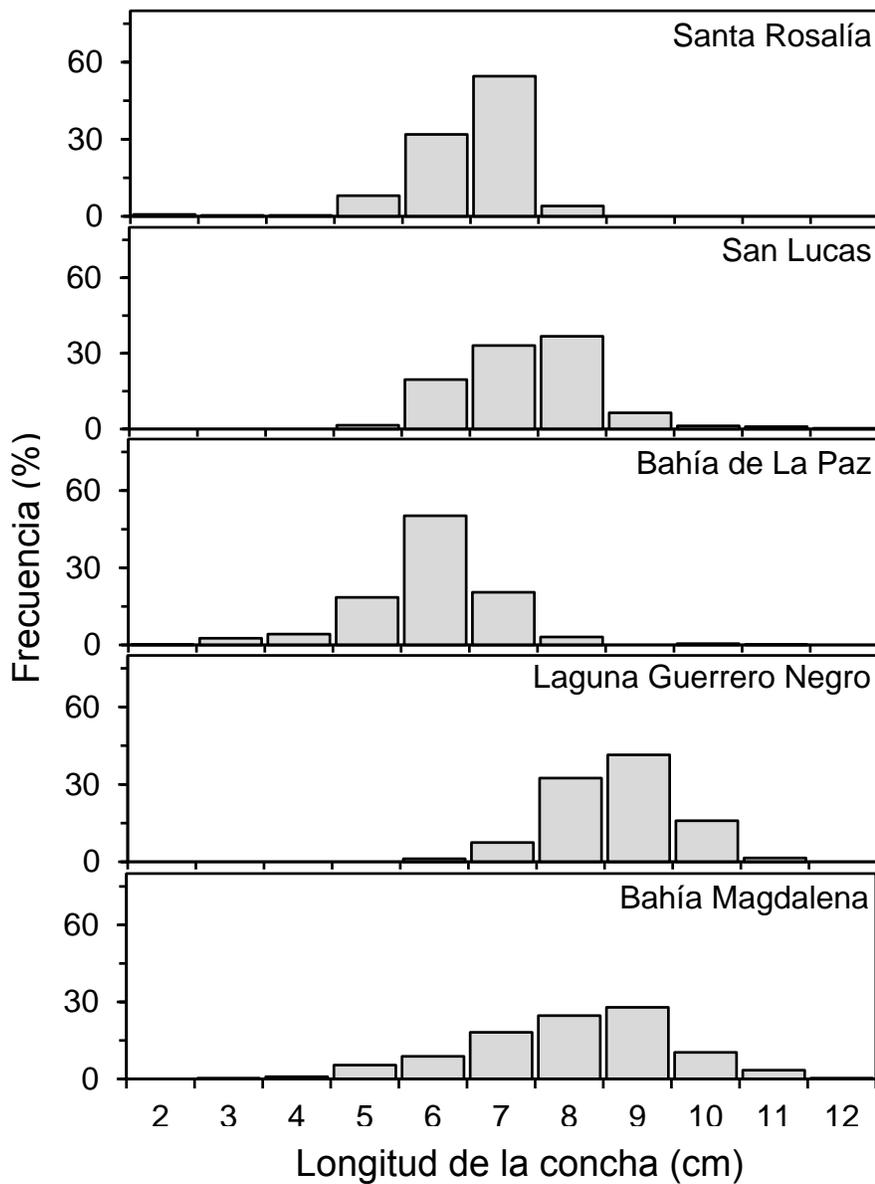
**Tabla 1.** Parámetros biométricos de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

	Santa Rosalía	San Lucas	Bahía de La Paz	Laguna Guerrero Negro	Bahía Magdalena	ANDEVA
Longitud de la concha (cm)	6.8 ± 0.04 <sup>a</sup> (2.3 – 8.6)	7.7 ± 0.05 <sup>b</sup> (5.5 – 12.5)	6.7 ± 0.05 <sup>a</sup> (2.0 – 11.1)	9.0 ± 0.04 <sup>c</sup> (6.4 – 11.5)	8.8 ± 0.06 <sup>c</sup> (3.0 – 12.7)	<i>P</i> = 0.00
Peso total (g)	87.9 ± 1.50 <sup>a</sup> (6.6 – 168)	140.3 ± 3.36 <sup>b</sup> (38.7 – 480.4)	78.2 ± 1.95 <sup>a</sup> (2.2 – 274.5)	137.3 ± 2.08 <sup>b</sup> (47.4 – 285.4)	184 ± 3.8 <sup>c</sup> (6.6 – 489.3)	<i>P</i> = 0.00
Peso húmedo (g)	17.9 ± 0.33 <sup>a</sup> (1.3 – 33)	31.8 ± 0.66 <sup>b</sup> (10.7 – 104.4)	18.2 ± 0.48 <sup>a</sup> (0.5 – 83.5)	32.3 ± 0.51 <sup>b</sup> (11.3 – 58.1)	61 ± 1.37 <sup>c</sup> (2.2 – 178.3)	<i>P</i> = 0.00
n	370	326	305	333	353	

Media ± error estándar (mínimo – máximo). Las medias con diferente letra indican diferencias significativas.

### Frecuencias de tallas

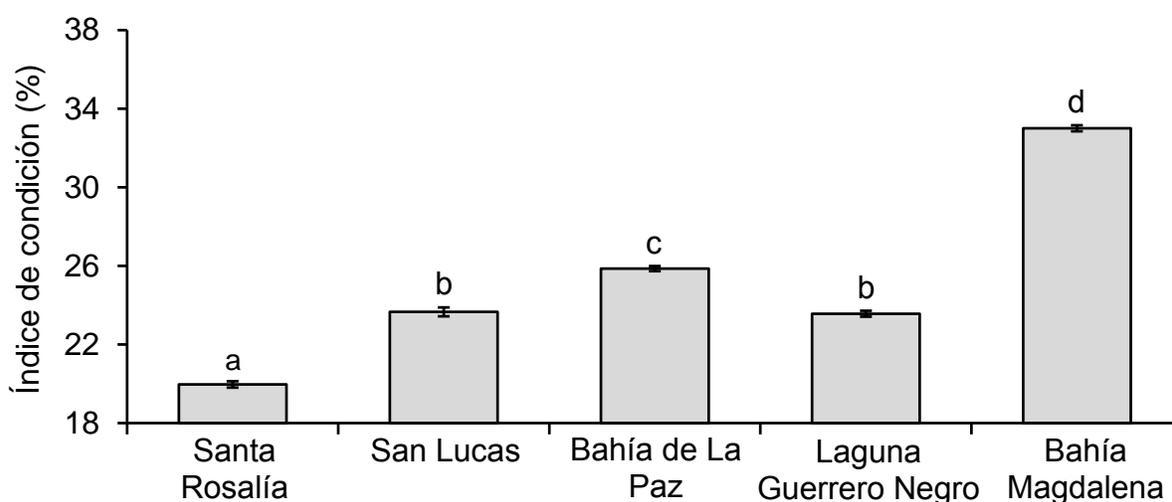
La distribución de frecuencias de tallas de *M. squalida* por sitio de muestreo se muestra en la Figura 2. Se identificaron tres grupos: almejas pequeñas (< 7 cm), medianas (8 cm) y grandes (> 9 cm). Los organismos con tallas grandes se presentaron más frecuentemente en Laguna Guerrero Negro y en Bahía Magdalena, seguidos de San Lucas. Las localidades de Santa Rosalía y Bahía de La Paz presentaron organismos con tallas frecuentemente más pequeñas que los otros sitios.



**Figura 2.** Distribución de frecuencias de tallas (longitud de la concha) de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

### Índice de condición

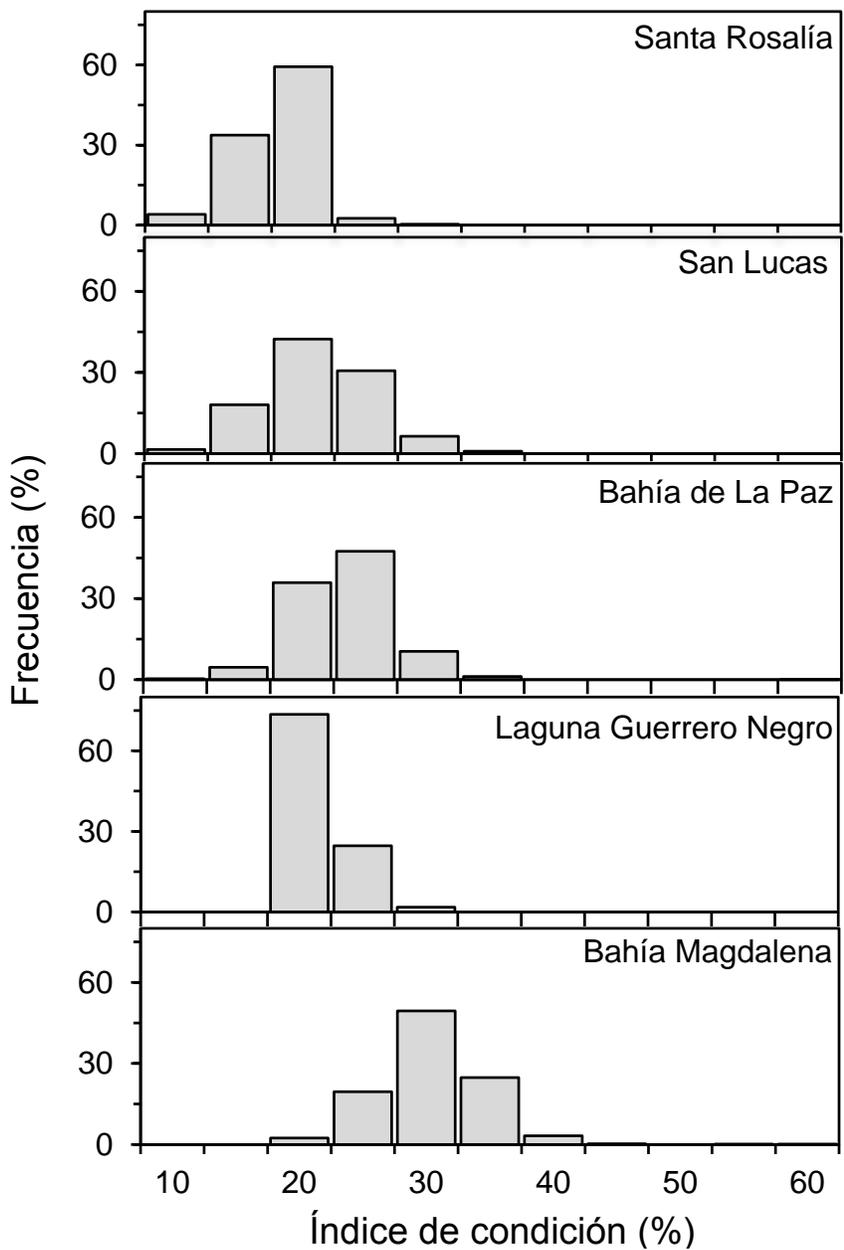
La variación del índice de condición de *M. squalida* entre sitios se muestra en la Figura 3. Se encontraron diferencias significativas en el índice de condición entre los sitios de muestreo ( $F_{(4, 1687)} = 829.1, P < 0.05$ ). Las almejas con el índice significativamente más alto se presentaron en Bahía Magdalena (33%), seguida de Bahía de La Paz (25.8%). Valores intermedios se encontraron en las almejas de San Lucas y Laguna Guerrero Negro (23.6% y 23.5%, respectivamente), mientras que las almejas de Santa Rosalía presentaron el índice significativamente más bajo (19.9%).



**Figura 3.** Variación del índice de condición de *Megapitaria squalida* entre los sitios de muestreo. Las medias con diferente letra indican diferencia significativa (ANDEVA y prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar.

Los datos de distribución de frecuencias del índice de condición por sitio de estudio se muestran en la Figura 4. Las almejas de Bahía Magdalena presentaron los valores del índice más frecuentes entre 26 – 30 (49%) y 31 – 35 (24%). Los sitios de San Lucas, Bahía de La Paz y Laguna Guerrero Negro presentaron sus mayores frecuencias en valores intermedios de 20 – 24 (42%, 35% y 73%, respectivamente) y de 25 – 29 (30%, 47% y 24%, respectivamente). Los valores del índice de condición

más frecuentes en las almejas de Santa Rosalía fueron entre 15 – 19% (33%) y 20 – 24% (59%).



**Figura 4.** Frecuencia del índice de condición de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

### Relaciones peso-longitud

Las relaciones peso-longitud (peso total-longitud de la concha, peso húmedo-longitud total y peso de la concha-longitud total) de *M. squalida* por sitio de muestreo se muestran en la Figura 5. Todas las relaciones siguen una función potencial ( $y = aX^b$ ) con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0.73 y 0.95 y una significancia de  $P = 0.00$ . En general, los valores de los coeficientes de alometría ( $b$ ) estuvieron entre 2.35 y 3.32 (Tabla 2). El análisis ARSS de Ratkowsky indicó diferencias significativas entre las pendientes de cada relación analizada por sitio ( $P = 0.00$ ). En comparación con las otras zonas en las cuales se presentan organismos de mayor peso y talla, las almejas de Santa Rosalía ganan poco peso al aumentar la longitud de concha.

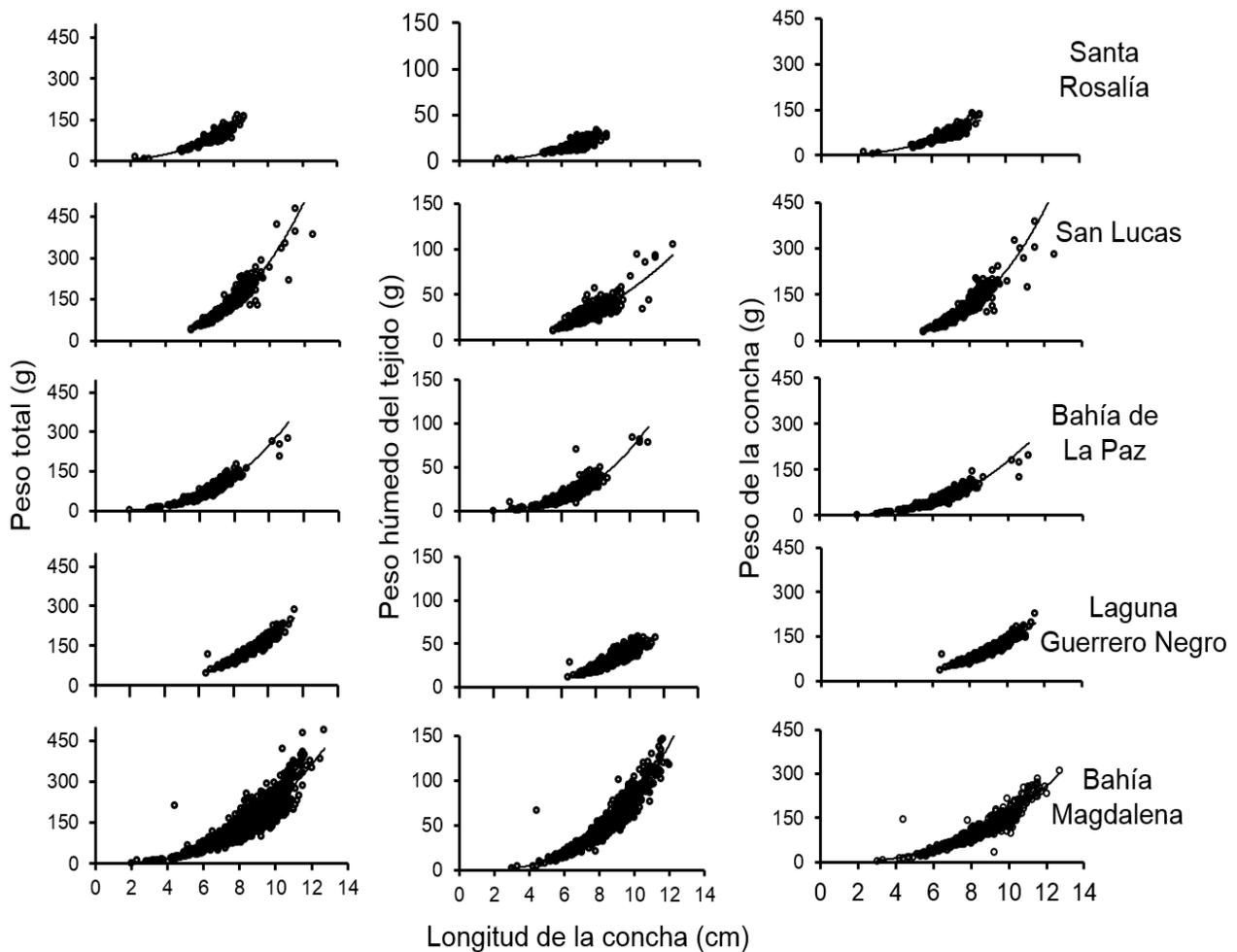


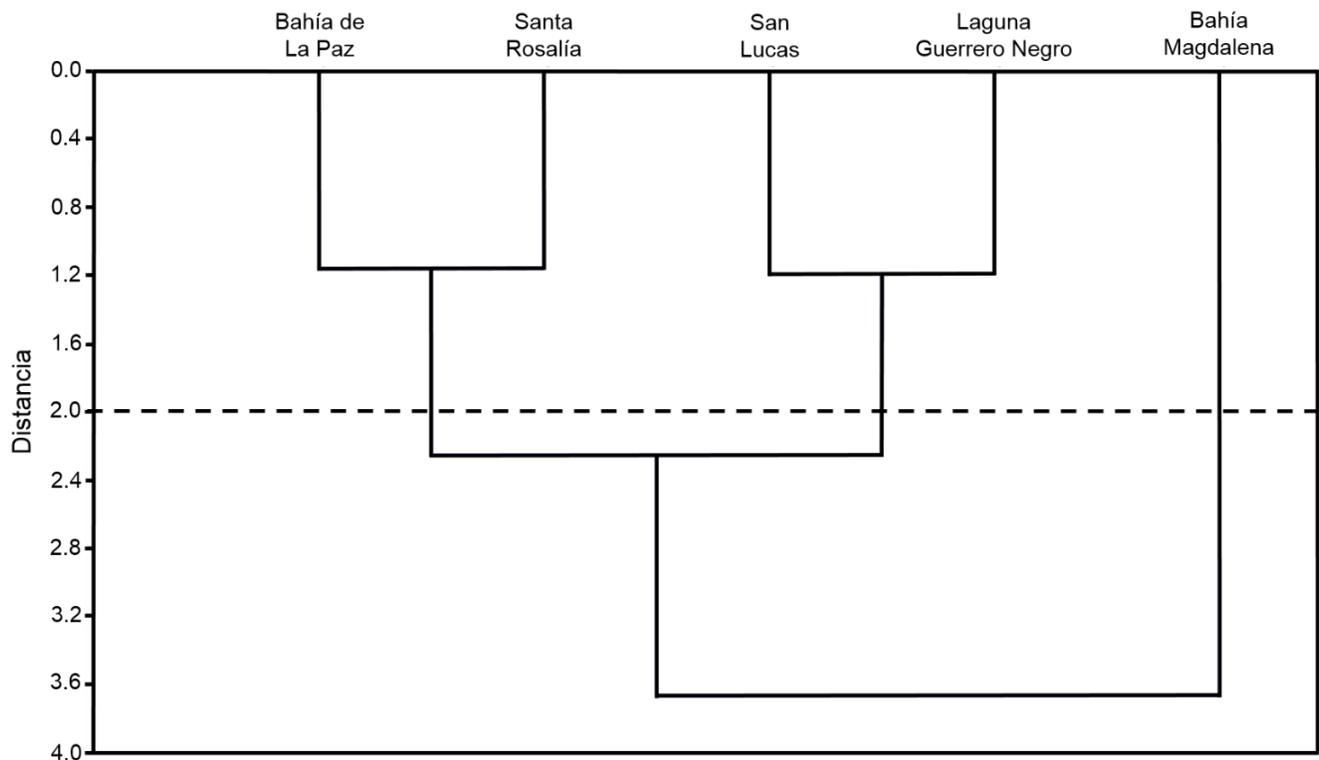
Figura 5. Relaciones peso-longitud de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

**Tabla 2.** Parámetros de las relaciones peso–longitud y tipos de crecimiento de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

Localidad	Relación	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>P</i>	Tipo de crecimiento
Santa Rosalía	Peso total-longitud	0.8436	2.39	0.87	0.00	Alométrico (-)
	Peso húmedo-longitud	0.1519	2.45	0.78	0.00	Alométrico (-)
	Peso de la concha-longitud	0.6802	2.38	0.86	0.00	Alométrico (-)
San Lucas	Peso total-longitud	0.2294	3.09	0.90	0.00	Isométrico
	Peso húmedo-longitud	0.2452	2.35	0.73	0.00	Alométrico (-)
	Peso de la concha-longitud	0.1112	3.32	0.89	0.00	Alométrico (+)
Bahía de La Paz	Peso total-longitud	0.2996	2.92	0.94	0.00	Isométrico
	Peso húmedo-longitud	0.0564	3.08	0.87	0.00	Isométrico
	Peso de la concha-longitud	0.2597	2.83	0.93	0.00	Isométrico
Laguna Guerrero Negro	Peso total-longitud	0.3342	2.71	0.90	0.00	Isométrico
	Peso húmedo-longitud	0.0744	2.74	0.78	0.00	Isométrico
	Peso de la concha-longitud	0.2594	2.71	0.90	0.00	Isométrico
Bahía Magdalena	Peso total-longitud	0.4987	2.65	0.91	0.00	Isométrico
	Peso húmedo-longitud	0.0928	2.94	0.91	0.00	Isométrico
	Peso de la concha-longitud	0.3431	2.66	0.91	0.00	Isométrico

### **Análisis de agrupamiento**

El dendograma construido a partir del análisis de cluster se muestra en la Figura 6. Este análisis mostró que las almejas de Bahía Magdalena se separan de las demás zonas, conformando el primer grupo. Los organismos de San Lucas y Laguna Guerrero Negro formaron un segundo grupo, y finalmente un tercer grupo está conformado por las almejas de Bahía de La Paz y Santa Rosalía. El nivel de corte para la selección de los grupos se tomó de manera arbitraria en 2.0.



**Figura 6.** Dendograma construido a partir del análisis de cluster para ver la similitud entre las zonas de estudio con base en la longitud de la concha, peso total, peso húmedo y el índice de condición de *Megapitaria squalida*. La línea punteada indica el nivel de corte para la selección de los grupos.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados revelaron la presencia de tres grupos de almejas considerando las diferencias de las variables analizadas (longitud de la concha, peso total, peso húmedo e índice de condición). El grupo de Bahía Magdalena corresponde a los organismos más grandes y con una mejor condición. Esta zona es considerada un Centro de Actividad Biológica (BAC) caracterizado por una alta productividad durante todo el año (Lluch-Belda *et al.*, 2000), resultando en una constante disponibilidad de alimento para los organismos filtradores, favoreciendo así un mayor crecimiento y una buena condición para *M. squalida*. El segundo grupo se compone de las almejas medianas, presentes en San Lucas y Laguna Guerrero Negro, que a pesar de que la longitud de la concha fue mayor en los organismos de Laguna Guerrero Negro, las almejas de estas dos zonas compartieron un peso total, húmedo y una condición similar. El tercer grupo se conforma por las almejas de Bahía de La Paz y Santa Rosalía, las cuales corresponden a las almejas más pequeñas, tanto en longitud como en peso total y húmedo. Las tallas pequeñas de las almejas de Bahía de La Paz, pueden estar relacionadas con la intensa actividad pesquera que se ha realizado en esta zona, sobre todo en las almejas grandes que son las más expuestas a la pesca, al grado que se ha considerado a *M. squalida* como un recurso en su máxima capacidad (López-Rocha *et al.*, 2010); en contraste, en Santa Rosalía esta almeja no representa un recurso atractivo para los pescadores locales, y a pesar de eso, las almejas son pequeñas.

Aunque la intensidad de pesca de un recurso y las condiciones ambientales de cada área influyen en las características biológicas y la estructura de la población de una especie, los resultados de este estudio sugieren que las diferencias biométricas de las almejas de Santa Rosalía probablemente no son atribuibles a estos factores. La longitud máxima de la concha de las almejas de Santa Rosalía no superó los 8 cm, a pesar de que esta población de almejas no es explotada comercialmente, mientras que las almejas de otras áreas alcanzaron tamaños entre 11 y 12 cm (incluidos los de Bahía de La Paz) los cuales representan los registros más altos en Baja California Sur (Singh *et al.*, 1991). Además del tamaño pequeño, las almejas de Santa Rosalía mostraron los índices de condición más bajos, y aunque las almejas de esta área y de

Bahía de La Paz fueron de tamaño similar, la condición de los animales del sitio anterior fue significativamente más alta. El índice de condición se ve afectado por varios factores, tales como los cambios estacionales en la disponibilidad o calidad del alimento en cada sitio (Boscolo *et al.*, 2003; Nicholson & Lam, 2005). En este sentido, se considera que la cuenca marina de Santa Rosalía consiste de una masa de agua pobre en nutrientes y en consecuencia de baja productividad primaria; aunque se producen eventos de surgencia, son débiles debido a la estratificación de la columna de agua (Santamaría-del Ángel *et al.*, 1999). Esta situación podría explicar la mala condición y los pequeños tamaños de almejas en esta área; sin embargo, esta explicación fue descartada debido a que en San Lucas, un área ubicada a sólo 13 km al sur de Santa Rosalía, las almejas mostraban una mejor condición y eran más grandes a pesar de compartir disponibilidad de alimento y temperatura del agua con el puerto de Santa Rosalía (3.0 mg m<sup>-3</sup> de clorofila *a* y 23.5 °C para San Lucas; 2.9 mg m<sup>-3</sup> de clorofila *a* y 23.5 °C para Santa Rosalía, promedios de 2011 a 2013 obtenidos en el NOAA Coastal Zone Color Scanner).

Los sedimentos costeros cercanos al puerto minero de Santa Rosalía contienen metales pesados que son bioacumulados por organismos (Shumilin *et al.*, 2011), según lo reportado para el alga marrón *Padina durvillaei* (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2009) y para los mejillones *Modiolus capax* (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999) y *Mytilus edulis* (Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009). La almeja chocolata, *M. squallida*, se alimenta al filtrar la materia orgánica suspendida en la columna de agua (principalmente fitoplancton), por lo que es probable que bioacumule metales, como ya se ha documentado para esta especie en otros lugares (Méndez *et al.*, 2006). Aunque en este estudio no se determinó la concentración de metales pesados en los tejidos de las almejas, se ha informado que las concentraciones anómalamente altas de estos elementos en los sedimentos superficiales marinos pueden causar efectos biológicos negativos en hasta el 50% de los organismos marinos que habitan esta área (Long *et al.*, 1995; Shumilin *et al.*, 2011). Los moluscos bivalvos que viven en zonas contaminadas o que están expuestas a concentraciones elevadas de contaminantes suelen mostrar tasas de crecimiento más bajas y por lo tanto, un tamaño más pequeño, además de un mal estado de salud, ya que las reservas de energía (carbohidratos,

lípidos y proteínas) se asignan para la depuración de los contaminantes más que para otras demandas fisiológicas (Leung & Furness, 2001; Nicholson & Lam, 2005; Peteiro *et al.*, 2006). Es probable que las diferencias entre las tallas y la condición de las almejas de Santa Rosalía y las otras zonas sean consecuencia de alteraciones en las tasas de crecimiento inducidas por las altas concentraciones de metales pesados, ya que los organismos pueden estar utilizando la energía para la desintoxicación, reduciendo las reservas que estaban destinadas para el crecimiento y por consiguiente, también repercute en la condición general de los organismos (Lucas & Beninger, 1985; Nicholson & Lam, 2005). La relación entre concentraciones altas de metales pesados y baja condición ha sido ampliamente reportada para diversas especies de moluscos bivalvos tales como las almejas *Macoma balthica* y *Cerastoderma edule* y los mejillones *Mytilus edulis* y *Perna viridis* (Hummel *et al.*, 1997; Nicholson, 1999). En este sentido, el mejillón *M. galloprovincialis* y el venerido *Meretrix meretrix* provenientes de zonas contaminadas presentaron bajos índices de condición comparado con organismos de zonas menos impactadas, indicando un estado menos saludable para ellos (Pampanin *et al.*, 2005, Meng *et al.*, 2013).

El análisis de las relaciones peso–longitud reveló que, en San Lucas, Bahía de La Paz, Laguna Guerrero Negro y Bahía Magdalena los individuos de *M. squalida* mostraron un crecimiento isométrico. Este es el tipo de crecimiento más común en bivalvos marinos, y es generalmente influenciado por cambios en las variables ambientales (Gaspar *et al.*, 2001). Por el contrario, las almejas de Santa Rosalía mostraron un crecimiento alométrico negativo, es decir, poco aumento en el peso a medida que aumenta la longitud de la concha, lo que sugiere un deterioro fisiológico debido al estrés ambiental (Malathi & Thippeswamy, 2011). El crecimiento alométrico negativo es frecuentemente atribuido a contaminantes medioambientales elevados, como se informó para el mejillón *M. galloprovincialis* en la zona costera de Galicia en el noroeste de España (Peteiro *et al.*, 2006), y para *Donax trunculus* en el Golfo de Túnez (Tlili *et al.*, 2011).

En conclusión, es claro que los parámetros biométricos, el índice de condición y el tipo de crecimiento de almejas que habitan el área portuaria de Santa Rosalía en el Golfo de California difieren de los patrones registrados para las otras áreas,

incluyendo San Lucas, a pocos kilómetros del punto de contaminación y donde las condiciones de temperatura y disponibilidad de alimentos son similares a las de la zona portuaria. Con base en estos hallazgos, se concluye que *M. squalida* muestra un mal estado de salud y un crecimiento deteriorado en la zona adyacente al puerto de Santa Rosalía, probablemente causado por los altos niveles de metales pesados en los sedimentos.

---

## CAPÍTULO 2

---

### **CASTRACIÓN PARASITARIA DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO.**

Este capítulo fue publicado bajo la siguiente referencia:

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. 2017. **PARASITIC CASTRATION OF CHOCOLATE CLAM *Megapitaria squalida* (SOWERBY, 1835) CAUSED BY TREMATODE LARVAE.** *Journal of Shellfish Research*. 36(3): 1–7.

## RESUMEN

Se investigó por primera vez la prevalencia de parásitos en las gónadas de *Megapitaria squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía en el Golfo de California. Para ello, se analizaron histológicamente un total de 696 gónadas; 370 del puerto minero de Santa Rosalía y 326 de San Lucas. Se observó una inusual castración parasitaria causada por el desarrollo de larvas de tremátodos dentro de los folículos gonadales. Se observaron esporocistos de tremátodos dentro de los folículos que contenían bolas germinales y cercarias en desarrollo y se asociaron con una respuesta inflamatoria, la cual se evidenció con una intensa infiltración hemocítica y la formación de granulocitomas alrededor de las estructuras del parásito. Se observaron algunas metacercarias dentro del tejido conectivo ovárico, lo que sugiere que *M. squalida* también podría actuar como segundo hospedero intermediario para tremátodos digéneos. La infección fue específica a la edad, ya que las almejas juveniles (1–4 cm de longitud de concha) no contenían parásitos y la prevalencia en las almejas adultas aumentó con el tamaño. A diferencia de los machos, que presentaban 4 niveles de densidad de infección, todos los ovarios parasitados mostraban densidades de infección muy altas. La prevalencia fue significativamente mayor ( $\chi^2 = 6,99$ ;  $gl = 1$ ;  $P = 0,001$ ) en las hembras (30.2%) que en los machos (17%). La mayor prevalencia de almejas parasitadas se encontró en la fase de madurez durante el verano (43.7%) cuando la temperatura del mar fue más alta, mientras que la más baja se observó en invierno. Es posible que el ambiente contaminado del puerto minero de Santa Rosalía pueda aumentar la incidencia y la alta densidad de infección por larvas de tremátodos en *M. squalida*.

**Palabras clave:** esporocistos, cercarias, metacercaria, bivalvos, contaminación por metales pesados.

## INTRODUCCIÓN

Muchos invertebrados sirven como hospederos para una gran variedad de parásitos (Prinz *et al.*, 2010). Particularmente, los moluscos bivalvos marinos juegan un papel importante como hospederos para estadios larvales de tremátodos digéneos, siendo los principales parásitos metazoos, tanto en número como en los daños y patologías que son capaces de provocar (Thieltges *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2013), incluyendo alteraciones en procesos fisiológicos como el crecimiento y la reproducción e incluso la sobrevivencia, lo que representa un riesgo potencial para la actividad pesquera y acuícola, así como cambios importantes a nivel poblacional (Taskinen, 1998; Mouritsen & Poulin, 2010). Dentro de los efectos negativos en la reproducción, destaca la castración parasitaria, la cual inhibe parcial o totalmente la ovogénesis y espermatogénesis, lo que ocasiona la reducción en la fecundidad y en el potencial reproductivo (Galaktionov & Dobrovolskij, 2003; Valderrama *et al.*, 2004; Boehs *et al.*, 2010). Sin embargo, la severidad de estos efectos depende de la prevalencia e intensidad de infección, las cuales varían en relación a una serie de factores bióticos y abióticos (Koprivnikar & Poulin, 2009; Gilardoni *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2015). La talla y el sexo del hospedero (Thieltges, 2008; Müller *et al.*, 2015), la madurez reproductiva (Taskinen & Saarinen, 1999), así como la estacionalidad (Muñoz *et al.*, 2013) y la temperatura del mar (Poulin, 2006; Prinz *et al.*, 2010), han sido reportados como moduladores del parasitismo en moluscos bivalvos. Asimismo, la contaminación también puede influir directa o indirectamente sobre la ocurrencia, la prevalencia, la intensidad y la patogenicidad del parasitismo (Khan & Thulin, 1991; Lafferty, 1997), debido al estrés que ocasiona en los organismos, lo cual conduce a cambios en la resistencia a la adquisición de infecciones parasitarias (Sures, 2008; Morley, 2010).

El puerto minero de Santa Rosalía se ubica dentro del Golfo de California, en la costa centro-oriental de la península de Baja California y se caracteriza por presentar altas concentraciones potencialmente tóxicas de metales pesados en los sedimentos marinos asociadas a la minería y a la fundición de cobre que se han llevado a cabo durante más de un siglo (Huerta-Díaz *et al.*, 2014). Como resultado, los sedimentos costeros marinos cerca de este puerto tienen niveles anormalmente altos de algunos metales pesados y son potencialmente tóxicos para la biota marina (Shumilin *et al.*,

2013). Este sitio alberga bancos de almeja chocolate *Megapitaria squalida*, un bivalvo de gran importancia comercial en el Pacífico mexicano y en el Golfo de California (Arellano-Martínez *et al.*, 2006; López-Rocha *et al.*, 2010). El objetivo del presente trabajo fue documentar la castración inusual causada por esporocistos de tremátodos y determinar la prevalencia y la densidad de infección de parásitos en las gónadas de *M. squalida* que habita en el puerto minero de Santa Rosalía. Además, se exploró la posible relación potencial con la etapa de madurez (juvenil/adulto), el sexo, las etapas de desarrollo de las gónadas y la estacionalidad/temperatura superficial del mar, así como el efecto en la reproducción de la almeja.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Muestreo y tratamiento histológico***

Las muestras se colectaron mensualmente de mayo de 2012 a abril de 2013 en el puerto minero de Santa Rosalía (27°20' N y 112°16' W), ubicado en el Golfo de California, en la costa centro-oriental de la península de Baja California, México. Los altos niveles de metales pesados en los sedimentos marinos son producto de las actividades mineras y de fundición de cobre que se realizaron hace más de un siglo (Wilson & Rocha, 1955; Huerta-Díaz *et al.*, 2014); se reportan en los sedimentos superficiales de la dársena del puerto los valores anormales particularmente de Cu (3.390 mg kg<sup>-1</sup> de sedimentos), Zn (1,916 mg kg<sup>-1</sup>), Co (166 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (6.770 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (226 mg kg<sup>-1</sup>), y U (11.8 mg kg<sup>-1</sup>) (Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). A la par, se obtuvieron muestras de la playa San Lucas ubicada a 13 km al sur del puerto (27°13' N y 112°16' W), la cual se utilizó como zona de referencia debido a que no se realizan actividades portuarias ni mineras.

De cada zona, se recolectó un promedio de 30 especímenes de *M. squalida* a profundidades de entre 5 y 10 m, por medio de buceo semi-autónomo tipo "hooka". De cada individuo, se midió la longitud total de la concha (distancia máxima antero-posterior de la concha) ( $\pm 0.1$  mm) y se obtuvo una porción de gónada, la cual se fijó en formaldehído al 10% preparado con agua de mar. Posteriormente, cada porción de tejido se deshidrató a través de una secuencia de alcoholes de concentraciones crecientes, seguido de un proceso de aclaramiento con Hemo-De® e inclusión en

Paraplast-Xtra®. Con un micrótopo se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) (Humason, 1979). La estructura de las gónadas fue examinada bajo el microscopio de luz para determinar el sexo, la fase de desarrollo gametogénico de cada individuo y la presencia de parásitos. Para establecer las fases de desarrollo gonádico se utilizó la escala propuesta por Arellano-Martínez *et al.* (2006) para esta especie (reposeo, desarrollo, madurez, desove y posdesove).

### **Análisis del parasitismo**

Con base en las observaciones histológicas de las gónadas, se describieron las características de los tremátodos encontrados siguiendo el trabajo de da Silva *et al.* (2002). Se determinó la densidad de infección (Bush *et al.*, 1997) en los machos y hembras, calculando el área ocupada por parásitos y por gametos con respecto al área total de los folículos en cinco campos histológicos seleccionados al azar de cada corte histológico. El cálculo de las áreas se realizó con el programa SIGMA SCAN PRO software (v. 5.0, Systat Software, Inc.). Los valores de densidad de infección se categorizaron de acuerdo a la escala propuesta por Ceuta & Boehs (2012) como sigue: densidad ligera < 5% del tejido ocupado por parásitos; moderada 5-25%; alta 25-50% y muy alta > 50% del tejido ocupado por parásitos.

La prevalencia de parásitos en las almejas de cada zona fue calculada de acuerdo a Margolis *et al.* (1982) dividiendo el número de individuos parasitados entre el número total de individuos muestreados y expresándola en porcentaje. La prevalencia se analizó por etapa de madurez (juvenil/adulto) y sexo, así como por fase de desarrollo gametogénico y por estación del año (primavera, verano, otoño e invierno). Adicionalmente, se obtuvieron datos de temperatura superficial del mar por medio de imágenes del satélite Aqua MODIS, con la finalidad de analizar la influencia de esta variable sobre la incidencia de parásitos.

### **Análisis estadísticos**

Las diferencias en la frecuencia de almejas parasitadas y no parasitadas (prevalencia) para cada fase de desarrollo gonádico (reposeo, desarrollo, madurez,

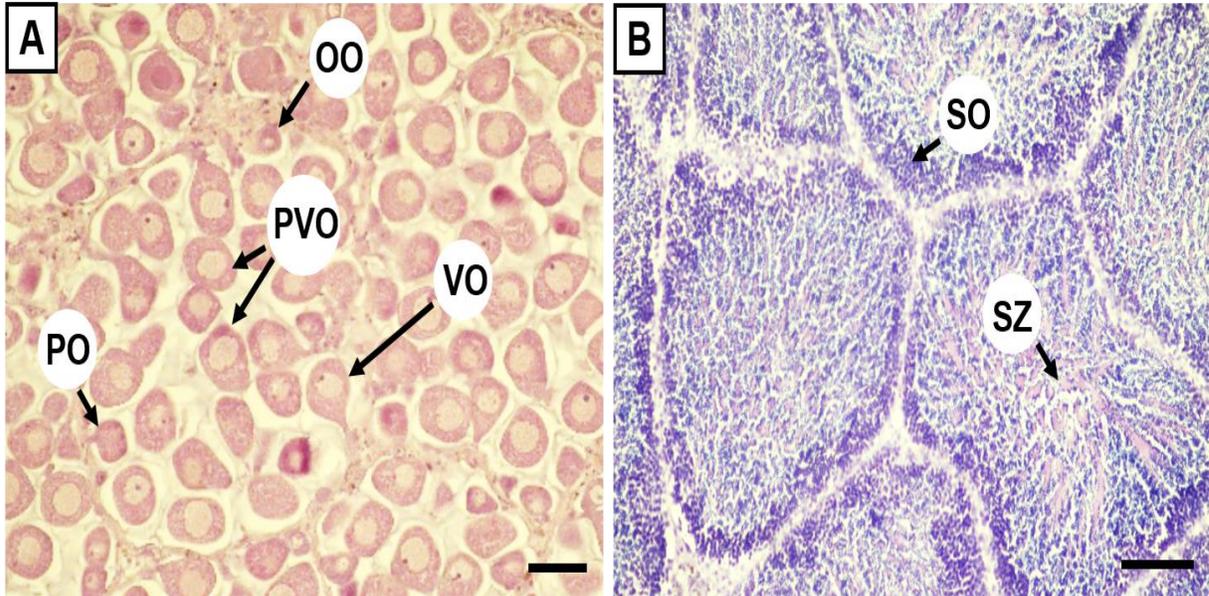
desove y posdesove) y estación del año fueron evaluadas usando una prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). Para el caso de la relación entre sexos, la prueba se realizó entre la prevalencia de hembras parasitadas respecto a la de los machos parasitados. La correlación entre la prevalencia y la talla, así como con la temperatura superficial del mar se determinó con una prueba de rangos de Spearman (Zar, 1996). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software para Windows STATISTICA (versión 6.0, StatSoft). El nivel de significancia ( $\alpha$ ) se estableció en 0.05 para todas las pruebas.

## **RESULTADOS**

Se analizaron histológicamente un total de 696 gónadas de *M. squalida*; 370 del puerto de Santa Rosalía y 326 de la playa San Lucas. En ambas zonas se presentaron gónadas saludables sin la presencia de parásitos, y únicamente en el puerto de Santa Rosalía se observaron gónadas parasitadas.

### ***Estructura histológica de gónadas saludables***

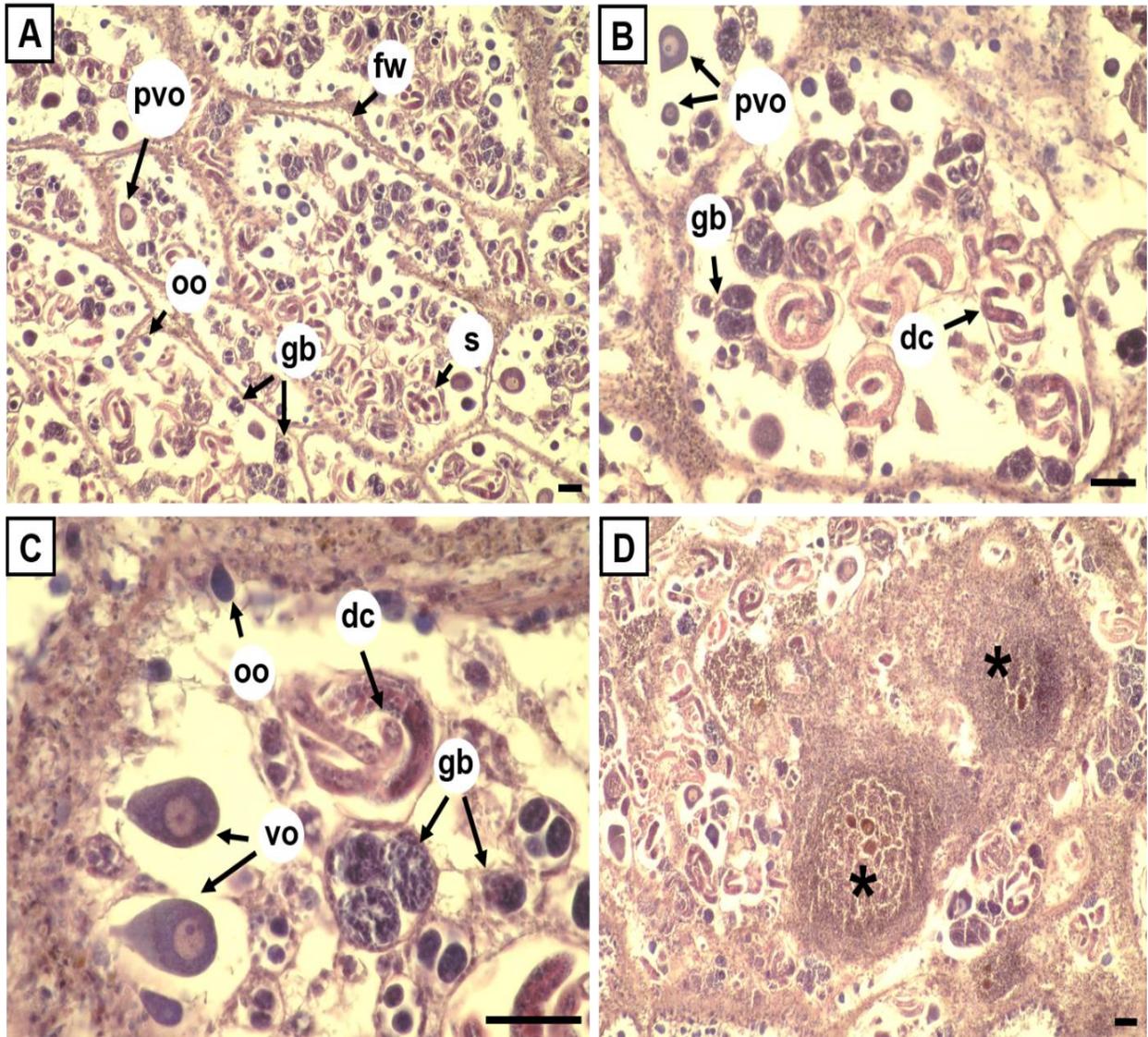
Las almejas sin presencia de parásitos, con una estructura gonadal normal saludable, presentaron las siguientes características: En el ovario se observaron folículos con células gaméticas en distintas fases de desarrollo, desde ovogonias hasta ovocitos posvitelogénicos (Fig. 1A). Los folículos prácticamente están llenos de ovocitos posvitelogénicos libres en el lumen, los cuales presentan una forma poliédrica. También se observan algunos ovocitos previtelogénicos adheridos a la pared folicular y el tejido conjuntivo reducido debido al crecimiento de los gametos. En el testículo, el espacio intrafolicular se ve disminuido y el tejido conjuntivo es poco evidente. En la pared de los folículos se observa una capa gruesa de espermatogonias y el lumen se encuentra lleno de espermatozoides (Fig. 1B).



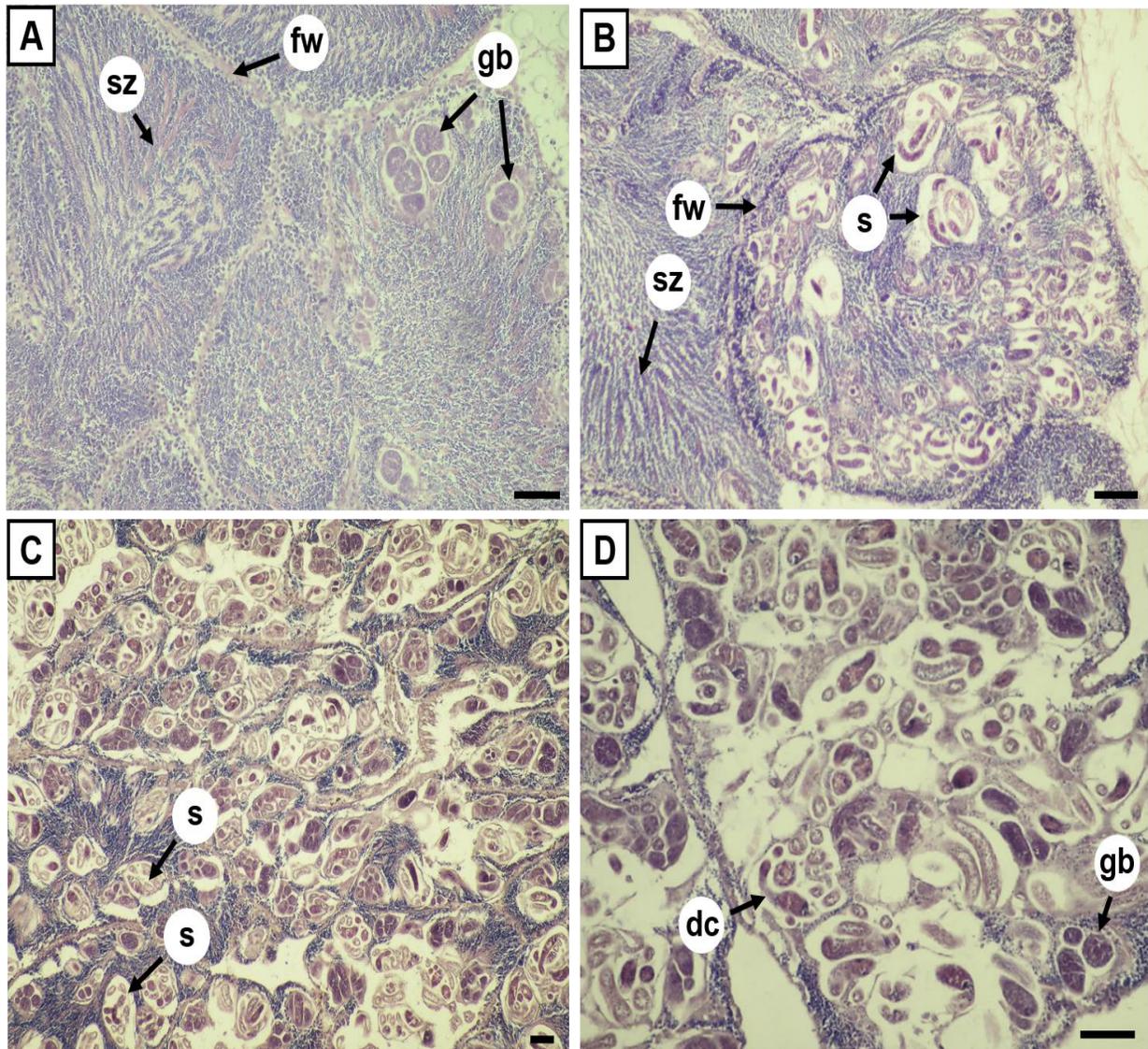
**Figura 1.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales de la gónada de *Megapitaria squalida*. A) Estructura histológica normal, de un ovario con gametos en distintas fases de desarrollo, ovogonias (OO) y ovocitos previtelogénicos (PO) adheridos a la pared del folículo, ovocitos vitelogénicos (VO) y ovocitos postvitelogénicos (PVO) sueltos en el lumen de los folículos. B) Estructura histológica normal, de un testículo con una capa de espermatogonias (SO) adheridas a la pared del folículo y espermatozoides (SZ) en el lumen. Escala: 50 µm.

### ***Estructura histológica de gónadas parasitadas***

Las gónadas parasitadas presentaron larvas de tremátodos digéneos dentro de los folículos. En los ovarios, se observaron esporocistos conteniendo sacos germinales y cercarias en desarrollo reemplazando a las células gaméticas (Fig. 2A-C). En todas las observaciones, los folículos se presentaron en su mayoría totalmente invadidos por esporocistos y solo algunos gametos remanentes. Se observó un proceso de infiltración hemocítica intensa, la cual originó la formación de granulocitomas rodeando algunas estructuras parasitarias (Fig. 2D). En los testículos, se presentó un patrón similar, en donde los folículos estuvieron invadidos por esporocistos con sacos germinales y cercarias en desarrollo (Fig. 3A-D).

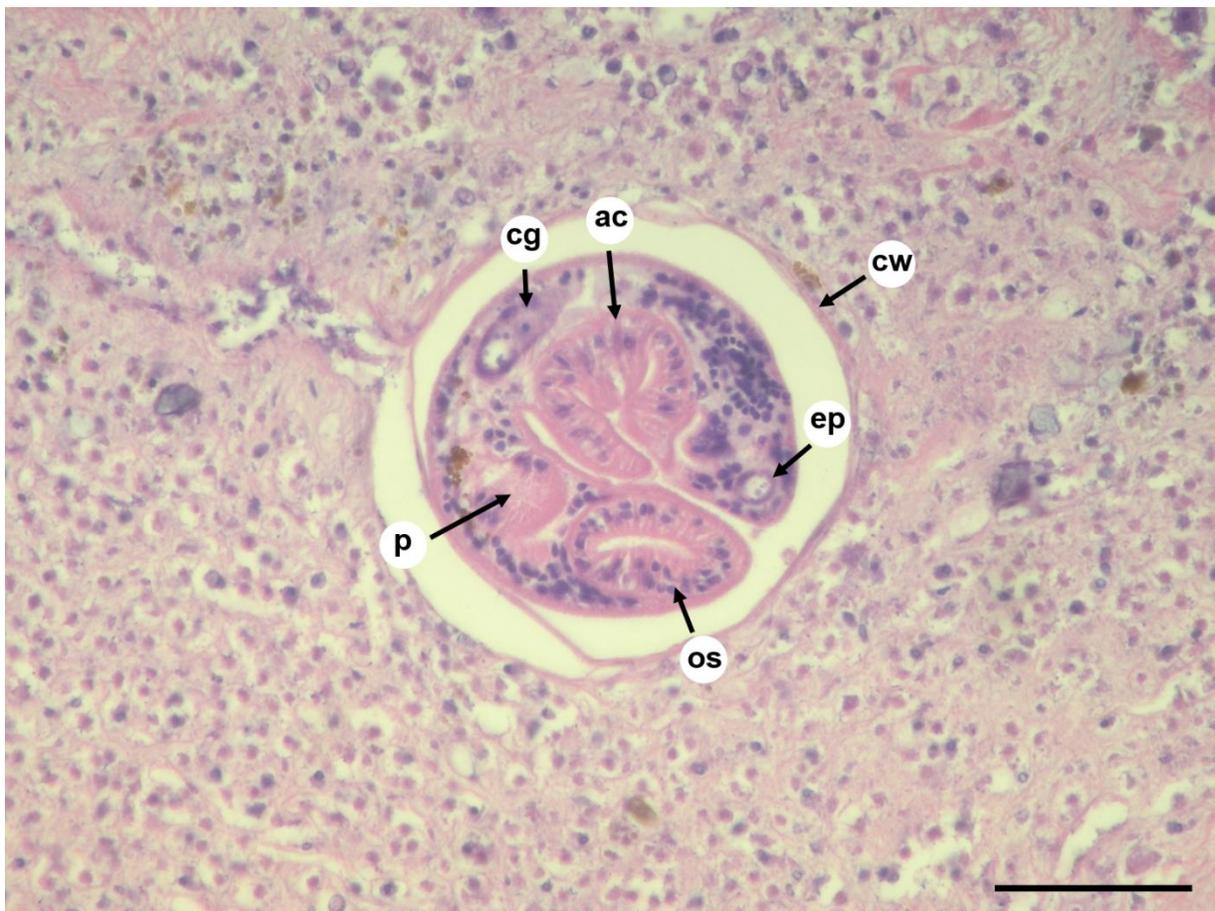


**Figura 2.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales del ovario de *Megapitaria squalida* parasitado por tremátodos. A-C) Dentro de los folículos se presentan esporocistos (S) que contienen sacos germinales (GB) y cercarias en desarrollo (DC). Se observan algunas ovogonias (OO), ovocitos vitelogénicos (VO) y postvitelogénicos (PVO) remanentes. D) Presencia de granulocitomas (\*) en ovario parasitado. Escala: 50  $\mu$ m.



**Figura 3.** Microfotografías de cortes histológicos (H&E) transversales del testículo de *Megalopteria squalida* parasitado por tremátodos. A-D) Dentro de los folículos se presentan esporocistos (S) con bolas germinales (GB) y cercarias en desarrollo (DC) que desplazan a los espermatozoides (SZ). Se observan diferentes grados de intensidad de infección ligera (A), moderada (B), alta (C) y muy alta (D). Escala: 50  $\mu$ m.

Se observaron metacercarias enquistadas dentro del tejido conjuntivo de algunos ovarios (Fig. 4), las cuales no pudieron ser identificadas taxonómicamente. Éstas se caracterizaron por una forma corporal elongada, con la presencia de una ventosa oral y un acetábulo (ventosa ventral). Seguida de la ventosa oral, se observó la faringe y hacía la parte media a la altura del acetábulo, se observó el ciego intestinal. En la parte posterior, se presentó el poro excretor. No se observó la presencia de espinas ni de aparatos reproductores. Las características morfométricas de las metacercarias se presentan en la Tabla 1.



**Figura 4.** Metacercaria enquistada en el tejido conectivo del ovario de *Megapitaria squalida*. Se observa la pared del quiste (CW), la ventosa oral (OS); la faringe (P); el acetábulo (AC); el ciego intestinal (CG); y el poro excretor (EP). Escala: 50  $\mu$ m.

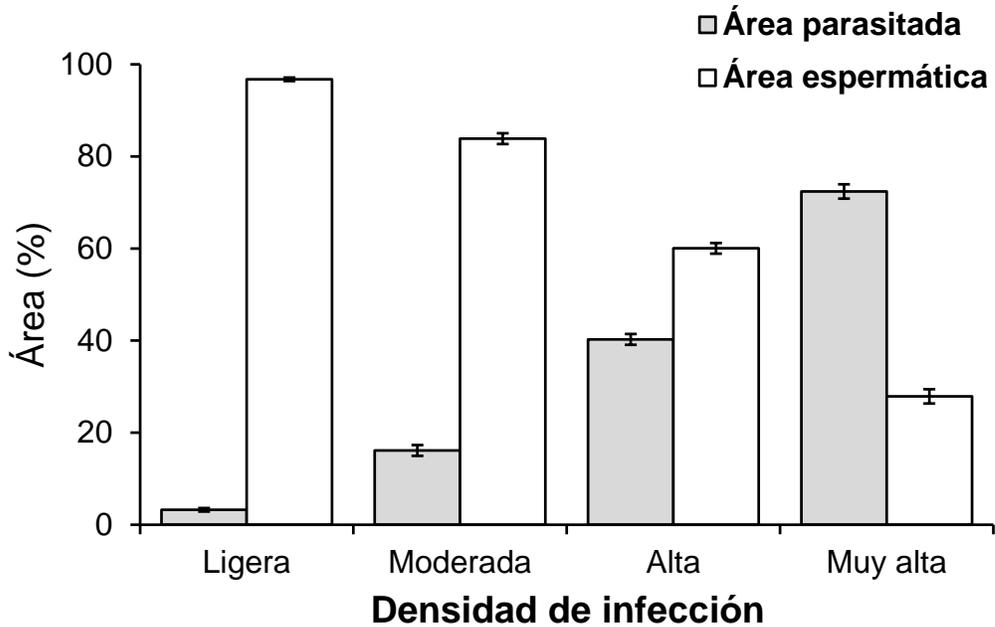
**Tabla 1.** Características morfométricas (valores promedio) de las metacercarias enquistadas (n = 7) en el tejido conectivo de ovario de *Megapitaria squalida*.

Característica	Medida	Media ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ error estándar
Quiste de la metacercaria	Diámetro	273.1 $\pm$ 52.4
Pared del quiste	grosor	10.1 $\pm$ 1.7
Cuerpo de la metacercaria	Diámetro	174.4 $\pm$ 39.5
	Longitud	324.3 $\pm$ 77.3
Ventosa oral	Diámetro	77.6 $\pm$ 18.4
	Longitud	68.7 $\pm$ 15.1
Faringe	Diámetro	53.8 $\pm$ 13.6
	Longitud	48.5 $\pm$ 15.1
Acetábulo	Diámetro	92.5 $\pm$ 16.8
	Longitud	92.6 $\pm$ 16.9
Poros excretor	Diámetro	26.9 $\pm$ 9.3
	Longitud	27.6 $\pm$ 9.8

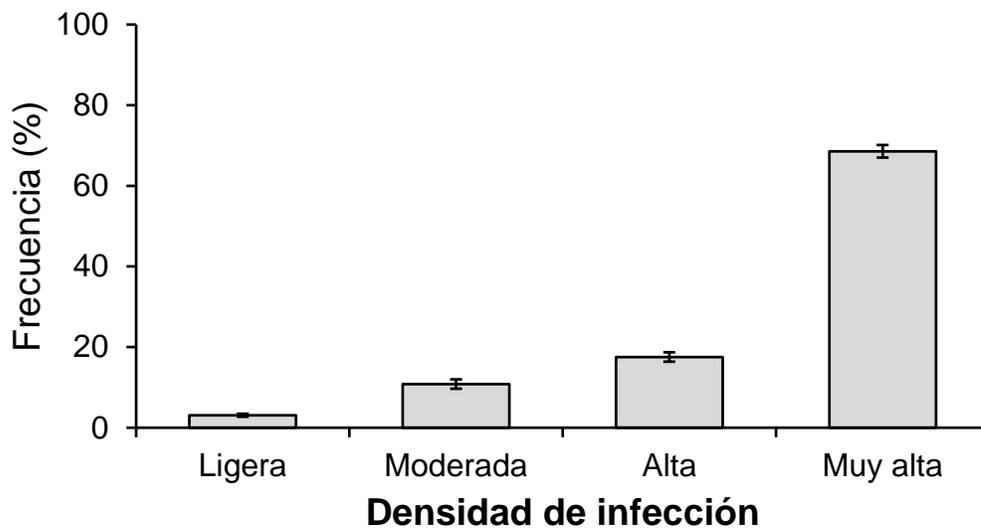
### ***Densidad de infección***

Todos los ovarios parasitados presentaron una intensidad de infección muy alta, en donde prácticamente no hubo células gaméticas dentro de sus folículos. En contraste, en el testículo presentaron los distintos niveles de intensidad de infección, los cuales se identificaron por el aumento del área ocupada por parásitos en relación con el área ocupada por gametos (Fig. 5). En la intensidad ligera, el área ocupada por parásitos (3%) fue menor al área ocupada por gametos (97%) (Fig. 3A). En la intensidad moderada, la cobertura de parásitos incrementa (16%) y por consiguiente, el área espermática disminuye (84%) (Fig. 3B). La alta intensidad, se caracterizó por un aumento importante de la cobertura de parásitos dentro de los folículos (40%) y una disminución del área espermática (60%) (Fig. 3C). Finalmente, en el nivel de intensidad de infección muy alta, la mayor parte del folículo está parasitada (78%) y resta muy poca área espermática (28%) (Fig. 3D). Considerando el total de las almejas parasitadas (machos y hembras) se encontró que la mayor proporción de ellas

presentó una intensidad de infección muy alta (68.5%), mientras que el menor porcentaje (3%) correspondió a una infección ligera (Fig. 6).



**Figura 5.** Porcentaje de área ocupada por parásitos en folículos testiculares de *Megapitaria squalida* y área ocupada por gametos en cada nivel de intensidad de infección. Las barras indican el error estándar.



**Figura 6.** Frecuencia de cada nivel de intensidad de infección de parásitos en la gónada de *Megapitaria squalida*. Las barras indican el error estándar.

***Prevalencia total, por tallas, sexo, fase de desarrollo gametogénico, estacionalidad y temperatura del mar***

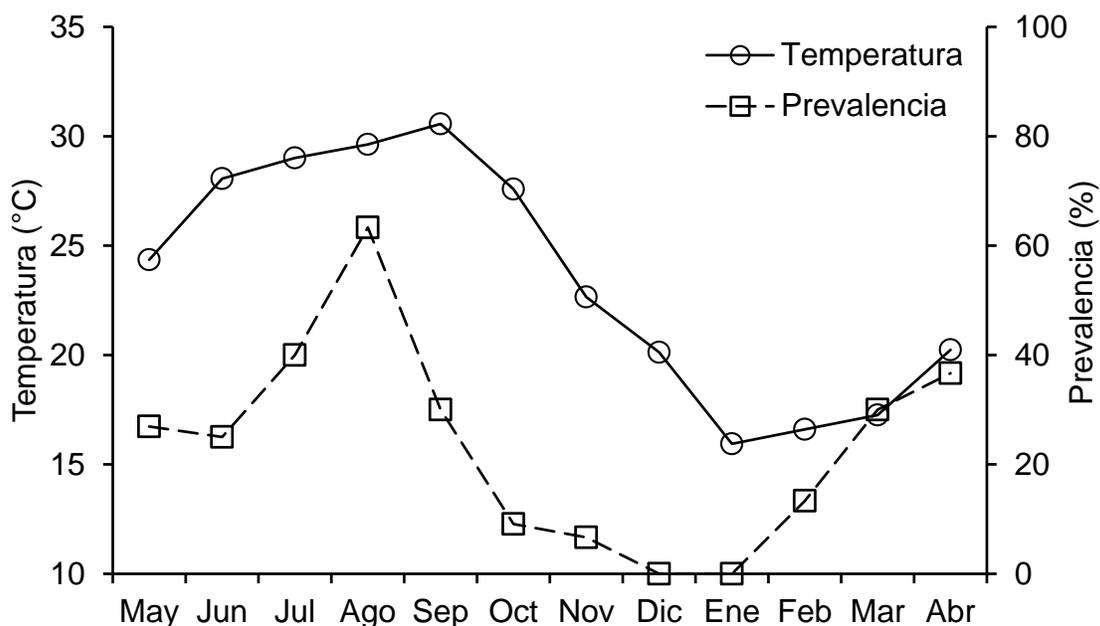
La prevalencia total, por talla, sexo, fase de desarrollo gonádico y por estación del año se muestra en la Tabla 2. De las 370 almejas obtenidas en Santa Rosalía, 87 estuvieron parasitadas (23.5% de prevalencia) con esporocistos de tremátodos digéneos en la gónada.

Respecto a la relación con la talla, se presentó una correlación significativa entre la longitud de la concha y la prevalencia ( $r = 0.816$ ,  $P = 0.00$ ). La mayor prevalencia se registró en las almejas más grandes, de 7-8 cm de longitud de concha (30.6%), mientras que en las almejas pequeñas (1–4 cm de longitud de concha) no se presentó incidencia de parásitos.

La prevalencia entre sexos fue mayor en hembras (30.2%) que en machos (17%) y en relación a la fase de desarrollo gonádico, se observó la mayor prevalencia de almejas parasitadas en la fase de madurez (54.5%) y en la época de verano (41.5%) y no se encontró diferencias significativas entre el número de almejas parasitadas y no parasitadas ( $\chi^2 = 0.63$ ;  $P = 0.425$  y  $\chi^2 = 2.8$ ;  $P = 0.090$ , respectivamente). Por otra parte, se presentó una correlación significativa entre la prevalencia y la temperatura del mar ( $r = 0.582$ ,  $P = 0.046$ ) (Fig. 7). La mayor prevalencia se presentó en julio y agosto (63 y 40%, respectivamente), cuando se presentaron temperaturas altas (29 y 30°C, respectivamente). En noviembre, diciembre y enero se presentaron las prevalencias más bajas (7, 0 y 0%, respectivamente) cuando la temperatura disminuyó (23, 20 y 16°C, respectivamente).

**Tabla 2.** Prevalencia de parásitos en la gónada de *Megapitaria squalida*. Se muestra la prevalencia (%) total, por intervalo de talla, sexo, fase de desarrollo gonádico y por estación del año. Los análisis corresponden a la correlación de Spearman ( $r$ ) y a la prueba de Chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). Los valores de  $P$  significativos ( $< 0.05$ ) se indican con un asterisco (\*).

	No. de almejas	Almejas parasitadas	Prevalencia (%)	Análisis
<b>Total</b>	370	87	23.5	
<b>Longitud de la concha (cm)</b>				
1-2	2	0	0	$r = 0.816, P = 0.001^*$
3-4	2	0	0	
5-6	151	21	13.9	
7-8	215	66	30.6	
<b>Sexo</b>				
Hembras	182	55	30.2	$\chi^2 = 6.99; df = 1; P = 0.001^*$
Machos	188	32	17	
<b>Fases de desarrollo gonádico</b>				
Reposo	20	0	0	$\chi^2 = 20; df = 1; P = 0.010^*$
Desarrollo	75	17	22.6	$\chi^2 = 22.4; df = 1; P = 0.000^*$
Madurez	77	42	54.5	$\chi^2 = 0.63; df = 1; P = 0.425$
Desove	152	26	17.1	$\chi^2 = 65.7; df = 1; P = 0.005^*$
Posdesove	46	2	4.3	$\chi^2 = 38.3; df = 1; P = 0.001^*$
<b>Estacionalidad</b>				
Primavera	86	27	31.3	$\chi^2 = 11.9; df = 1; P = 0.010^*$
Verano	101	42	41.5	$\chi^2 = 2.8; df = 1; P = 0.090$
Otoño	93	14	15	$\chi^2 = 45.4; df = 1; P = 0.001^*$
Invierno	90	4	4.4	$\chi^2 = 74.7; df = 1; P = 0.001^*$



**Figura 7.** Variación mensual (mayo de 2012 a abril de 2013) de la temperatura del mar y la prevalencia de parásitos en la gónada de *Megapitaria squalida*.

## DISCUSIÓN

En el Pacífico mexicano, incluyendo el Golfo de California se han realizado diversos estudios histológicos del tejido gonádico de *M. squalida* (Singh-Cabanillas *et al.*, 1991; Villalejo-Fuerte *et al.*, 1996; Baqueiro & Aldana, 2000; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000; Arellano-Martínez *et al.*, 2006; Romo-Piñera *et al.*, 2009) y en ninguno de ellos se ha reportado la ocurrencia de parásitos, por lo que este trabajo corresponde al primer registro de parásitos para la especie, especialmente de tremátodos digéneos.

La gónada es a menudo el principal órgano infectado por larvas de trématodos digéneos (Lauckner, 1983a), lo que a su vez afecta a la producción de células gaméticas y al rendimiento reproductivo del huésped (Gilardoni *et al.*, 2012; Corte, 2015). La infección ocurre comúnmente en el espacio hemocélico de la gónada (Cort *et al.*, 1954; Lauckner, 1983b; Galaktionov & Dobrovolskij, 2003); sin embargo, cabe destacar, que en el presente estudio los esporocistos se encontraron dentro de los folículos. El crecimiento terminal en los espacios hemocélicos conduce a una

compresión gradual de los acinos por la masa del esporocisto que resulta en una castración parasitaria parcial o, en la mayoría de las veces, completa (Lauckner, 1983; Valderrama *et al.*, 2004). Un daño físico similar parece ser responsable de la castración en *M. squalida*; sin embargo, en lugar de que los folículos se compriman desde el exterior (Laucker, 1983a; Galaktionov & Dobrovolskij, 2003; Valderrama *et al.*, 2004), son invadidos desde el interior, lo que causa la destrucción y reemplazo de los gametos a través de la acumulación de esporocistos parasitarios (Oliva, 1992). Los cambios histológicos en los folículos gonadales de *M. squalida* de Santa Rosalía sugieren que las larvas de tremátodos causan una castración mecánica, ya que no se observaron indicios de alteración o desorganización celular. Sin embargo, no podemos descartar una castración química de los parásitos a través de la secreción de sustancias líticas y toxinas que conducen al deterioro de las células reproductivas (Oliva, 1992). Lo más probable es que la castración sea debido a daños tanto mecánicos y la descomposición de los tejidos (Winstead *et al.*, 2004).

Los tremátodos digéneos pueden usar a los bivalvos como hospederos primarios (primeros intermedios) o secundarios (segundos intermediarios), o excepcionalmente como anfitriones definitivos (ver revisiones de Laucker, 1983a y Galaktionov & Dobrovolskij, 2003). En este caso, la presencia de esporocistos con bolas germinales y cercarias en desarrollo indica que *M. squalida* es utilizada por los tremátodos como primer huésped intermedio, lo cual es común en los moluscos bivalvos (Aldana *et al.*, 2009; Gilardoni *et al.*, 2011). Sin embargo, la presencia de metacercarias enquistadas en el tejido conectivo de la gónada, sugiere que *M. squalida* podría actuar también como un segundo huésped intermedio.

En general, se sabe que el desarrollo de tremátodos (esporocistos o redias) en el primer huésped intermedio tiene efectos negativos, como la inhibición de las funciones en los tejidos parasitados (Corte, 2015), pero con ninguna o muy poca reacción del huésped (Laucker, 1983a; Galaktionov & Dobrovolskij, 2003; Boehs *et al.*, 2010). En el presente estudio, se encontró que el tejido conectivo de las gónadas parasitadas en las hembras y los machos mostró la misma organización en relación con las gónadas no parasitadas. Sin embargo, otra evidencia del efecto negativo sobre la reproducción de *M. squalida* fue la respuesta inflamatoria, como lo demuestra una

fuerte infiltración hemocítica y la formación de granulocitomas alrededor de las estructuras del parásito. Esta fuerte reacción del huésped, presumiblemente inducida por esporocistos (o redias), parece ser poco frecuente en los moluscos que actúan como primeros huéspedes intermedios de tremátodos digéneos (Cremonte *et al.*, 2005). En los moluscos bivalvos, la actividad hemocítica está implicada en varias funciones fisiológicas; en el caso de la respuesta inmune, estas células desempeñan un papel clave porque detectan, encapsulan y fagocitan agentes extraños, que son posteriormente removidos (mecanismo principal de defensa celular) (Cima *et al.*, 2000; Mayrand *et al.*, 2005). La formación de granulocitomas en nuestro estudio indica que *M. squalida* tiene la capacidad inmunológica para encapsular y destruir los parásitos; sin embargo, su efectividad depende de la densidad de infección y el estado inmunológico de la almeja. En este sentido, la infiltración hemocítica más intensa se observó en los folículos con una densidad de infección muy alta, similar a los hallazgos reportados por da Silva *et al.* (2002) en el manto de mejillones fuertemente infectados por tremátodos (*Bucephalus* sp.).

A diferencia de los esporocistos, las metacercarias no causaron ningún efecto negativo en la estructura histológica de las almejas de Santa Rosalía, ni se observó una respuesta celular, tal vez porque la intensidad de la infección era baja (1 a 3 metacercarias enquistadas por espécimen). En general, la infección por metacercarias generalmente no causa la castración del hospedero (Lauckner, 1983a) u otro daño grave o lesión significativa (Bower *et al.*, 1994; Winstead *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando la abundancia de parásitos y la intensidad de la infección son altas, los efectos patológicos son generalmente evidentes en los tejidos y la concha, incluyendo la hipertrofia y la deformidad de las valvas (Boehs *et al.*, 2010), por lo cual los tremátodos pueden ser un determinante importante que afecte el crecimiento de los bivalvos (Taskinen, 1998; Thieltges, 2006).

Por otro lado, el análisis de la prevalencia por etapa de madurez reveló que los parásitos estaban presentes en las gónadas de especímenes adultos (longitud de la concha > 5 cm). Este patrón coincide con los reportes que indican una mayor prevalencia de infestación de bucéfalos en mejillones más grandes/más viejos (Lasiak, 1993; Villalba *et al.*, 1997). Las almejas más grandes o más viejas han sido expuestas

al agente infeccioso por un período más largo y filtran mayores volúmenes de agua en relación con individuos más pequeños o más jóvenes, por lo que son más susceptibles a la infección (Boehs *et al.*, 2010). También se ha sugerido que los huéspedes más grandes tienen más espacio para ser parasitados y proporcionar más energía disponible para los parásitos (Taskinen & Valtonen, 1995).

Otro resultado poco frecuente encontrado en nuestro estudio, es la mayor prevalencia de infección en hembras (30.2%) en comparación con los machos (17%). Por lo general, ambos sexos del huésped bivalvo son afectados y esterilizados por bucéfalos en una extensión similar (Lauckner, 1983a). Se ha observado una desviación de esta regla general en *Pecten alba* en la bahía de Port Phillip (Victoria, Australia), donde hasta el 67% de la población de este pectínido se componía de hembras estériles (Sanders, 1966). En los moluscos bivalvos, la cantidad de energía asignada a la reproducción es relativamente alta, particularmente en las hembras; por lo tanto, las hembras pueden asignar menos energía a la defensa del sistema inmune, lo que las hace más vulnerables al parasitismo (Taskinen & Valtonen, 1995, Müller *et al.*, 2015). Sin embargo, faltan estudios detallados para explicar estas discrepancias y se necesitan experimentos de laboratorio para examinar la predicción de que las almejas hembra son más vulnerables que los machos. La prevalencia de parásitos en estas almejas mostró un marcado patrón estacional, con la mayor prevalencia de parásitos en el verano, cuando las temperaturas del agua de mar fueron más altas. Aunque algunos estudios han demostrado que las altas temperaturas favorecen la maduración de las larvas de tremátodos, así como el aumento en la producción de cercarias (Poulin & Mouritsen, 2006; Prinz *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2013); existe un umbral óptimo de temperatura para el desarrollo de las larvas (Morley & Lewis, 2013). Aunque la temperatura se considera uno de los principales parámetros que rigen el ciclo de vida de muchos parásitos, sus efectos pueden variar dependiendo de la especie (Koprivnikar & Poulin, 2009).

Por último, la prevalencia total de larvas de tremátodos en la gónada de *M. squalida* de Santa Rosalía fue muy alta (23.5%) en comparación con las reportadas para otros veneridos en sitios moderadamente contaminados o no contaminados: 1.82% en *Eurhomalea lenticularis* (Valderrama *et al.*, 2004), 6.67% en *Protothaca*

*antiqua* (Cremonte *et al.*, 2005), 7.43% en *Anomalocardia brasiliiana* (Boehs *et al.*, 2010) y 0.45% en *Amiantis purpurata* (Gilardoni *et al.*, 2011). Lo anterior, junto con la ausencia de parásitos en las almejas de San Lucas, sugiere que la alta prevalencia de parásitos en almejas de Santa Rosalía se debe a los niveles anormalmente altos promedio de algunos metales pesados en los sedimentos superficiales de la dársena del puerto de Santa Rosalía, particularmente Cu (3,390 mg kg<sup>-1</sup>) Zn (1,916 mg kg<sup>-1</sup>), Co (166 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (6,770 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (226 mg kg<sup>-1</sup>) y U (11.8 mg kg<sup>-1</sup>) (Shumilin *et al.*, 2013). Es sabido que el estrés relacionado con la contaminación y el estrés ambiental natural actúan de forma sinérgica o, rara vez, antagónicamente, y determinan en gran medida la respuesta del organismo a los agentes causantes de enfermedades (Lauckner, 1983a). De manera similar, los organismos que viven en sitios contaminados son más susceptibles a ser parasitados, ya que los contaminantes afectan negativamente al sistema inmunitario (baja inmunocompetencia), por lo que disminuyen la resistencia de los hospedadores a las infecciones (Morley *et al.*, 2006). No obstante, también es posible que el parásito tenga una distribución diferencial (no hay presencia en San Lucas), pero la proximidad de ambos sitios (13 km sobre la costa) lo hace altamente improbable.

En conclusión, este primer registro de larvas de tremátodos digéneos en la gónada de *M. squalida* indica que estos bivalvos sirven como hospederos intermediarios y que la elevada densidad de infección causa castración parasitaria, afectando así la reproducción del huésped. Lo más probable es que el ambiente contaminado de Santa Rosalía favorece la aparición y alta densidad de infección de las almejas por las larvas de tremátodos, que aumenta en la estación cálida. Sin embargo, se necesitan más análisis y trabajo de laboratorio para examinar los mecanismos subyacentes a las infecciones, así como comprender mejor esta compleja relación parasitismo-contaminación. Dado el alto valor comercial y el consumo humano de la almeja chocolata, es esencial llevar a cabo más estudios centrados en la identificación taxonómica y el ciclo de vida de sus parásitos (incluyendo otros huéspedes potenciales). Esta información será útil para el manejo de las poblaciones naturales y el cultivo de esta almeja, así como para una adecuada evaluación sanitaria de las almejas destinadas al consumo humano.

---

## CAPÍTULO 3

---

### **SALUD REPRODUCTIVA DETERIORADA DE *Megapitaria squalida* EN EL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BCS, MÉXICO**

#### **1. NEOPLASIA TESTICULAR**

Este capítulo fue sometido bajo la siguiente referencia:

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. **GONADAL NEOPLASIA IN MALES OF CHOCOLATE CLAM *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) FROM A HEAVY METALS POLLUTED HARBOR.** *Journal of Invertebrate Pathology.*

## RESUMEN

Este estudio reporta por primera vez la ocurrencia de neoplasia en las gónadas de almeja *Megapitaria squalida*. Se observó la presencia de neoplasia gonadal tipo germinoma únicamente en machos del puerto minero de Santa Rosalía (6.2% de prevalencia), un sitio con altas concentraciones de metales pesados. Las características citodiagnósticas de las células neoplásicas muestran la presencia de anisocariosis e hipercromasia, así como algunas figuras mitóticas. La afectación tumoral se presentó desde intensidad baja hasta alta, con la mayoría de los folículos totalmente invadidos y en algunos casos, se observó la pérdida de la arquitectura gonadal con la ruptura de la pared del folículo. Los resultados indican que los tumores gonadales son malignos y afectan negativamente la espermatogénesis de *M. squalida*.

**Palabras clave:** germinoma, tumores gonadales, moluscos bivalvos, contaminación por metales pesados.

## INTRODUCCIÓN

La neoplasia gonadal, es una condición tumoral que se caracteriza por la sustitución del epitelio germinal normal con células poliédricas hipertrofiadas (Barber, 2004). Basados en su origen, esta neoplasia se ha clasificado en tres histotipos básicos: de origen estromal, formado por células fusiformes; el gonadoblastoma, una mezcla tumoral de células del estroma y del tejido germinal; y el germinoma, caracterizado por la proliferación anormal de células germinales inmaduras (Peters *et al.*, 1994; Darriba *et al.*, 2006). En todos los casos, esta enfermedad progresiva a menudo lleva a la muerte del animal, aunque a la fecha, su ocurrencia ha sido reportada en pocos moluscos bivalvos en el mundo (Carballal *et al.*, 2015) tales como *Mercenaria mercenaria* (Yevich & Barry, 1969); *Crassostrea virginica* (Peters *et al.*, 1994); *Mya arenaria* (Barber, 1996); *Ensis arcuatus* (Darriba *et al.*, 2006) y *Mytilus galloprovincialis* (Ruiz *et al.*, 2011). Su incidencia ha sido mayormente encontrada en los ovarios (Barry & Yevich, 1972; Hesselman *et al.*, 1988), pero estudios más recientes han confirmado una mayor incidencia en los machos (Alonso *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2011), sin tener a la fecha una relación clara entre el sexo y el desarrollo de la neoplasia.

Los agentes etiológicos de la neoplasia gonadal son aún desconocidos (Darriba *et al.*, 2010), sin embargo, diversos autores han sugerido una relación causa y efecto de la contaminación ambiental sobre el desarrollo de enfermedades neoplásicas en moluscos bivalvos (Wolowicz *et al.*, 2005). De hecho, el primer reporte de neoplasia gonadal en *M. arenaria* se produjo después de un derrame de petróleo No. 2 y de combustible para aviones JP-5 Long Cove, Maine, EE.UU. (Barry & Yevich, 1975). El puerto minero de Santa Rosalía, en el Golfo de California, México es un puerto de cabotaje en el que el mayor movimiento de embarcaciones proviene de la comunidad de pescadores del pueblo. Sin embargo, es una zona que presenta altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos en los sedimentos marinos provenientes de la antigua minería y en el que se han reportado valores anormales de Cu (3,390 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (1,916 mg kg<sup>-1</sup>), Co (166 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (6,770 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (226 mg kg<sup>-1</sup>), y U (11.8 mg kg<sup>-1</sup>) (Shumilin *et al.*, 2013). En este sitio, existen bancos de almeja chocolata *Megapitaria squalida*, un bivalvo de mucha importancia comercial en

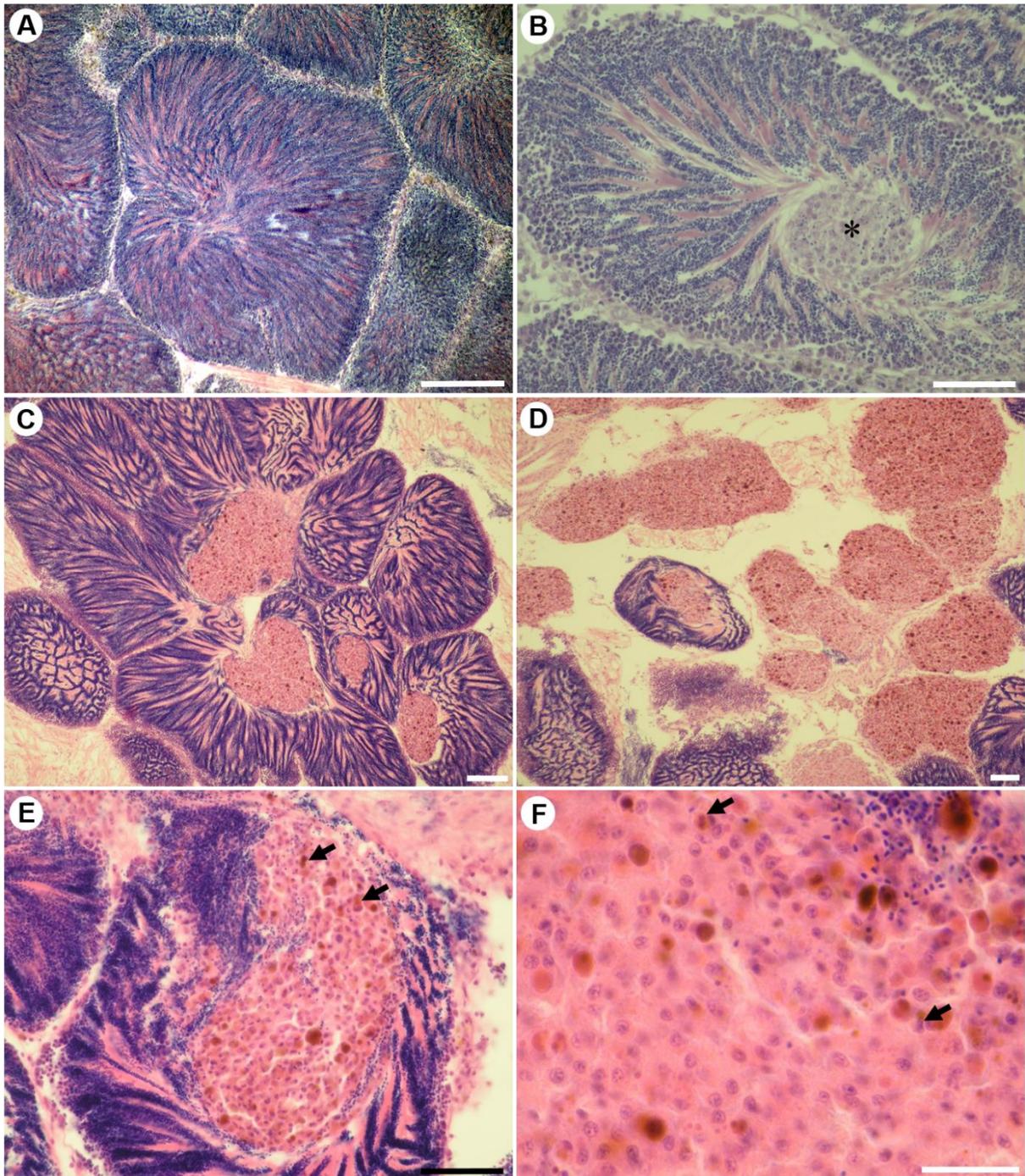
México. Derivado de un estudio sobre el estado de salud de esta especie en diferentes localidades costeras de la península de Baja California, México, se encontró que en este sitio *M. squalida* muestra una pobre condición fisiológica (Yee-Duarte *et al.*, 2017a). Dado lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue investigar la ocurrencia de neoplasia en *M. squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía y en una zona cercana sin actividades mineras.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se colectaron mensualmente 30 especímenes de *M. squalida* entre mayo de 2012 y abril de 2013 en un punto adyacente a la zona “hot spot” (Shumilin *et al.*, 2013) del puerto minero de Santa Rosalía (27°20' N y 112°16' W). A la par, también se obtuvieron muestras en la playa San Lucas ubicada a 13 km al sur del puerto (27°13' N y 112°16' W), la cual se utilizó como zona de referencia debido a que ahí no se realizan actividades mineras. Para cada espécimen, se registraron el peso total y el peso del tejido húmedo ( $\pm 0.1$  g) para calcular el índice de condición como la relación relativa (porcentaje) entre el peso del tejido húmedo (sin concha) y el peso total (Mouneyrac *et al.*, 2008). Una porción de la gónada de cada individuo se fijó en formaldehído al 10% preparado con agua de mar y estas muestras se procesaron con la técnica histológica convencional, que consiste en la deshidratación del tejido, aclaramiento con Hemo-De® e inclusión en Paraplast-Xtra®. Con un micrótopo, se obtuvieron cortes de 5  $\mu$ m de grosor y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) (Humason, 1979) y después se observó la estructura gonádica bajo el microscopio de luz. La prevalencia fue calculada como la relación entre el número de individuos con presencia de neoplasia y el total de individuos analizados en cada lugar. Se determinó la intensidad de tumoración con base en la escala propuesta por Ruiz *et al.* (2013) como sigue: (1) baja intensidad, con uno o pocos folículos gonadales afectados, (2) moderada, que afecta a casi la mitad de los folículos y (3) alta intensidad, con la mayoría de los folículos afectados. El índice de condición de los machos con neoplasia versus sin neoplasia se comparó dentro de los sitios con una prueba de Kruskal-Wallis (Zar, 1996). Para esta comparación, solo se utilizaron almejas sanas de los mismos meses y tamaños (longitud de concha) de las almejas con neoplasia.

## RESULTADOS

En total se obtuvieron 370 especímenes de Santa Rosalía (182 hembras y 188 machos); 326 de San Lucas (159 hembras y 167 machos) fueron recolectados. Se observó una estructura gonada normal en todos los individuos recogidos en el sitio de San Lucas. En contraste, de 188 machos recolectados en Santa Rosalía, 23 tenían tumores (prevalencia general: 6.2% y 12.2% de machos con neoplasia). Todas las hembras de este sitio tenían una estructura gonadal normal. El índice de condición fue significativamente menor ( $H_1$ ,  $46 = 7.12$ ,  $P = 0.007$ ) en las almejas con neoplasia ( $16.7 \pm 3.4$ ) en comparación con las almejas que no tenían neoplasia ( $19.5 \pm 2.6$ ). En los machos sanos, el tejido gonádico presentaba folículos con una estructura normal, los cuales contenían una capa de espermatogonias en su periferia y el lumen lleno de espermatozoides (Fig. 1A). En los testículos afectados también se observaron folículos sanos, sin embargo, muchos presentaban tumores, los cuales se caracterizaron por la proliferación anormal de células germinales no diferenciadas formando una masa principalmente en el lumen folicular. Se presentaron las tres etapas de intensidad de tumoración. En la intensidad 1, se observaron de 1 a 3 folículos testiculares con presencia de células neoplásicas identificadas como pequeños focos en el lumen de los folículos y la estructura folicular no presentó modificación (Fig. 1B); la intensidad 2, se caracterizó por la ocurrencia de tumores en casi el 50% de los folículos, y aunque no se observó alteración en la estructura folicular, la mayoría del folículo estaba invadido (Fig. 1C); en la intensidad 3, la mayoría de los folículos presentaron tumores y prácticamente invadidos de células neoplásicas, lo que provocó el desplazamiento de las células gaméticas, y en algunos casos, se perdió la estructura folicular con la ruptura de las paredes de los folículos y la invasión del tumor hacía el tejido conectivo (Fig. 1D). La mayoría de las células que conforman los tumores presentan citoplasma basofílico y algunas presentan acidofílico, con núcleos de distinto tamaño y teñidos intensamente y en algunos casos, se observaron figuras mitóticas (Fig. 1E y F).



**Figura 1.** Fotomicrografías de secciones histológicas (H&E) del testículo de *Megapitaria squalida*. (A) Estructura folicular normal de un testículo conteniendo espermatogonías adheridas a la pared del folículo y espermatozoides en el lumen. (B) Baja intensidad de masas neoplásicas (asteriscos) dentro del lumen de los folículos.

(C) Intensidad moderada de neoplasia en casi el 50% de los folículos; es evidente la gran invasión neoplásica, pero sin afectar la estructura. (D) La mayoría de los folículos están afectados y aparecen completamente invadidos por la neoplasia; se pierde la estructura folicular. (E) y (F) Formación de masas de células neoplásicas con citoplasma acidófilo y algunos basófilos, con núcleos teñidos intensamente de diferentes tamaños. Se presentaron algunas figuras mitóticas (flechas). Escala: 50 µm.

## DISCUSIÓN

Con base en las características histológicas observadas, los tumores encontrados en *M. squalida* de la costa del pueblo minero Santa Rosalía en el Golfo de California corresponden al histotipo del germinoma. Esta es la forma más representativa de neoplasia gonadal en los bivalvos (Peters *et al.*, 1994; Darriba *et al.*, 2006), y el presente estudio es el primer caso de neoplasia reportado en moluscos bivalvos marinos en México. Las características citodiagnósticas de las células neoplásicas en el testículo de *M. squalida* revelan el mismo tipo de patología reportada para otros moluscos (Alonso *et al.*, 2001; Carella *et al.*, 2009). Las características de esta neoplasia gonadal encontradas en los folículos testiculares de *M. squalida* coinciden con las descritas para los germinomas reportados para *Mercenaria* spp. (Yevich & Barry, 1969; Hesselman *et al.*, 1988), *Mya arenaria* (Barber, 1996; 2004), *Ensis arcuatus* (Darriba *et al.*, 2006) y *Ensis siliqua* (Ruiz *et al.*, 2013). Las diferencias en el tamaño de los núcleos celulares sugieren anisarioosis, así como la variación en la intensidad de la tinción en algunos núcleos, indicativa de hipercromasia (Lauckner, 1983). Por otro lado, aunque las figuras mitóticas son más comunes en la neoplasia diseminada (Ruiz *et al.*, 2013), el hecho de que se observaron en el estudio actual confirma la proliferación celular.

En este estudio, la prevalencia del germinoma fue baja (6.2%) en comparación con los informes de *Mercenaria* spp. (80%) en la costa central de Florida (Arnold *et al.*, 2002), pero similares a los reportados para *M. mercenaria* (2.6%) de Rose Island, Rhode Island (Barry & Yevich, 1972) y *Mercenaria* spp. (11.6%) de Indian River, Florida (Hesselman *et al.*, 1988). La neoplasia gonadal se ha observado principalmente en hembras (Barry & Yevich, 1972; Hesselman *et al.*, 1988; Barber, 1996); sin embargo,

este estudio lo encontró solo en machos, como informaron anteriormente Alonso *et al.* (2001) y Ruiz *et al.* (2011). Aunque no hay una explicación convincente para esta observación en Santa Rosalía, la enfermedad puede afectar la diferenciación sexual, lo que resulta en una mayor proporción de hembras o machos enfermos, dependiendo de las circunstancias particulares (Carballal *et al.*, 2015). Obviamente se requiere más evidencia para confirmar esta hipótesis.

Los efectos más obvios del germinoma en los bivalvos incluyen la alteración de la gametogénesis; a medida que la enfermedad progresa, las células germinales indiferenciadas proliferan y reemplazan las células gaméticas, lo que conduce a una fecundidad menor (Carballal *et al.*, 2015). La evidencia histológica en el presente estudio reveló que los tumores estaban presentes en muy pocos a prácticamente todos los folículos de los machos del sitio contaminado. Los casos de alta intensidad involucraron el desplazamiento total de los espermatozoides y, en algunos casos, la pérdida de la arquitectura gonadal con la ruptura de la pared del folículo. Por otro lado, la gónada de *M. squalida* es adyacente a la glándula digestiva, y no se observó invasión de las células neoplásicas a este tejido. Sin embargo, el tumor invadió el tejido conectivo, sugiriendo metástasis y un efecto negativo resultante sobre la espermatogénesis (Barber, 2004; Carballal *et al.*, 2015). Además, la condición baja en almejas con neoplasia indica un efecto negativo sobre la condición fisiológica general y la emaciación tisular de *M. squalida*. Estos son indicaciones generales de que los organismos afectados están experimentando estrés nutricional, el resultado de una reducción en la ingesta o asimilación de energía, o una carga metabólica adicional impuesta por las células neoplásicas que se multiplican rápidamente (Barber, 2004).

La ausencia de neoplasias gonadales en almejas de San Lucas, a pesar de su proximidad a Santa Rosalía, sugiere que la contaminación por metales pesados promueve el desarrollo de esta enfermedad. Esta idea se ve reforzada por el hallazgo de neoplasmas en varios moluscos que viven en sitios contaminados (Barber, 2004). Los efectos adversos de los metales están relacionados con las concentraciones de exposición y la neoplasia gonadal puede ser resultado de una acción tóxica directa sobre los tejidos o de alteraciones indirectas en los mecanismos homeostáticos, como el metabolismo y la respuesta inmune (Pipe *et al.*, 1999). Aunque el cobre es un metal

esencial, con un papel como cofactor en numerosas enzimas (citocromo oxidasa, superóxido dismutasa, entre otras), puede ser tóxico cuando está presente en concentraciones más altas que las necesarias para la función metabólica normal (Gomes *et al.*, 2011). El papel del cobre tanto en la etiología como en el crecimiento de los tumores ha sido extensamente estudiado en animales terrestres, pero muy poco en acuáticos; se ha demostrado que el exceso de cobre es un oxidante potente que causa la generación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo (Gupte *et al.*, 2009).

En conclusión, basados en las características histológicas se determinó que los tumores gonadales son malignos y afectan negativamente la espermatogénesis de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía, y aunado a la baja condición fisiológica reportada con anterioridad, la neoplasia posiblemente los conduzca a la muerte. Se sugiere un efecto del ambiente contaminado como agente etiológico de la neoplasia, sin embargo, se requiere de más investigación para comprender mejor su etiología.

---

## CAPÍTULO 3

---

### 2. ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA GÓNADA

Este capítulo fue sometido bajo la siguiente referencia:

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Camacho-Mondragón, M.A., Uría-Galicia, E. and Arellano-Martínez, M. **HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE GONAD OF *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) INHABITING A HEAVY METALS POLLUTED ENVIRONMENT.** *Journal of Aquatic Animal Health.*

## RESUMEN

El estado de salud gonádica de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* del puerto minero de Santa Rosalía y de la playa San Lucas (sitio de referencia), Golfo de California, fue evaluado por medio de análisis histológico y el Índice de Alteración Histopatológica (IAH) en el tejido reproductivo. Adicionalmente, la acumulación de cobre y hierro se determinó histoquímicamente. Nuestros resultados revelaron una alta acumulación de cobre (30%) y hierro (45%) solo en las gónadas de las almejas de Santa Rosalía, así como alteraciones histopatológicas que corresponden a respuestas inflamatorias, procesos degenerativos/progresivos, muerte celular y respuesta a agentes infecciosos. El IAH fue significativamente mayor en los organismos de Santa Rosalía ( $72.18 \pm 6.12$ ) con respecto a los de la playa San Lucas ( $4.60 \pm 1.07$ ). En la playa de San Lucas, la mayor prevalencia se da en la etapa de posdesove (43.2%) y en otoño (18.4%) e invierno (17.8%) en concordancia con el período de descanso reproductivo normal, mientras que en Santa Rosalía la mayor prevalencia ocurre en la fase de madurez (76.9%) y en primavera (83.7%). En conclusión, nuestros resultados muestran un estado de salud gonadal deteriorado en *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía y sugieren una relación con la exposición crónica a los altos niveles de metales pesados en la localidad. La alta prevalencia e intensidad de las alteraciones histopatológicas en la gónada indican un fuerte efecto adverso en la gametogénesis, la calidad de las células gaméticas y, en última instancia, en el potencial reproductivo de *M. squalida* en este sitio.

**Palabras clave:** histopatología, bivalvos, reproducción, ovario, testículo, contaminación por metales pesados.

## INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras marinas son de las principales zonas de productividad biológica, pero también son las más gravemente afectadas por la presencia de contaminantes producto de actividades antropogénicas que impactan la salud de la biota planteando una preocupación ambiental significativa (Ruiz *et al.*, 2011; Sheir *et al.*, 2013).

En México, muchos ecosistemas costeros impactados por actividades antropogénicas muestran signos de degradación ambiental (García-Gasca *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado que la zona costera del puerto minero de Santa Rosalía, ubicado en la costa centro-oriental del Golfo de California, está altamente contaminada por elementos potencialmente tóxicos en sus sedimentos superficiales marinos derivado de las actividades mineras y de fundición, llevadas a cabo desde hace más de un siglo (Shumilin *et al.*, 2000; Huerta-Díaz *et al.*, 2014). Estas actividades generaron aproximadamente 370 millones de toneladas de desechos sólidos que fueron depositados y abandonados en tierra y en el mar adyacente (Shumilin *et al.*, 2011). Como resultado, los sedimentos costeros marinos contienen niveles anormalmente altos de metales pesados como Fe ( $102,400 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Cu ( $3,390 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $1,916 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Co ( $166 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $6,770 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Pb ( $226 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y U ( $11.8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Shumilin *et al.*, 2011; Shumilin *et al.*, 2013).

La exposición crónica a concentraciones altas de metales pesados en agua y sedimento, se asocia típicamente con el deterioro de las funciones fisiológicas y su consecuente daño en la salud de los bivalvos filtradores sedimentarios (Paul-Pont *et al.*, 2010; Sacchi *et al.*, 2013). El efecto adverso puede resultar de la acción tóxica indirecta sobre los mecanismos homeostáticos, como el metabolismo y la respuesta inmune, o de alteraciones sobre tejidos específicos lo que conduce a una mayor susceptibilidad a patógenos y al desarrollo de alteraciones histopatológicas (Pipe *et al.*, 1999; Sheir *et al.*, 2013). Particularmente, el deterioro del tejido gonadal y la viabilidad de los gametos es una de las consecuencias más devastadoras de la contaminación marina, debido a que puede conducir a una disminución del éxito y bienestar reproductivo de los organismos (Vaschenko *et al.*, 2013). En este sentido, el análisis histopatológico se ha convertido en una herramienta importante en los

estudios de toxicología ambiental y ha sido considerado como uno de los enfoques más representativos para evaluar los efectos adversos causados por la contaminación en diversos programas de biomonitorio en todo el mundo (Costa *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2015).

A pesar de la clara evidencia de contaminación por metales pesados en la zona costera de Santa Rosalía, se sabe poco sobre algún efecto en la biota que ahí habita. Un trabajo previo demostró que la almeja chocolata *Megapitaria squalida* presenta una condición fisiológica deteriorada, tallas de concha pequeñas y un crecimiento alométrico negativo (Yee-Duarte *et al.*, 2017a). Bajo este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar de manera comparativa el estado de salud del tejido gonádico de la almeja chocolata *M. squalida* proveniente del puerto minero de Santa Rosalía y el de un área cercana sin actividades mineras ni portuarias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Muestreo***

Individuos de *M. squalida* se recolectaron en diferentes fechas entre mayo de 2012 y abril de 2013 en la zona “hot spot” del puerto minero de Santa Rosalía (27°20' N y 112°16' W), situado dentro del Golfo de California, en la costa centro-oriental de la Península de Baja California, México. A la par, se obtuvieron muestras frente a la playa San Lucas ubicada a 13 km al sur del puerto (27°13' N y 112°16' W), la cual se utilizó como zona de referencia debido a que ahí no se realizan actividades portuarias ni mineras y a que se ha reportado que *M. squalida* presenta un buen estado de salud en esa zona (Yee-Duarte *et al.*, 2017a). El peso total y la longitud de la concha de cada almeja se registraron. Se obtuvo una porción de la gónada de cada espécimen y se fijó en formaldehído al 10% preparado con agua de mar.

### ***Análisis histopatológico***

Cada porción de la gónada se deshidrató a través de una secuencia de alcoholes de concentraciones crecientes, seguido de un proceso de aclaramiento con Hemo-De® e inclusión en Paraplast-Xtra®. Con un micrótopo se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) (Humason,

1979). Adicionalmente, en ambas zonas de estudio, se seleccionaron al azar 16 individuos para extraerles porciones de gónada y teñirlas con azul Prusia de Perls y hemateína de Mallory (Howard *et al.*, 2004) para evidenciar la presencia de fierro y cobre. Estos metales se encuentran en altas concentraciones en los sedimentos de la zona de estudio y son los más comúnmente analizados con histoquímica convencional para moluscos bivalvos.

La anatomía interna de las gónadas fue examinada bajo el microscopio de luz y, con base en las observaciones, se describieron las alteraciones encontradas de acuerdo a Costa *et al.* (2013) y Cuevas *et al.* (2015). La prevalencia de cada alteración histopatológica se calculó como la relación entre el número de individuos afectados y el número total de individuos analizados en cada zona de estudio (Bush *et al.*, 1997).

Las alteraciones histopatológicas fueron categorizadas por nivel de severidad: (1) leve, (2) moderado y (3) grave, de acuerdo a lo propuesto por Costa *et al.* (2013) y Cuevas *et al.* (2015) para bivalvos. La severidad leve implica cambios que no dañan los tejidos de manera significativa (e.g. células cafés, infiltración hemocítica, respuestas inflamatorias), la severidad moderada implica cambios que son más graves y que conducen a efectos en los tejidos asociados con el funcionamiento del órgano (e.g. fibrosis, granulocitomas), mientras que la severidad grave implica daño irreversible del tejido (e.g. atresia severa, pérdida del epitelio, necrosis, parásitos, neoplasia).

El estado de salud de la gónada se evaluó semicuantitativamente por medio del Índice de Alteración Histopatológica (IAH), el cual se basa en la severidad de las lesiones (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994). El IAH se calculó para cada individuo como sigue:  $IAH = (1 \times S_I) + (10 \times S_{II}) + (100 \times S_{III})$ , donde  $S$  representa la suma del número de alteraciones para cada nivel de severidad, y I, II y III corresponde al número de alteraciones en severidad 1, 2 y 3, respectivamente. Valores del IAH entre 0 y 10 indican una función normal del tejido; valores entre 11 y 20 indican alteraciones leves; valores entre 21 y 50 indican cambios moderados; valores entre 50 y 100 indican lesiones graves; y los valores por encima de 100 indican daños irreversibles en el tejido (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Adicionalmente, se determinó la intensidad de cada alteración para hembras y machos. Para ello, utilizando el programa SIGMA SCAN PRO software (v. 5.0, Systat Software, Inc.) se tomaron dos campos al azar (en 10x) de cada laminilla y se midió el área total del tejido gonádico y el área de cobertura de cada alteración. Las áreas de cobertura se calcularon como la relación entre el área ocupada por la alteración y el área total del tejido gonádico (%).

Los valores calculados de las áreas de cobertura se categorizaron y, de acuerdo a la modificación de la escala propuesta por Bacchetta & Mantecca (2009), se designaron los siguientes niveles: intensidad (0) = estructura normal de folículos y ovocitos; intensidad ligera (1) = folículos con ovocitos normales, < del 15% del tejido ocupado por una lesión; intensidad moderada (2) = entre el 15 y el 50% de los folículos y ovocitos con lesión; e intensidad alta (3) procesos degenerativos en > 50% del tejido.

Como una medida de la acumulación del fierro y cobre en el tejido gonádico teñido con azul Prusia de Perls y con hemateína de Mallory, respectivamente, se midió el área de cobertura de los metales en relación al área total del tejido (%) en los 16 organismos elegidos para histoquímica (dos campos al azar por cada individuo). Basado en la escala propuesta por Dove & Sammut (2007): acumulación menor, moderada y extensa, y en el cálculo del porcentaje de área ocupada por el metal, se asignó un valor arbitrario a cada categoría, en donde, la acumulación menor representa < del 10% de área ocupada por el metal; moderada 10-35% y extensa > 35%.

### ***Análisis estadístico***

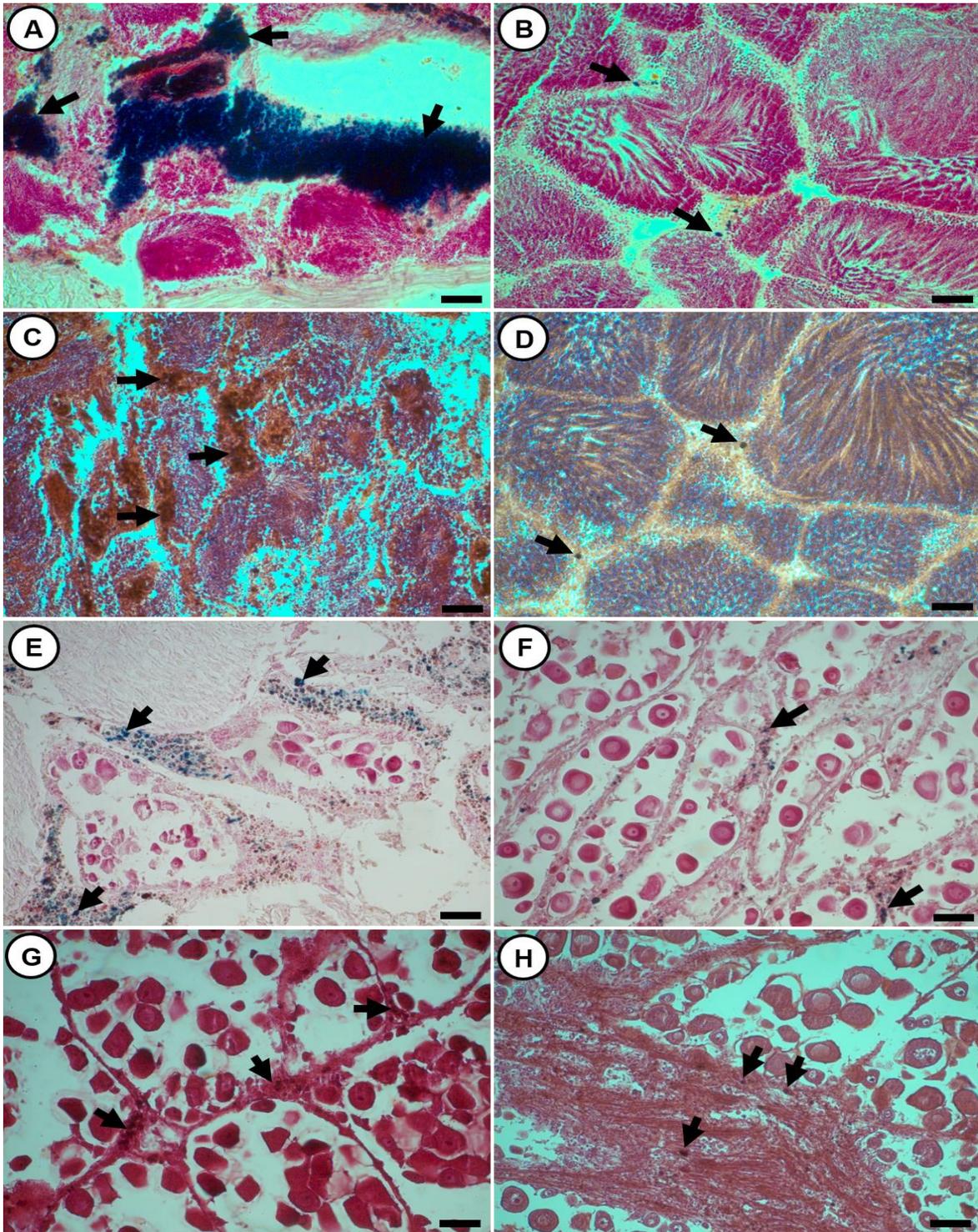
Los análisis comparativos del porcentaje de área de cobertura de fierro y cobre, el HAI y de los niveles de intensidad de las alteraciones histopatológicas se realizaron mediante pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, seguidas de pruebas de comparación de Duncan (Zar, 1996). El porcentaje de cobertura y el HAI se compararon entre zonas, mientras que los niveles de intensidad se compararon entre cada una de las alteraciones. Las diferencias en la proporción de sexos se analizaron mediante una prueba de  $X^2$  (Zar, 1996). Los análisis estadísticos se realizaron

mediante el software STATISTICA (versión 6.0, StatSoft) para Windows. El nivel de significancia ( $\alpha$ ) se estableció en 0.05 para todas las pruebas.

## **RESULTADOS**

### ***Análisis histoquímico de la acumulación de metales***

El análisis microscópico de la gónada de *M. squalida* en ambas áreas de estudio reveló la presencia de gránulos de fierro y cobre en el tejido conjuntivo interfolicular y, en algunos casos, dentro de los folículos, ocupando el espacio de los gametos (Fig. 1). Estos gránulos se tiñeron positivamente en azul para fierro y de rojo oscuro a negro para cobre. Las acumulaciones en porcentaje de área de fierro ( $X^2_1 = 21.90$ ,  $P = 0.0000$ ) y cobre ( $X^2_1 = 7.44$ ,  $P = 0.0064$ ) (Tabla 1) fueron significativamente mayores en gónadas de almejas de Santa Rosalía (Fig. 1A, C, E y G) (moderada a extensa) con relación a San Lucas, donde se observó principalmente una acumulación menor (Fig. 1B, D, F y H).



**Figura 1.** Presencia de gránulos de hierro y cobre en la gónada de *Megapitaria squalida* del puerto de Santa Rosalía (A, C, E y G) y la playa San Lucas (B, D, F y H). Gránulos

de fierro (flechas) en testículo (A y B) y ovario (E y F), tinción azul Prusia de Perls. Gránulos de cobre (flechas) en testículo (C y D) y ovario (G y H), tinción hemateína de Mallory. Escala: 50  $\mu$ m.

**Tabla 1.** Porcentaje de área ocupada por cobre y fierro obtenidos por histoquímica en la gónada de 16 especímenes de *Megapitaria squalida* por sitio de estudio. En la parte superior, se expresa la media total  $\pm$  error estándar. Categorías de acumulación: \*menor, \*\*moderada y \*\*\*extensa.

Metal	Santa Rosalía	San Lucas
Fierro	45.01 $\pm$ 2.33	5.51 $\pm$ 0.97
	22.04**	0.61*
	30.66**	1.13*
	40.54***	1.14*
	41.49***	1.47*
	41.89***	3.58*
	42.67***	4.00*
	43.61***	4.35*
	45.57***	4.54*
	45.76***	4.64*
	46.11***	5.16*
	46.46***	6.39*
	49.99***	7.74*
	51.72***	7.90*
	56.48***	10.46**
	57.53***	10.84**
	57.70***	14.34**
Cobre	28.75 $\pm$ 3.74	4.13 $\pm$ 0.83
	12.36**	1.24*
	13.51**	1.34*

14.11**	1.39*
16.73**	1.49*
17.60**	1.59*
17.67**	1.65*
22.48**	1.65*
24.30**	2.45*
24.58**	3.12*
31.15**	3.45*
31.82**	4.56*
32.08**	5.09*
38.26***	7.32*
50.06***	9.28*
52.03***	10.02**
61.39***	10.57**

---

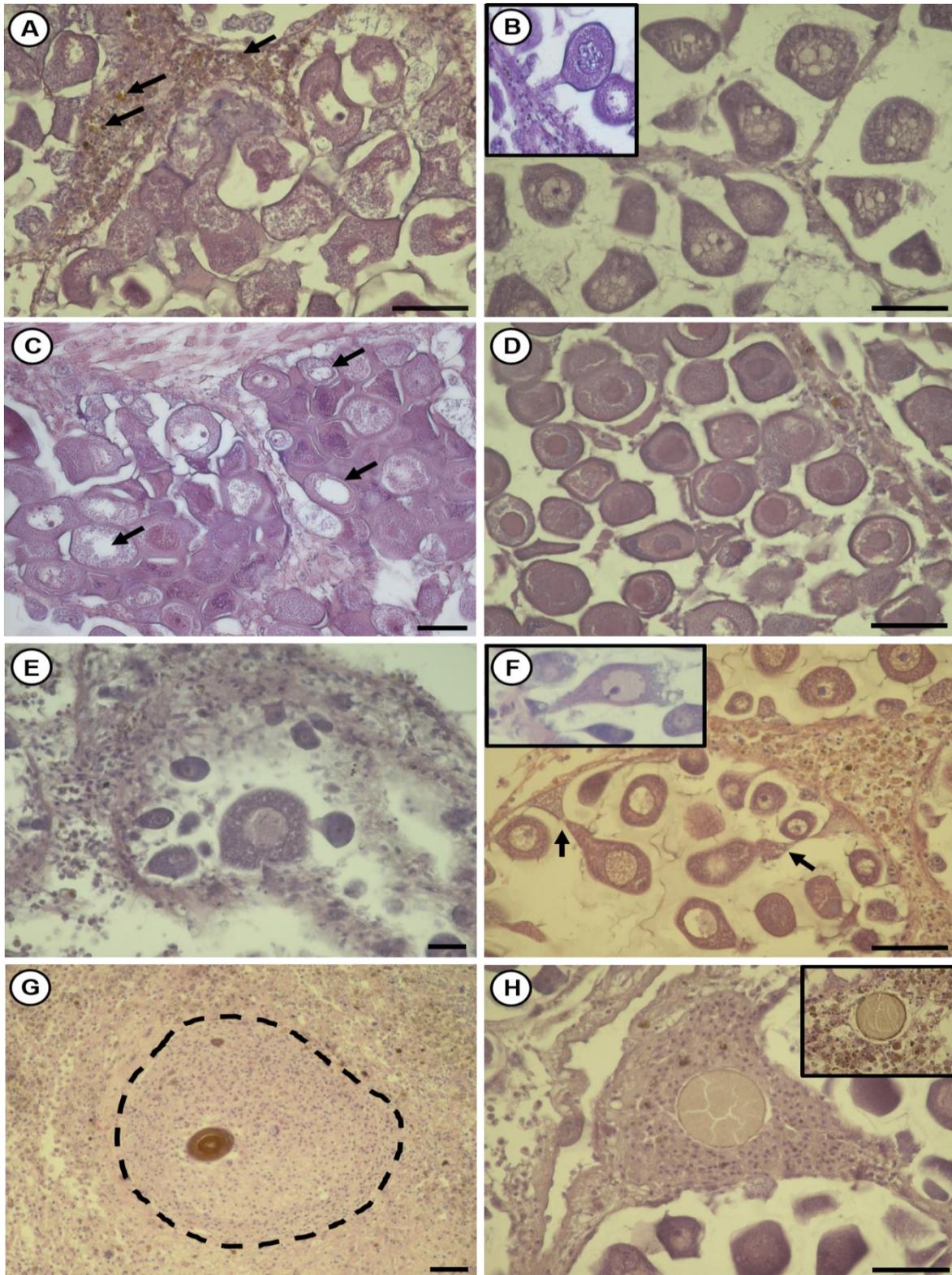
### ***Alteraciones histopatológicas***

Un total de 696 almejas fueron analizadas: 370 (182 hembras y 188 machos) del puerto minero de Santa Rosalía y 326 (159 hembras y 167 machos) de la playa San Lucas. Las variables morfométricas de *Megapitaria squalida* y las relaciones de sexos por sitio de estudio se muestran en la Tabla 2. El análisis microscópico de la gónada de *M. squalida* del puerto de Santa Rosalía, reveló la presencia de diez alteraciones histopatológicas en los ovarios y cuatro en los testículos. Los organismos de la playa San Lucas solamente presentaron dos alteraciones en el ovario y una en el testículo. Las alteraciones histopatológicas observadas en el ovario de las almejas se muestran en la Figura 2. Se observó una gran abundancia de células cafés y de ovocitos atrésicos (Fig. 2A). Las células cafés se observaron dentro del tejido conectivo interfolicular y en algunas ocasiones, dentro de los folículos. Los ovocitos atrésicos se observaron en diferentes etapas de desarrollo gametogénico (principalmente en ovocitos posvitelogénicos) y se encontraban deformes con pérdida de su integridad estructural y con el material citoplasmático degenerado. También se presentaron

numerosas vacuolas en el citoplasma nuclear (Fig. 2B), pérdida de la cromatina nuclear en algunos ovocitos posvitelogénicos (Fig. 2C), picnosis caracterizada por la condensación y basofilia de la cromatina nuclear (Fig. 2D) y ovocitos hipertróficos (Fig. 2E), que se caracterizaron por su gran tamaño ( $150.53 \pm 31.78 \mu\text{m}$ ;  $n=15$ ), los cuales en algunos casos, ocupaban casi la mitad del espacio folicular adheridos a la pared del folículo. Se observaron algunos ovocitos que, a pesar de tener características de una célula gamética madura, se encontraban adheridos a la pared del folículo por medio de un pedúnculo filamentososo largo ( $82.73 \pm 7.59 \mu\text{m}$ ;  $n=15$ ) (Fig. 2F), y en la mayoría de estos casos, se observaron signos de degeneración ovocitaria. Se observó también infiltración hemocítica recurrente en el tejido conectivo y, cuando fue muy intensa, se observó la formación de granulocitomas (Fig. 2G). Algunos de estos granulocitomas, se encontraban rodeando estructuras parasitarias no identificadas y cuerpos de inclusión (Fig. 2H) en el tejido conectivo interfolicular del ovario.

**Tabla 2.** Variables morfométricas de *Megapitaria squalida* (media  $\pm$  error estándar; mínimo–máximo) y proporción de sexos por sitio de estudio.

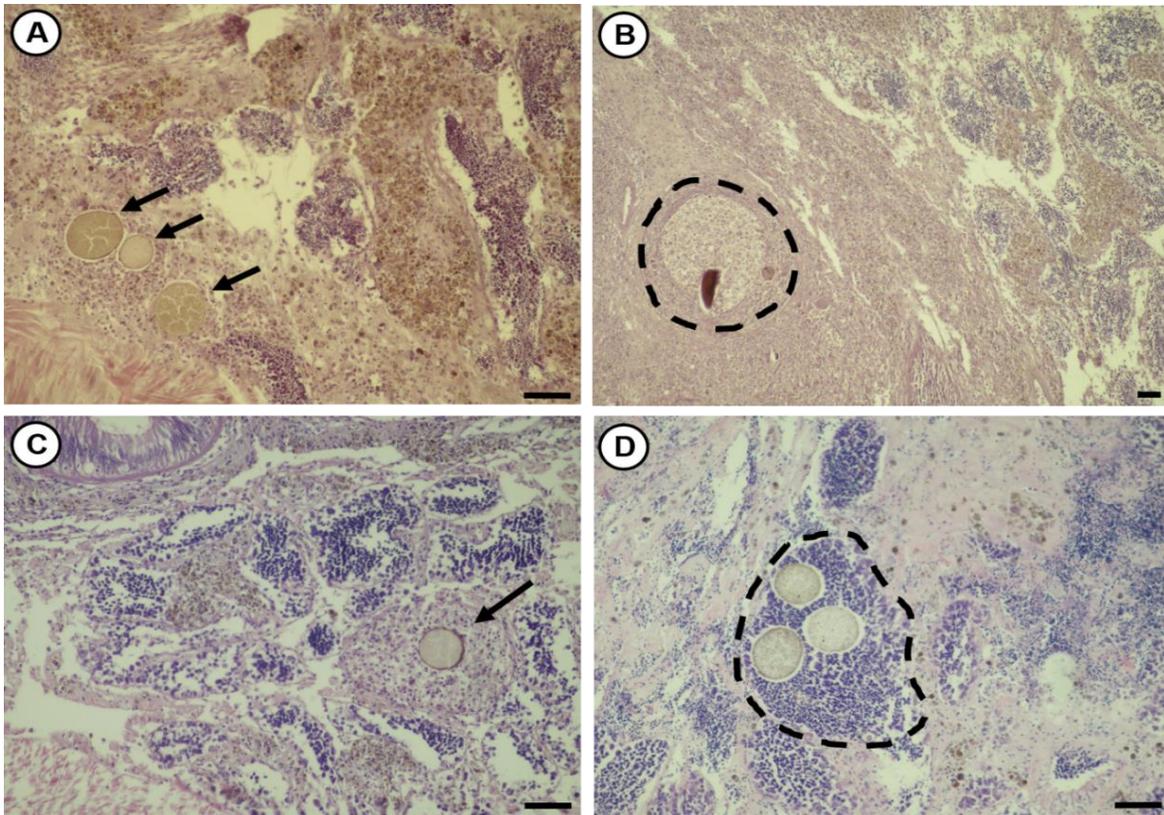
	<b>Santa Rosalía N = 370</b>	<b>San Lucas N = 326</b>
Longitud (cm)	$6.8 \pm 0.04$ 2.3–8.6	$7.7 \pm 0.05$ 5.5–12.5
Peso total (g)	$87.9 \pm 1.50$ 6.6–168	$140.3 \pm 3.36$ 38.7–480.4
Proporción de sexos	$\chi^2 = 0.04$ ; $P = 0.84$	$\chi^2 = 1.26$ ; $P = 0.26$



**Figura 2.** Alteraciones histopatológicas en el ovario de *Megapitaria squalida*. A) Presencia de ovocitos atrésicos en degeneración. Gran intensidad de células cafés

dentro del tejido conectivo interfolicular (flechas). B) Numerosas vacuolas en el citoplasma nuclear de los ovocitos. El recuadro en la parte superior izquierda indica un ovocito con la cromatina nuclear condensada adherido a la parte germinal del folículo. C) Pérdida de la cromatina nuclear (flechas) de algunos ovocitos posvitelogénicos. D) Presencia de ovocitos posvitelogénicos con el núcleo picnótico. E) Ovocito hipertrofiado adherido a la pared germinal del folículo. Nótese la diferencia de tamaño entre los demás ovocitos presentes en el folículo. F) Ovocitos adheridos a la pared folicular por medio de un pedúnculo largo y filamentoso (flechas). El recuadro en la parte superior izquierda indica un ovocito con pedúnculo largo en un proceso de degeneración. G) Intensa infiltración hemocítica en el tejido conectivo. La línea punteada indica la formación de un granulocitoma rodeando una estructura parasitaria no identificada. H) Granulocitoma rodeando un cuerpo de inclusión dentro del tejido conectivo del ovario. El recuadro en la esquina superior derecha indica la presencia de un cuerpo de inclusión rodeado de células cafés. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

Las alteraciones histopatológicas en el testículo se muestran en la Figura 3. Al igual que en los ovarios, los testículos presentaron una gran abundancia de células cafés dentro del tejido conectivo interfolicular, formando en ocasiones masas densas (Fig. 3A). También se observó infiltración hemocítica en el tejido conectivo y en algunos casos granulocitomas (Fig. 3B), los cuales, se encontraban encapsulando estructuras parasitarias no identificadas y algunos cuerpos de inclusión (Fig. 3C). Estos cuerpos se observaron en el tejido conectivo y dentro de los folículos desplazando a los espermatozoides (Fig. 3D).



**Figura 3.** Alteraciones histopatológicas en el testículo de *Megapitaria squalida*. A) Presencia de acumulaciones de células cafés dentro del tejido conectivo interfolicular. Nótese la presencia de cuerpos de inclusión (flechas) dentro del tejido conectivo del testículo. B) Intensa infiltración hemocítica en el tejido conectivo del testículo. La línea punteada indica la formación de un granulocitoma rodeando una estructura parasitaria no identificada. C) Cuerpo de inclusión (flecha) en el tejido conectivo interfolicular rodeado por un granulocitoma. D) Cuerpos de inclusión dentro del folículo (línea punteada) ocupando el lugar de los espermatozoides. Escala: 50  $\mu$ m.

### ***Prevalencia de las alteraciones histopatológicas***

La prevalencia de cada alteración histopatológica por sitio de muestreo y por sexo se presenta en la Tabla 3. En el puerto de Santa Rosalía, las alteraciones con mayor prevalencia en las hembras fueron las células cafés (70.3%) y los ovocitos atrésicos (58.2%), mientras que las alteraciones con menor prevalencia fueron la presencia de pedúnculos filamentosos (10.1%) y granulocitomas (6.4%). En los machos, se presentaron altas prevalencias de cuerpos de inclusión (42%) y células

café (41.5%), seguidas de la infiltración hemocítica (28.7%) y granulocitomas (17%). En la playa San Lucas, las hembras únicamente presentaron bajas prevalencias de ovocitos atrésicos (14.5%) e infiltración hemocítica (10.7%), mientras que en los machos se presentó exclusivamente una baja prevalencia de infiltración hemocítica (10.2%). Las prevalencias totales por sexo, etapas de desarrollo gonadal y estación del año se muestran en la Tabla 4. En las hembras, la prevalencia fue alta en comparación con los machos, en ambos sitios. En Santa Rosalía la mayor prevalencia ocurre en la etapa de madurez (76.9%); por el contrario, en San Lucas, la mayor prevalencia ocurre en la fase de posdesove (43.2%). Por otro lado, en Santa Rosalía la prevalencia fue mayor en la primavera (83.7%), disminuyendo de forma concomitante durante las siguientes temporadas, hasta un mínimo en invierno (58.8%). En contraste, en la playa de San Lucas, la prevalencia fue más baja en primavera (3.2%) y más alta en otoño e invierno (18.4 y 17.8%, respectivamente).

**Tabla 3.** Prevalencia (%) de las alteraciones histopatológicas de la gónada (ovario y testículo) de *Megapitaria squalida* de cada sitio de estudio.

<b>Alteraciones histopatológicas</b>	<b>Santa Rosalía</b>	<b>San Lucas</b>
<b>Ovario</b>		
Ovocitos atrésicos	58.2	14.5
Células café	70.3	0
Vacuolización	32.4	0
Pedúnculo filamentosos	10.1	0
Granulocitoma	6.4	0
Infiltración hemocítica	35.1	10.7
Ovocitos hipertrofiados	14.3	0
Pérdida de la cromatina nuclear	18.1	0
Cuerpo de inclusión	22.5	0
Picnosis	16.5	0
<b>Testículo</b>		

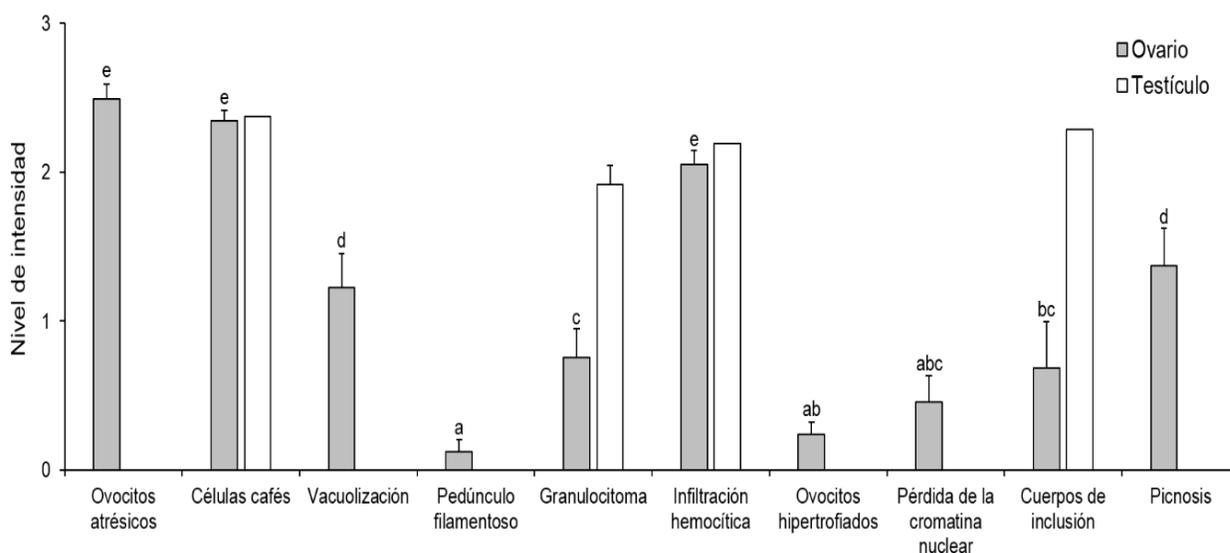
Células cafés	41.5	0
Granulocitomas	17.0	0
Infiltración hemocítica	28.7	10.2
Cuerpos de inclusión	42.0	0

**Tabla 4.** Prevalencia total de las alteraciones histopatológicas por sexo, etapa de desarrollo gonadal y estación por sitio de estudio.

	PREVALENCIA (%)	
	Santa Rosalía	San Lucas
<b>Sexo</b>		
Hembras	74.7	15.7
Machos	68.6	12.5
<b>Fase de madurez gonádica</b>		
Reposo	24.3	0
Desarrollo	56	0
Madurez	76.9	5.7
Desove	53.4	17.8
Posdesove	35	43.2
<b>Estación del año</b>		
Primavera	83.7	3.2
Verano	77.2	9.1
Otoño	76.3	18.4
Invierno	58.8	17.8

### **Índice de Alteración Histopatológica (IAH) y niveles de intensidad de las alteraciones histopatológicas**

El IAH fue significativamente mayor ( $X^2_1 = 407.74$ ;  $P = 0.000$ ) en las almejas de Santa Rosalía ( $72.18 \pm 6.12$ ) con respecto a los de la playa San Lucas ( $4.60 \pm 1.07$ ). Los niveles de intensidad de cada alteración histopatológica en el ovario de *M. squalida* del puerto de Santa Rosalía se muestran en la Figura 4. Se observaron diferencias significativas entre los niveles de intensidad ( $X^2_9 = 104.19$ ;  $P = 0.0000$ ) de cada alteración histopatológica. Las patologías con mayor intensidad fueron los ovocitos atrésicos ( $2.48 \pm 0.10$ ), seguidos de las células cafés ( $2.34 \pm 0.07$ ) y la infiltración hemocítica ( $2.05 \pm 0.09$ ). La picnosis ( $1.37 \pm 0.25$ ) y las vacuolas citoplasmáticas ( $1.22 \pm 0.23$ ) presentaron valores de intensidad medios; mientras que los granulocitomas ( $0.75 \pm 0.19$ ), los cuerpos de inclusión ( $0.68 \pm 0.31$ ), los ovocitos hipertrofiados ( $0.24 \pm 0.08$ ), la pérdida de la cromatina nuclear ( $0.45 \pm 0.18$ ) y el pedúnculo filamentosos fueron las patologías con las intensidades más bajas ( $0.12 \pm 0.08$ ). En el testículo, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de intensidad de las alteraciones ( $X^2_3 = 6.6764$ ,  $P = 0.0830$ ). Sin embargo, todas las intensidades ocurrieron en niveles altos, entre 1.91 y 2.37.



**Figura 4.** Niveles de intensidad de cada alteración histopatológica en el ovario y testículo de *Megapitaria squalida* del puerto de Santa Rosalía. Las medias con diferente letra son significativamente diferentes. Las barras indican el error estándar.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, la alta prevalencia e intensidad de alteraciones histopatológicas en la gónada de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía, así como la ausencia de la mayoría de ellas en las almejas de la playa San Lucas, sugieren que el daño tisular podría estar correlacionado con las altas concentraciones de metales pesados reportados previamente en los sedimentos de este sitio. Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz (2013) reportaron que las concentraciones de metales como el Cu, Pb, Mn, Co y Zn de Santa Rosalía, son hasta 10,000 veces más altas que en playa San Lucas (sitio de referencia a 13 km de distancia) y otras zonas costeras paralelas dentro del Golfo de California. Asimismo, dichas concentraciones de metales pesados sobrepasan significativamente los valores de referencia de la corteza terrestre y las guías de calidad ecotoxicológica, sugiriendo una alta posibilidad de peligro toxicológico para la biota marina (Shumilin *et al.*, 2000; Shumilin *et al.*, 2013). En el área de Santa Rosalía, las concentraciones de Cu y Fe solo se han reportado en pocos organismos, pero invariablemente en altas concentraciones. En este sentido, el análisis histoquímico en el presente estudio reveló una mayor acumulación de gránulos de Cu y Fe (área de cobertura siete veces mayor) en almejas de Santa Rosalía vs. San Lucas. Este hallazgo concuerda con el reporte de niveles de metales para *M. squalida* en dos sitios en Santa Rosalía con diferente grado de contaminación; en nuestro sitio de recolección, el Cu fue de  $14.6 \pm 1.8 \text{ mg kg}^{-1}$  en contraste con  $9.5 \pm 0.9 \text{ mg kg}^{-1}$  en un sitio menos contaminado, que podría ser similar a la playa de San Lucas (Roldán-Wong *et al.*, 2017). De hecho, los mejillones *Modiolus capax* y *Mytilus edulis* de Santa Rosalía contienen concentraciones más altas de Cu (11 veces) y Fe (casi el doble) en comparación con los mejillones de otras áreas (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009; Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz, 2013).

Aunque el cobre y el hierro son elementos importantes en la composición celular de los tejidos y son cofactores esenciales para numerosas enzimas, ambos pueden ser tóxicos en niveles superiores a los requeridos para la función metabólica normal (Soto *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 2011). Específicamente, el hierro a altos niveles causa lesiones oxidativas y anomalías en el metabolismo del hierro, cuyos efectos pueden extenderse a diversas actividades biológicas, como el crecimiento, la

morfología (anomalías tisulares), el comportamiento y la reproducción (González *et al.*, 2010; Chandia *et al.*, 2012), y la toxicidad puede ser aparente a través de manifestaciones degenerativas del tejido (Chandia *et al.*, 2012). Sin embargo, las alteraciones celulares observadas en las almejas expuestas pueden no ser todas específicas debido a los altos niveles de cobre y hierro. Algunos de estos cambios podrían deberse a los altos niveles de otros metales pesados previamente reportados como valores anormalmente altos en los sedimentos de Santa Rosalía, que no fueron analizados en este estudio.

Las alteraciones histopatológicas observadas en *M. squalida* de Santa Rosalía se agrupan en respuestas inflamatorias (infiltración hemocítica, granulocitomas, células cafés), procesos degenerativos y progresivos (ovocitos atrésicos, vacuolización, hipertrofia, pedúnculo filamentosos, picnosis), muerte de células y tejidos (pérdida de cromatina nuclear) y respuesta a agentes infecciosos (cuerpos de inclusión). Según el IAH ( $72.18 \pm 6.12$ ), estas alteraciones representan lesiones graves que resultan en una función alterada del tejido gonadal (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994). Por el contrario, los valores de IAH en almejas de la playa San Lucas ( $4.60 \pm 1.07$ ) indican que la gónada no muestra evidencia de daño grave, y por lo tanto muestra una función de gónada normal.

Dentro de las respuestas inflamatorias, la más prevalente y con mayor intensidad fue la presencia de células cafés, seguido de la infiltración hemocítica y la formación de granulocitomas. Las células cafés juegan un papel importante en el metabolismo de iones metálicos y su acción constituye la primera línea de defensa para su degradación y desintoxicación (Zaroogian & Yevich, 1994). Su presencia es considerada como un importante indicador de estrés causado por la contaminación por metales pesados, tal como ha sido reportado para *Crassostrea angulata* (Rodríguez de la Rúa *et al.*, 2005; Vaschenko *et al.*, 2013) y *C. virginica* (Guzmán *et al.*, 2007). Asimismo, la infiltración hemocítica y la formación de granulocitomas, aunque se relacionan con procesos homeostáticos (digestión, transporte de metabolitos, reparación celular y la actividad inmunológica de reconocimiento, encapsulación y fagocitosis) (Mayrand *et al.*, 2005), en algunos casos, se asocian al efecto de contaminantes (De Vico & Carella, 2012), tal como ha sido observado en *Mytilus edulis*

al ser expuesta crónicamente a metales pesados (Sheir *et al.*, 2013). En este sentido, la mayor prevalencia de infiltración hemocítica en las almejas de Santa Rosalía y la ausencia de granulocitomas y células cafés en las almejas de playa San Lucas, sugiere que estas respuestas inflamatorias en las almejas de Santa Rosalía se deben principalmente a la contaminación, mientras que la infiltración hemocítica en las almejas de la playa San Lucas a un proceso normal de limpieza, reabsorción de gametos residuales y reparación celular después del desove (etapa de posdesove).

Se encontraron también prevalencias altas de procesos degenerativos en la gónada de las almejas del puerto minero de Santa Rosalía en comparación a la baja prevalencia en las almejas de la playa San Lucas, especialmente de ovocitos atrésicos. Aunque la presencia de este tipo de ovocitos puede ser resultado de un déficit nutricional, anomalías de temperaturas, presencia de patógenos/parásitos y eventos reproductivos (Bayne, 1976), también ha sido relacionada a una respuesta típica a la contaminación ambiental de los moluscos bivalvos (Bacchetta & Mantecca, 2009; Sheir *et al.*, 2013). En este sentido, Lowe & Pipe (1986) reportaron alta prevalencia de atresia en *M. edulis* ocasionada por la acción directa de contaminantes, lo que provocó la desestabilización de los lisosomas y gránulos de vitelo que contienen enzimas lisosomáticas. Otra evidencia del efecto de la contaminación en la reproducción de *M. squalida* en Santa Rosalía es el hecho de que en la playa San Lucas, la mayor prevalencia (solo infiltración hemocítica y ovocitos atrésicos) ocurre en la etapa posdesove y en otoño e invierno, en concordancia con el período de descanso reproductivo normal, mientras que en Santa Rosalía, la mayor prevalencia ocurre en la fase de madurez (principalmente células cafés y ovocitos atrésicos) y en primavera. Por lo tanto, parece probable que la alta prevalencia e intensidad de ovocitos atrésicos en almejas de Santa Rosalía es una consecuencia de la exposición crónica a metales pesados, mientras que en las almejas de la playa San Lucas se asocia con un evento biológico normal, probablemente desove y posterior al desove. Esta idea se refuerza por el hecho de que se encontró también vacuolización citoplasmática y nuclear solo en las almejas del puerto de Santa Rosalía, la cual es el inicio de un proceso celular degenerativo o de autofagia. Esta alteración es comúnmente observada como respuestas celulares en animales acuáticos que están sujetos a toxicidad por

contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica (Giri *et al.*, 2000; Najle *et al.*, 2000; Carella *et al.*, 2015), tal como se observó en el anélido *Limnatis nilotica* (Khaled *et al.*, 2016), en el mejillón *Dreissena polymorpha* (Bacchetta & Mantecca, 2009), y en la lapa *Nacella concinna* (Najle *et al.*, 2000).

Adicional a la atresia, las almejas del puerto de Santa Rosalía presentaron otras alteraciones importantes en la estructura celular de los gametos femeninos. Se observaron ovocitos maduros con un pedúnculo anormal muy alargado que seguían adheridos a la pared folicular y ovocitos hipertróficos con un diámetro promedio cuatro veces más grande (150.5  $\mu\text{m}$ ) que los ovocitos posvitelogénicos de las almejas de playa San Lucas (35.9  $\mu\text{m}$ ) y los reportados previamente (entre 36  $\mu\text{m}$  y 45.2  $\mu\text{m}$ ) para *M. squalida* de otras zonas (Arellano-Martínez *et al.*, 2006). Ambas alteraciones indican un proceso patológico caracterizado por el crecimiento excesivo de la célula y un retraso en el proceso de maduración y son lesiones típicas de cambios progresivos (Carella *et al.*, 2015). Estos ovocitos hipertrofiados deben distinguirse como diferentes de la condición común observada en los bivalvos de la hipertrofia gametogénica viral causada por un virus del papiloma-polioma, condición en la que no se detectó reacción del huésped, como la infiltración hemocítica (Choi *et al.*, 2004). También se encontraron ovocitos con la cromatina nuclear condensada en una masa basófila, lo cual indica una inminente picnosis (Usheva *et al.*, 2006). Frecuentemente, la picnosis es inducida por contaminantes en diversos tejidos de moluscos, tal como se ha reportado en el caracol *Bellamya dissimilis* expuesto a pesticidas (Jonnalagadda & Rao, 1996) y en el bivalvo *Lamellidens marginalis* expuesto a arsénico (Chakraborty & Ray, 2009).

Los cuerpos de inclusión presentes en la gónada de *M. squalida*, se asemejan a colonias bacterianas reportadas para un gran número de especies de moluscos bivalvos (Paillard *et al.*, 2004). Aunque en la mayoría de los casos, estas infecciones no representan riesgos patológicos significativos, su interacción con agentes estresores (e.g. contaminantes) pueden resultar sinérgicamente perjudiciales para la población afectada (Morley, 2010), tal como se observó en *M. edulis* (Pipe & Coles, 1995) y *Crassostrea* spp. (Kim *et al.*, 1998) expuestos a metales pesados. En este estudio, los cuerpos de inclusión no parecen tener un daño evidente sobre la integridad

histológica de la gónada. Sin embargo, en el caso del testículo, algunas inclusiones desplazaron a los espermatozoides. Además, la respuesta inmune se hizo notar con la presencia de granulocitomas encapsulando algunos cuerpos de inclusión.

En conclusión, nuestros resultados evidencian el deteriorado estado de salud gonadal de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía y sugieren una correlación con la exposición crónica a la alta contaminación por metales pesados en ese sitio. La alta prevalencia e intensidad de las alteraciones histopatológicas en la gónada sugieren un fuerte efecto adverso en la gametogénesis, la calidad de los gametos y, por lo tanto, el potencial reproductivo de *M. squalida* de este sitio.

---

## CAPÍTULO 3

---

### 3. FALLAS REPRODUCTIVAS Y RESERVAS ENERGÉTICAS

Este capítulo será sometido bajo la siguiente referencia:

Yee-Duarte, J.A., Barber, B.J., Ceballos-Vázquez, B.P., Camacho-Mongradón, M.A., Shumilin, E., Kidd, K.A. and Arellano-Martínez, M. **REPRODUCTIVE FAILURES AND ENERGY RESERVES OF *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) UNDER CHRONIC METAL STRESS**

## RESUMEN

La reproducción de bivalvos marinos está regulada por varios factores ambientales naturales, pero la exposición a contaminantes químicos también puede interferir y puede tener efectos negativos en el éxito reproductivo. En el presente trabajo se estudian posibles alteraciones en el ciclo reproductivo, organización celular del ovario (área folicular, número de ovocitos) y desarrollo de ovocitos (diámetro de ovocitos) de hembras de *Megapitaria squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía, Golfo de California, México. Los resultados muestran que el ciclo reproductivo de las hembras de *M. squalida* de Santa Rosalía es interrumpido por un intenso periodo de reabsorción de ovocitos (58.2%), mientras que en San Lucas la actividad gametogénica y el desove son continuos. El diámetro total de los ovocitos fue significativamente menor (22.8  $\mu\text{m}$ ) en las almejas de Santa Rosalía que en las almejas de la playa de San Lucas (35.9  $\mu\text{m}$ ). No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las oogonias, pero los diámetros de ovocitos previtelógenos (19.8  $\mu\text{m}$ ), vitelogénicos (22.8  $\mu\text{m}$ ) y postvitelógenos (26.4  $\mu\text{m}$ ) fueron significativamente más bajos en los organismos de Santa Rosalía que en San Lucas (24.4, 32.1 y 35.9  $\mu\text{m}$ , respectivamente). El área folicular fue significativamente mayor, durante la gametogénesis temprana (proliferación de gametos), en las almejas de Santa Rosalía, sin embargo, durante la maduración y el desove fue menor. El número de ovocitos por folículo fue menor en las almejas de Santa Rosalía (13.8) en comparación con las almejas de San Lucas (25.5). Las reservas energéticas (carbohidratos, proteínas y lípidos) en los tejidos de *M. squalida* de Santa Rosalía, son consistentemente más bajas que en las almejas de San Lucas, lo que representa una menor cantidad de energía para llevar a cabo óptimamente su reproducción. *M. squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía, presenta una condición de salud reproductiva deteriorada, evidenciada por la alteración en su ciclo reproductivo y el poco desarrollo de los ovocitos, lo que consecuentemente da lugar a un efecto negativo en el potencial reproductivo.

**Palabras clave:** ciclo reproductivo, composición bioquímica, reservas energéticas, contaminación por metales pesados.

## INTRODUCCIÓN

Los bivalvos marinos que están expuestos crónicamente a altas concentraciones de metales pesados pueden presentar niveles de estrés relacionados con alteraciones en funciones fisiológicas como la respiración, digestión, crecimiento y reproducción (Vaschenko *et al.*, 2013). Particularmente, el deterioro de la reproducción es una de las consecuencias más devastadoras de la contaminación ambiental, ya que puede conducir a cambios negativos a nivel poblacional y en la comunidad (Weng & Wang, 2015). La reproducción en bivalvos es un proceso que demanda una gran cantidad de energía y está fuertemente ligado a ciclos de almacenamiento y uso de reservas energéticas (glucógeno, lípidos y proteínas) (Bayne, 1976; Barber & Blake, 1991). Ambas actividades metabólicas están reguladas por factores ambientales naturales como la temperatura y la disponibilidad de alimento; sin embargo, la exposición a contaminantes puede interferir y con frecuencia dar lugar al agotamiento de las reservas energéticas como resultado del alto costo de la homeóstasis (activación de mecanismos de defensa y/o reparación) y del gasto energético del proceso de desintoxicación, lo que podría conducir a una reducción de la energía destinada para la reproducción y a su consecuente deterioro (Voets *et al.*, 2006; Giarratano *et al.*, 2010). Lo anterior trae como consecuencia, gónadas indiferenciadas (Vaschenko *et al.*, 2013), retraso en la gametogénesis y la madurez sexual (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Siah *et al.*, 2003), baja producción de gametos, frecuencias de desove bajas y de corta duración (Mouneyrac *et al.*, 2008; Tlili *et al.*, 2011), atresia de ovocitos y disminución en el éxito de fertilización (Vaschenko *et al.*, 1997; Baussant *et al.*, 2011), bajas concentraciones de proteínas, deficiente movilidad de lípidos y disminución de glucógeno esenciales para la reproducción (Leavitt *et al.*, 1990; Ketata *et al.*, 2007; Tlili *et al.*, 2011).

El puerto minero de Santa Rosalía, en el Golfo de California, México es una zona que presenta altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos en los sedimentos marinos provenientes de la antigua minería y en el que se han reportado valores anormales de Cu (3,390 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (1,916 mg kg<sup>-1</sup>), Co (166 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (6,770 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (226 mg kg<sup>-1</sup>), y U (11.8 mg kg<sup>-1</sup>) (Shumilin *et al.*, 2013), los cuales son hasta unos órdenes de magnitud más altos que en diversas áreas costeras

paralelas dentro del Golfo de California (Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz, 2013) y exceden significativamente los valores de referencia para la corteza terrestre y las guías de calidad ecotoxicológica, lo que sugiere una alta posibilidad de riesgo toxicológico para la biota marina. En consecuencia, se ha reportado que en esa zona los mejillones *Modiolus capax* (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999; Muñoz-Barbosa & Huerta-Díaz, 2013) y *Mytilus edulis* (Cadena-Cárdenas *et al.*, 2009) presentan concentraciones de Cu hasta 11 veces más altas que los de otras áreas de la península de Baja California.

A pesar de la evidencia clara de contaminación y de riesgo toxicológico potencial, se sabe poco sobre los efectos en la biota marina de Santa Rosalía. Un trabajo reciente reveló que la almeja chocolate *Megapitaria squalida* muestra una condición de salud deteriorada, un crecimiento deficiente (Yee-Duarte *et al.*, 2017a), y una alta incidencia de parásitos (Yee-Duarte *et al.*, 2017b), lo que sugiere una desviación fisiológica. Bajo este contexto, y considerando la importancia de analizar el estado reproductivo y uso de las reservas energéticas de bivalvos en zonas contaminadas, el objetivo del presente estudio fue examinar los efectos potenciales de la exposición a largo plazo a la contaminación por metales pesados (evaluados en tejidos y sedimento) sobre algunas respuestas reproductivas y bioquímicas de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía en comparación con San Lucas, un área cercana sin actividades mineras la cual se tomó como sitio de referencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Áreas de estudio***

El presente estudio se realizó en el puerto minero de Santa Rosalía (27°20' N; 112°16' W), localizado dentro del Golfo de California, en la costa centro-oriental de la Península de Baja California, México. Este puerto tiene más de un siglo de antigüedad y fue construido para llevar a cabo labores de explotación y fundición de cobre en 1885 (Wilson & Rocha, 1955). En 1985, las actividades mineras cerraron dejando aproximadamente 370 millones de toneladas de desechos sólidos (escorias) que fueron depositados en tierra, en la zona costera y el mar adyacente (Shumilin *et al.*, 2011), lo que generó la contaminación en la dársena (hot spot) y zonas adyacentes

(Shumilin *et al.*, 2013). Después del cese de la actividad minera, las principales actividades antropogénicas en la zona costera se han centrado en la pesca y en el transporte turístico y recreativo; sin embargo, a partir de 2014, la mina comenzó nuevamente a operar. El clima es árido, con temperaturas promedio de 23.4°C y una máxima de 44°C durante el verano. Las lluvias son escasas y variables, se presentan comúnmente en agosto y septiembre (temporada de huracanes), generando caudales de agua dulce en los arroyos que son descargados en la zona costera donde se ubica el puerto (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003).

La playa de San Lucas (27°13' N; 112°16' W), se localiza a 13 km al sur del puerto de Santa Rosalía. Es una pequeña localidad costera con 606 residentes que se dedican principalmente a la pesca. En esta zona, no se llevan a cabo actividades antropogénicas de gran escala, por lo que se tomó a este sitio como referencia.

### ***Parámetros ambientales***

Debido a que la reproducción es regulada principalmente por la temperatura y el alimento disponible y con la finalidad de descartar el efecto de estas variables, se establecieron las características generales de estos parámetros en cada zona, a partir de imágenes satelitales del sensor MODIS Aqua con resolución de 1 km (NOAA Coastal Zone Color Scanner). Con ello se obtuvieron promedios mensuales de temperatura superficial del mar (°C) y de concentración de clorofila *a* (mg m<sup>-3</sup>) como indicador de la cantidad de alimento disponible para los organismos filtradores, durante el periodo del 2011 al 2013.

### ***Muestreo***

Las almejas fueron recolectadas mensualmente de mayo de 2012 a abril de 2013 en un sitio adyacente al “hot spot” del puerto minero de Santa Rosalía y de San Lucas. De cada sitio, fueron recolectados un promedio de 30 ejemplares de *M. squalida* a profundidades de entre 5 y 10 m, por medio de buceo semiautónomo tipo “hooka”. De cada organismo, se registró la longitud total de la concha (distancia máxima antero-posterior) ( $\pm 0.1$  mm) y se obtuvo una porción de gónada que fue fijada en formaldehído al 10% para su posterior procesamiento histológico. Adicionalmente,

de 10 almejas cada mes se obtuvieron porciones de gónada, glándula digestiva, branquias, músculo aductor y manto las cuales fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis bioquímico.

### **Análisis de metales**

De cada sitio, se recolectaron en el mismo punto de muestreo dos muestras de sedimento superficial, el cual fue lavado con agua desionizada y puesto a secar en una estufa. Adicionalmente, se recolectaron 15 almejas (6–7 cm de longitud de la concha), los cuales se preservaron congelados para llevar a cabo análisis posteriores de identificación y cuantificación de metales.

En el laboratorio, los especímenes fueron disecados y se registraron los pesos individuales ( $\pm 1$  mg) de la gónada, las branquias, la glándula digestiva, el músculo aductor y el manto. Los tejidos se colocaron, por separado, en un horno de secado durante 48 horas a  $50^{\circ}\text{C}$  y se registró el peso seco ( $\pm 1$  mg) de cada uno. Los tejidos secos de las 15 almejas, de cada sitio ( $n = 1/\text{sitio/tejido}$ ), se mezclaron por tipo de tejido, se pulverizaron y se homogenizaron en un mortero de ágata.

Posteriormente, las muestras de cada tejido fueron digeridas en una mezcla de ácidos concentrados ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HF}$ ) a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, antes de que las concentraciones de cada metal fueran determinadas por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente de alta resolución (HR-ICP-MS siglas en inglés) (Thermo Finnigan Element 2 de alta resolución). Los límites de detección del método fueron  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para Co,  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  para Cu,  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para Mn y Pb,  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  para U y  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  para Zn. Se utilizó material de referencia estándar certificado (SRM 1575a, NIST, EE.UU.) y un blanco para garantizar la precisión y evitar interferencias. El porcentaje de recuperación en el análisis de SRM 1575a fue de 101% para Co y Cu, 94% para Mn, 84% para Pb y 100% para Zn. La precisión de los análisis de metales fue superior al 10%. Todo el material de laboratorio se lavó en ácido nítrico al 15% durante 24 horas y se enjuagó repetidamente en agua desionizada antes de su uso, para minimizar la contaminación de los resultados. Solo se analizaron los metales previamente reportados en concentraciones anormalmente altas en los sedimentos del puerto minero de Santa Rosalía (Shumilin *et al.*, 2013).

Por su parte, las muestras de sedimentos se procesaron y analizaron para los mismos metales (Co, Cu, Mn, Pb, U y Zn) de acuerdo a lo descrito por Shumilin *et al.* (2013).

### ***Análisis histológico***

Las porciones de las gónadas fijadas en formol fueron deshidratadas a través de una secuencia de alcoholes de concentraciones crecientes, aclaradas con Hemo-De®, y embebidas en Paraplast-Xtra®. Se obtuvieron secciones de 5 µm, utilizando un micrótopo de rotación, y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) (Humason, 1979). La estructura celular de las gónadas fue examinada bajo el microscopio de luz para determinar el sexo y la fase de desarrollo gonádico. Las fases de desarrollo se determinaron utilizando la escala descrita por Arellano-Martínez *et al.* (2006) para esta especie (reposo, desarrollo, madurez, desove, y posdesove).

### ***Ciclo reproductivo, análisis de ovocitos y tejido gonádico***

Para evidenciar deterioro reproductivo en las almejas del sitio contaminado, distintas características reproductivas fueron analizadas de manera comparativa con las almejas del sitio de referencia. El ciclo reproductivo fue evaluado como una medida de la continuidad temporal de la reproducción y se comparó el porcentaje de organismos maduros y en desove. Como una medida cuantitativa de salud y viabilidad de los gametos, se analizó el diámetro total promedio de los ovocitos, el diámetro por tipo de ovocito y el área folicular. Además, como una medida de fecundidad se determinó el número de ovocitos por folículo.

Para describir el ciclo reproductivo, se calcularon las frecuencias relativas mensuales de las fases de desarrollo gonádico a lo largo del periodo de estudio en cada sitio.

Para el análisis del diámetro total de los ovocitos, se utilizaron cortes histológicos de cinco hembras, elegidas al azar, por sitio de muestreo para cada mes en fases de desarrollo, madurez y desove, los cuales fueron digitalizados y analizados con el programa SIGMA SCAN PRO (V. 5.0, Systat Software, Inc.). De cada hembra seleccionada, se midieron los diámetros de todos los ovocitos encontrados dentro de

10 folículos y se calculó el promedio total. Los ovarios en fase de posdesove no se consideraron debido a que los ovocitos se encuentran en proceso de fagocitosis y se pierde la integridad del tejido gonádico.

Adicionalmente, en los organismos de cada zona, se calculó el diámetro promedio por tipo de ovocito, de acuerdo a la clasificación propuesta por Camacho-Mondragón *et al.* (2012) basada en el grado de desarrollo gamético: ovogonias, ovocitos previtelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos postvitelogénicos. Asimismo, se calcularon el área folicular promedio y el número promedio de ovocitos dentro de hembras en fase de desarrollo y madurez. No se incluyeron las fases de desove y posdesove debido a que las paredes de los folículos se colapsan y se afecta la integridad de los gametos.

### ***Análisis bioquímico y de reservas energéticas***

De los tejidos previamente almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se liofilizaron y se tomaron submuestras de 0.1 g y fueron homogenizadas con 1 mL de solución salina fría ( $\text{NaCl}$   $35\text{ g kg}^{-1}$ ) para obtener un extracto crudo que fue utilizado para todos los análisis bioquímicos los cuales se cuantificaron con un lector de microplaca (Thermo Scientific Multiskan Go).

Las proteínas totales se determinaron mediante el método BCA (Smith *et al.* 1985), utilizando un reactivo de ácido bicinonínico comercial (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit) y suero de albúmina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como solución estándar. A  $10\ \mu\text{L}$  de la muestra homogenizada se le agregaron  $200\ \mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$   $0.1\ \text{N}$  para digerir durante 2 horas. Se tomaron  $10\ \mu\text{L}$  de esa muestra digerida y se les adicionó  $200\ \mu\text{L}$  de reactivo de BCA y se dejó reaccionar por 15 minutos en un horno a  $60^{\circ}\text{C}$ . La absorbancia se leyó a  $562\ \text{nm}$  de longitud de onda.

Los carbohidratos totales se determinaron por el método de antrona (Roe, 1955) y se utilizó una solución detroxa como estándar. Se tomaron  $100\ \mu\text{L}$  de extracto crudo al cual se le agregaron  $100\ \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20% (para la eliminación de proteínas). Esta mezcla se centrifugó a  $4000\ \text{rpm}$  a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Del sobrenadante obtenido se tomaron  $100\ \mu\text{L}$  y se les agregó  $1\ \text{mL}$  de solución de antrona

(0.1% disuelta en ácido sulfúrico concentrado), se incubó a 90°C durante 4 minutos y se detuvo la reacción en un baño frío a 4°C, posteriormente se leyó la absorbancia a 630 nm.

Los lípidos totales se determinaron por el método de la sulfofosfovainilina (Barnes & Blackstock, 1973) usando una solución comercial reactiva como estándar (Merck™). A 25 µL del extracto crudo se le añadió 250 µL de ácido sulfúrico concentrado y se incubó la solución a 90°C durante 10 minutos e inmediatamente se enfrió a 4°C en un baño de hielo. Posteriormente, se mezclaron en una microplaca 20 µL de ese extracto crudo con 200 µL de solución de sulfofosfovainilina en una microplaca, se incubó durante 40 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm con un lector de microplaca (Biorad 550, Tokio, Japón).

Todas las técnicas bioquímicas fueron normalizadas previamente para cada tejido. Los resultados de cada componente bioquímico se expresaron en mg g<sup>-1</sup> de peso seco de cada tejido y fueron analizados por estación del año.

La cantidad de energía para cada componente bioquímico en cada tejido se estimó utilizando los factores de conversión de energía propuestos por Brody (1945): proteínas = 20.1 kJ g<sup>-1</sup>, carbohidratos = 17.2 kJ g<sup>-1</sup>, lípidos = 35.3 kJ g<sup>-1</sup>. Se calculó la cantidad de energía de cada componente bioquímico como la sumatoria de la energía aportada por cada tejido con la siguiente fórmula:  $\Delta = \sum \Delta t_1 + \Delta t_2 + \Delta t_3 \dots \Delta t_n$ ; donde  $\Delta$  = energía total del componente bioquímico,  $\Delta t_1$  = energía del tejido 1;  $\Delta t_2$  = energía del tejido 2, etc. También se calculó la energía total de todos los componentes bioquímicos con la siguiente fórmula:  $\Delta t = \sum \Delta c_1 + \Delta c_2 + \Delta c_3$ ; donde  $\Delta t$  = energía total de todos los componentes bioquímicos,  $\Delta c_1$  = energía de carbohidratos,  $\Delta c_2$  = energía de proteínas y  $\Delta c_3$  = energía de lípidos.

### **Análisis estadístico**

Para detectar diferencias significativas entre las zonas de estudio con respecto a la temperatura y la clorofila a, así como los diámetros total y de cada tipo de ovocito, el área folicular del ovario, el número de ovocitos por folículo y la concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos de los tejidos de *M. squalida*, así como para la cantidad de energía aportada por cada componente bioquímico, se aplicaron

ANDEVA's de una vía, seguidos de pruebas *a posteriori* de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA para Windows (versión 6.0, StatSoft). Se estableció un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 para todas las pruebas (Zar, 1996).

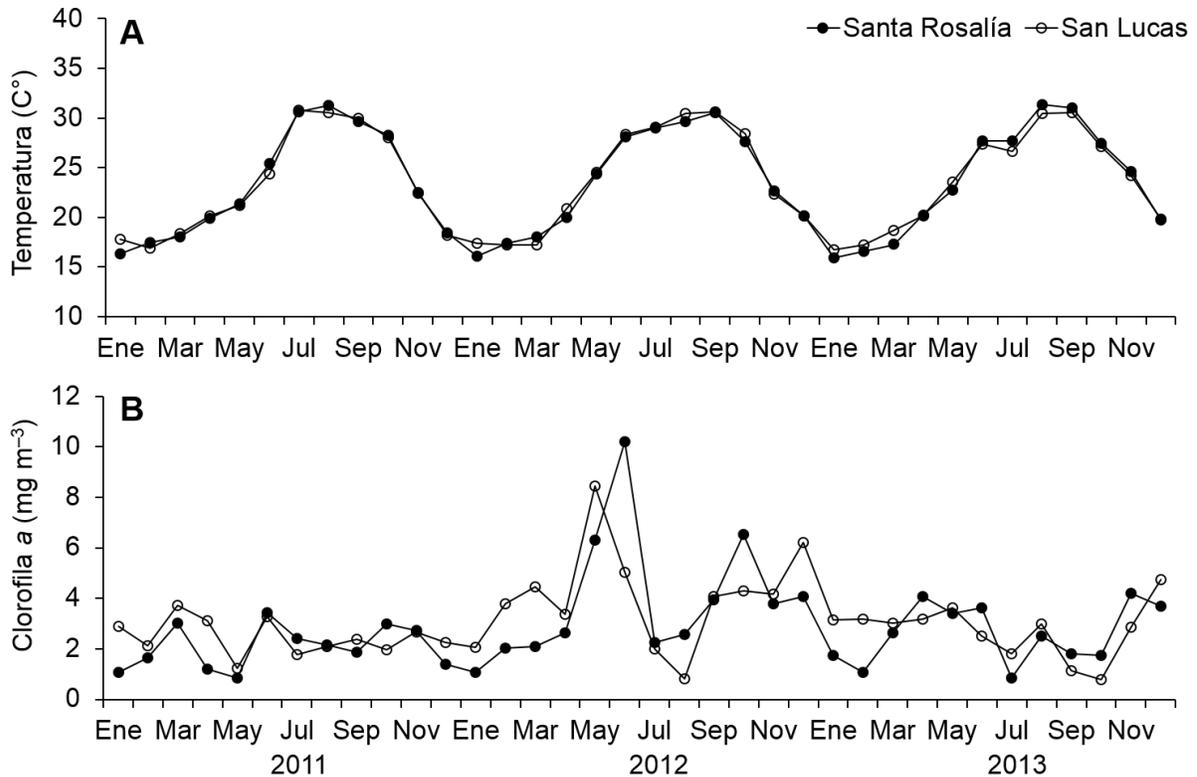
## RESULTADOS

### ***Caracterización ambiental***

#### *Temperatura superficial del mar y concentración de clorofila a*

La temperatura superficial del mar ( $^{\circ}\text{C}$ ) presentó un patrón estacional y no se observaron diferencias significativas ( $F_{(1, 70)} = 0.00352$ ;  $P = 0.952$ ) entre los valores promedio de ambas zonas de estudio (Santa Rosalía:  $23.4 \pm 0.88$ ; San Lucas:  $23.5 \pm 0.84$ ) (Fig. 1A). Los meses fríos (diciembre a abril) tuvieron temperaturas por debajo de los  $21^{\circ}\text{C}$ . Las temperaturas más bajas se registraron consistentemente en enero ( $15.9\text{--}16.3^{\circ}\text{C}$ ). Los meses más cálidos (agosto y septiembre) presentaron temperaturas por encima de los  $28^{\circ}\text{C}$ . La temperatura del mar alcanzó sus valores máximos ( $29.6\text{--}31.3^{\circ}\text{C}$ ) en agosto.

Las concentraciones de clorofila *a* ( $\text{mg m}^{-3}$ ) no presentaron un patrón estacional y no se observaron diferencias significativas ( $F_{(1, 70)} = 0.28357$ ;  $P = 0.5960$ ) entre los valores promedio de ambas zonas de estudio (Santa Rosalía:  $2.87 \pm 0.30$ ; San Lucas:  $3.08 \pm 0.25$ ) (Fig. 1B). Los valores más bajos en Santa Rosalía fueron entre  $0.84$  y  $1.87 \text{ mg m}^{-3}$ , los valores intermedios entre  $2.03$  y  $4.18 \text{ mg m}^{-3}$  y los valores más altos entre  $6.30$  y  $10.21 \text{ mg m}^{-3}$ . En San Lucas, los valores más bajos fueron entre  $0.78$  y  $1.95 \text{ mg m}^{-3}$ , valores intermedios entre  $2.00$  y  $4.73 \text{ mg m}^{-3}$  y los valores más altos entre  $5.04$  y  $8.49 \text{ mg m}^{-3}$ .



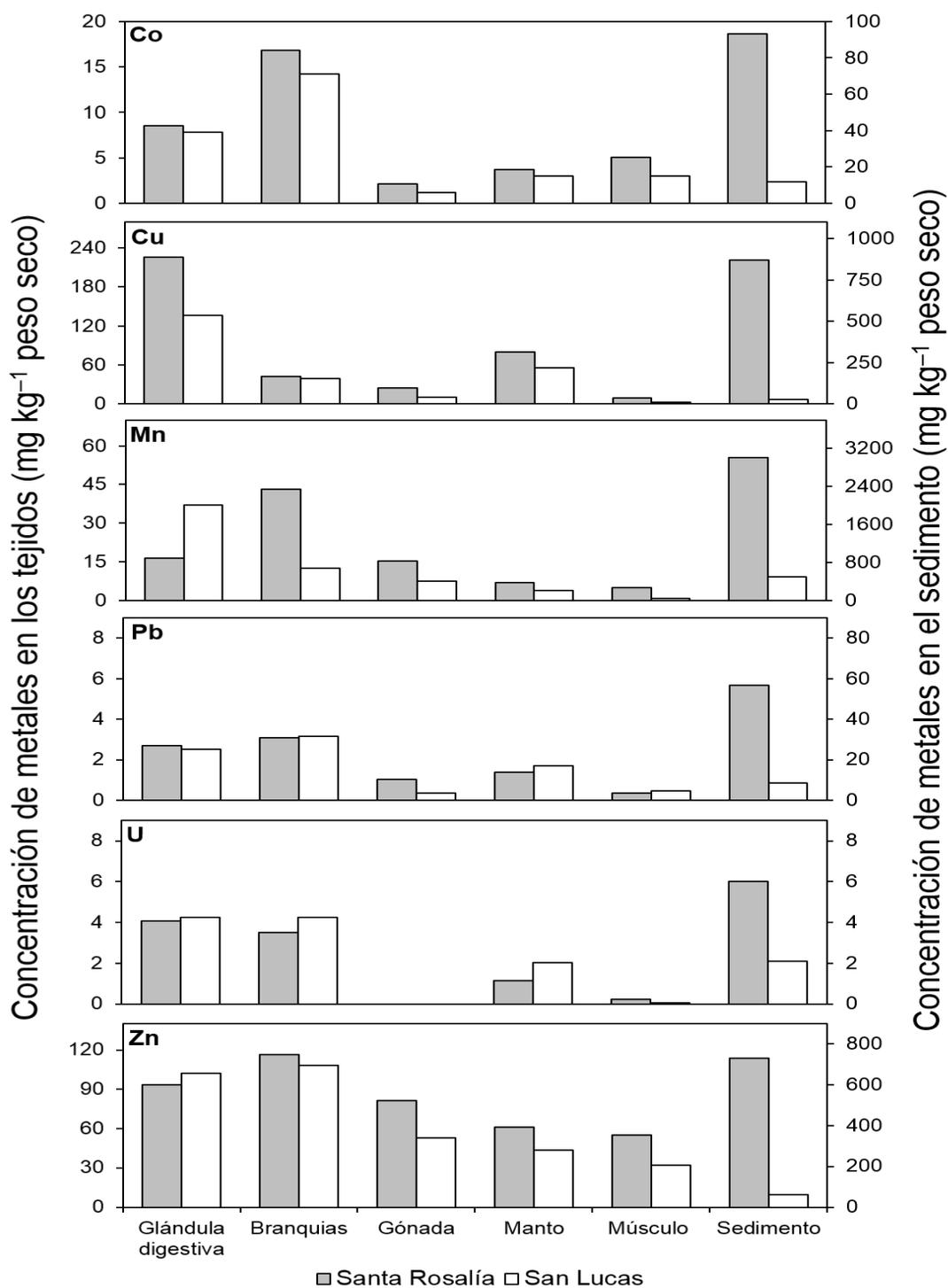
**Figura 1.** Temperatura superficial del mar (A) y concentración de clorofila a (B) por sitio de muestreo.

#### *Concentración de metales en el sedimento y en los tejidos de Megapitaria squalida*

Las concentraciones de todos los metales analizados en los sedimentos fueron consistentemente más altas en Santa Rosalía (entre 65% y 97%) que en San Lucas (Fig. 2). El manganeso, cobre y zinc fueron los de mayor concentración, mientras que el cobalto, plomo y uranio se presentaron en concentraciones más bajas en ambos sitios. Las concentraciones de cobre, zinc y cobalto fueron 35.5, 11.8 y 7.8 veces, respectivamente, más altas en los sedimentos de Santa Rosalía respecto a las de San Lucas, mientras que las concentraciones de plomo, manganeso y uranio fueron 6.6, 6.2 y 3 veces más altas, respectivamente.

En los tejidos de las almejas, la glándula digestiva y las branquias contenían las concentraciones más altas en todos los metales, seguidas por el manto, la gónada y el músculo (Fig. 2). Particularmente, la gónada fue el único tejido donde las concentraciones de todos los metales analizados fueron mayores en Santa Rosalía,

excepto el uranio que no fue detectado en este tejido. El cobre es el que presentó las concentraciones más altas de entre todos los metales analizados y fue mayor en todos los tejidos de las almejas de Santa Rosalía que en los de San Lucas. Este metal se acumuló principalmente en la glándula digestiva y manto, donde las concentraciones fueron 40% y 31% más altas, respectivamente, en las almejas de Santa Rosalía que en las de San Lucas. Las almejas de Santa Rosalía también presentaron concentraciones más altas de zinc en casi todos los tejidos, excepto la glándula digestiva, donde la concentración de Zn fue 7% mayor en las almejas de San Lucas. Las mayores diferencias en la concentración de este metal fueron en la gónada, el músculo aductor y el manto (43%, 42% y 29%, respectivamente) siendo más altas en las almejas de Santa Rosalía que en las almejas de San Lucas. El manganeso también estuvo presente en concentraciones más altas en todos los tejidos (excepto la glándula digestiva) de Santa Rosalía que en los de San Lucas. Por ejemplo, el manganeso fue 70% más alto en el tejido branquial de almejas de Santa Rosalía que el de las de San Lucas. Para los otros metales (cobalto, plomo, uranio), las concentraciones en todos los tejidos fueron ligeramente superiores en los organismos de Santa Rosalía, con excepción del uranio, donde fue ligeramente superior en las branquias y el manto de los especímenes de San Lucas.



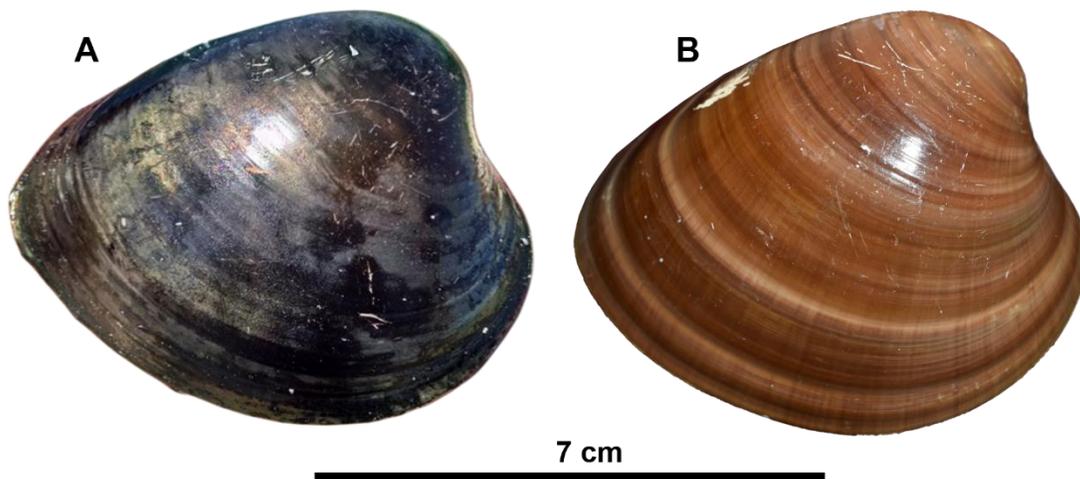
**Figura 2.** Variación de la concentración de metales en los sedimento y los tejidos de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo.

### **Almejas**

Se analizaron un total de 182 hembras en Santa Rosalía con un promedio de longitud de concha de  $6.9 \pm 0.05$  cm dentro de un intervalo de 3.2 a 8.4 cm. En San Lucas, se analizaron un total de 159 hembras con un promedio de longitud de concha de  $7.6 \pm 0.08$  cm en un intervalo de 5.5 a 12.5 cm.

#### *Apariencia externa de la concha*

El patrón de coloración externa de la concha de *M. squalida* fue notablemente distinto entre ambas zonas (Fig. 3). El 100% de las almejas de Santa Rosalía presentaron una coloración oscura con tonos metálicos brillantes y un perióstraco negro brillante (Fig. 3A). En las almejas de San Lucas se observó un patrón de coloración normal para la especie que varía de café a crema, con un perióstraco café claro y brillante (Fig. 3B).

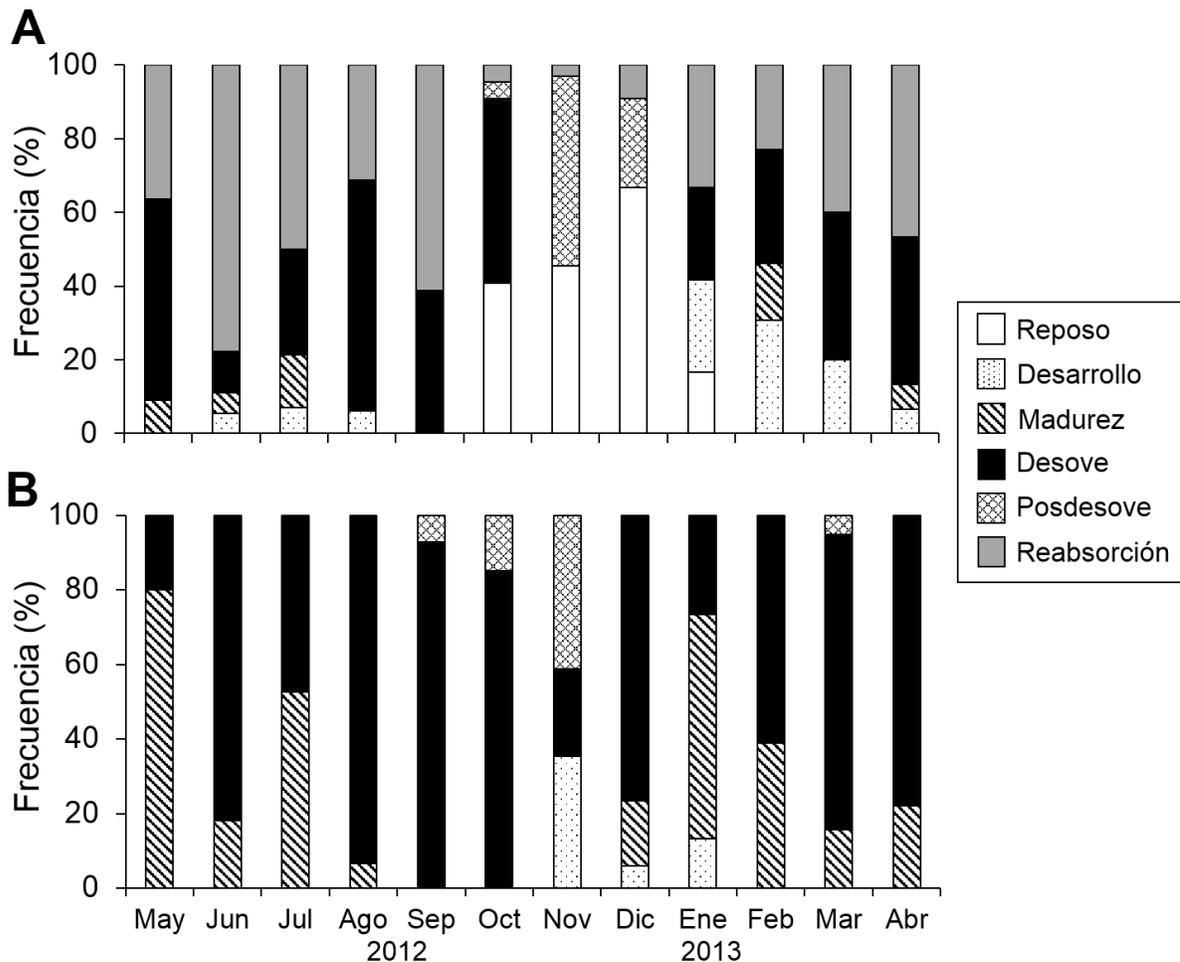


**Figura 3.** Apariencia externa de la concha de *Megapitaria squalida* de Santa Rosalía (A) y San Lucas (B).

## Evaluación reproductiva

### Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo presentó marcadas diferencias entre ambas zonas (Fig. 4). En las almejas de Santa Rosalía el ciclo presentó interrupciones, con una gran proporción de individuos en reabsorción de ovocitos en todos los meses (58.2%) y en fase de reposo de octubre a enero (22%) (Fig. 4A). Por su parte, en las almejas de San Lucas no hubo organismos en reposo ni en reabsorción gonádica, por lo que la reproducción fue continua con organismos en desove durante todo el periodo de estudio (Fig. 4B). El porcentaje de almejas en madurez (3%) y en desove (27%) fue menor en Santa Rosalía (25%), comparado con las almejas de San Lucas (65%).

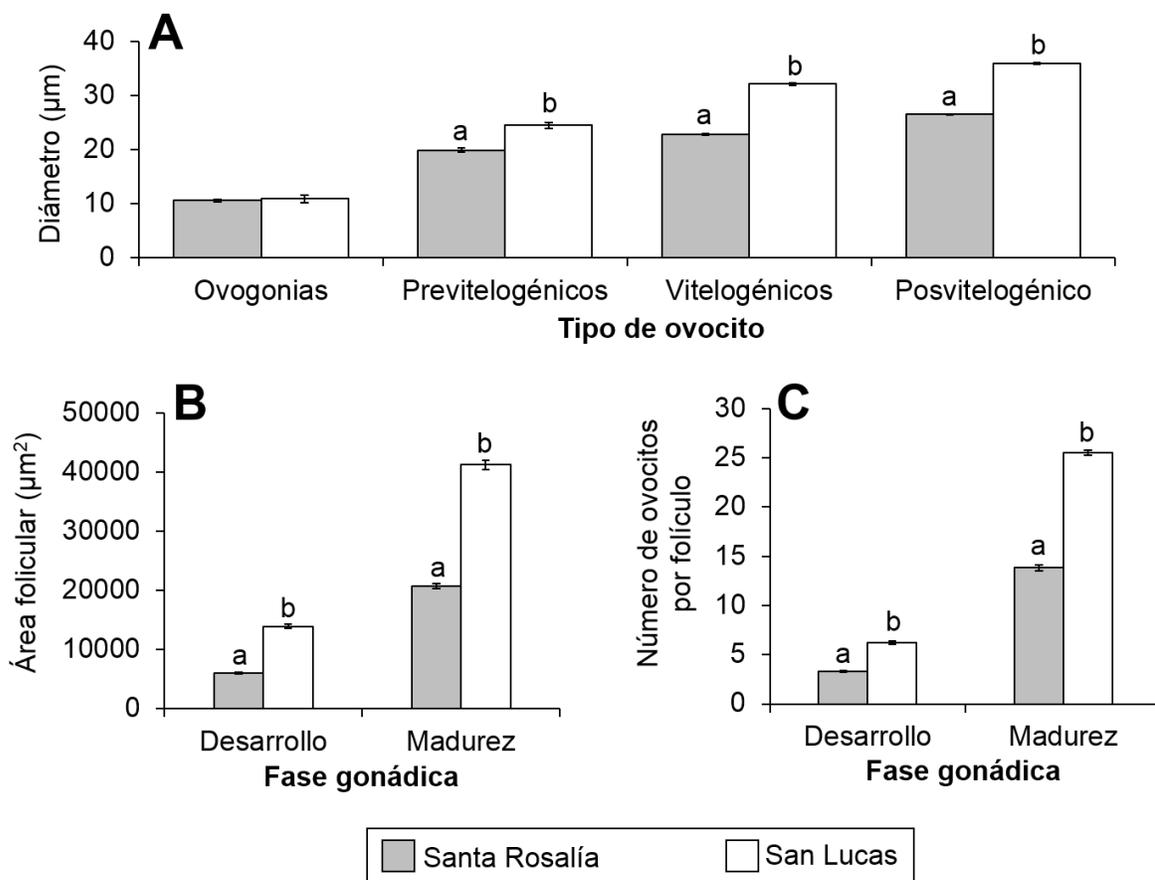


**Figura 4.** Ciclo reproductivo de hembras de *Megapitaria squalida* de Santa Rosalía (A) y San Lucas (B).

### *Análisis de ovocitos y tejido gonádico*

Las almejas de Santa Rosalía presentaron un diámetro total de los ovocitos significativamente menor ( $21.7 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ) que las almejas de San Lucas ( $32.2 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ) ( $F_{(1, 2744)} = 1225.5$ ;  $P = 0.0001$ ). Con respecto al diámetro por tipo de ovocito (Fig. 5A), las ovogonias no presentaron diferencias ( $F_{(1, 377)} = 0.3206$ ;  $P = 0.571$ ) entre las almejas de Santa Rosalía ( $10.56 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ) y las de San Lucas ( $10.87 \pm 0.66 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, a partir de las siguientes fases de desarrollo ovocitario, las células reproductoras presentaron diámetros significativamente menores en las almejas de Santa Rosalía (SR) con respecto a las almejas de San Lucas (SL): ovocitos previtelogénicos  $19.89 \pm 0.35 \mu\text{m}$  en SR y  $24.45 \pm 0.53 \mu\text{m}$  en SL ( $F_{(1, 340)} = 19.592$ ;  $P = 0.0001$ ), ovocitos vitelogénicos  $22.84 \pm 0.18 \mu\text{m}$  en SR y  $32.12 \pm 0.28 \mu\text{m}$  en SL ( $F_{(1, 626)} = 759.86$ ;  $P = 0.0001$ ) y ovocitos postvitelogénicos  $26.49 \pm 0.11 \mu\text{m}$  en SR y  $35.9 \pm 0.14 \mu\text{m}$  en SL ( $F_{(1, 1395)} = 2287.1$ ;  $P = 0.0001$ ).

El área folicular (Fig. 5B) durante las fases de desarrollo ( $6015 \pm 147.6 \mu\text{m}^2$ ) y madurez ( $20,727 \pm 405.08 \mu\text{m}^2$ ) fue significativamente menor ( $F_{(1, 200)} = 420.05$ ;  $P = 0.0000$  y  $F_{(1, 200)} = 565.92$ ;  $P = 0.0001$  respectivamente) en las almejas de Santa Rosalía respecto a las de San Lucas ( $13,942 \pm 357.5 \mu\text{m}^2$  y  $41,299 \pm 764.06 \mu\text{m}^2$  respectivamente). De la misma manera, en el número de ovocitos por folículo (Fig. 5C) fue significativamente menor en las almejas de Santa Rosalía, tanto en la fase de desarrollo ( $F_{(1, 200)} = 235.55$ ;  $P = 0.0000$ ) como en la fase de madurez ( $F_{(1, 200)} = 783.32$ ;  $P = 0.0001$ ) ( $3.3 \pm 0.09$  y  $13.8 \pm 0.31$  ovocitos por folículo, respectivamente) comparado con las almejas de San Lucas ( $6.2 \pm 0.16$  y  $25.5 \pm 0.27$  ovocitos por folículo, respectivamente).



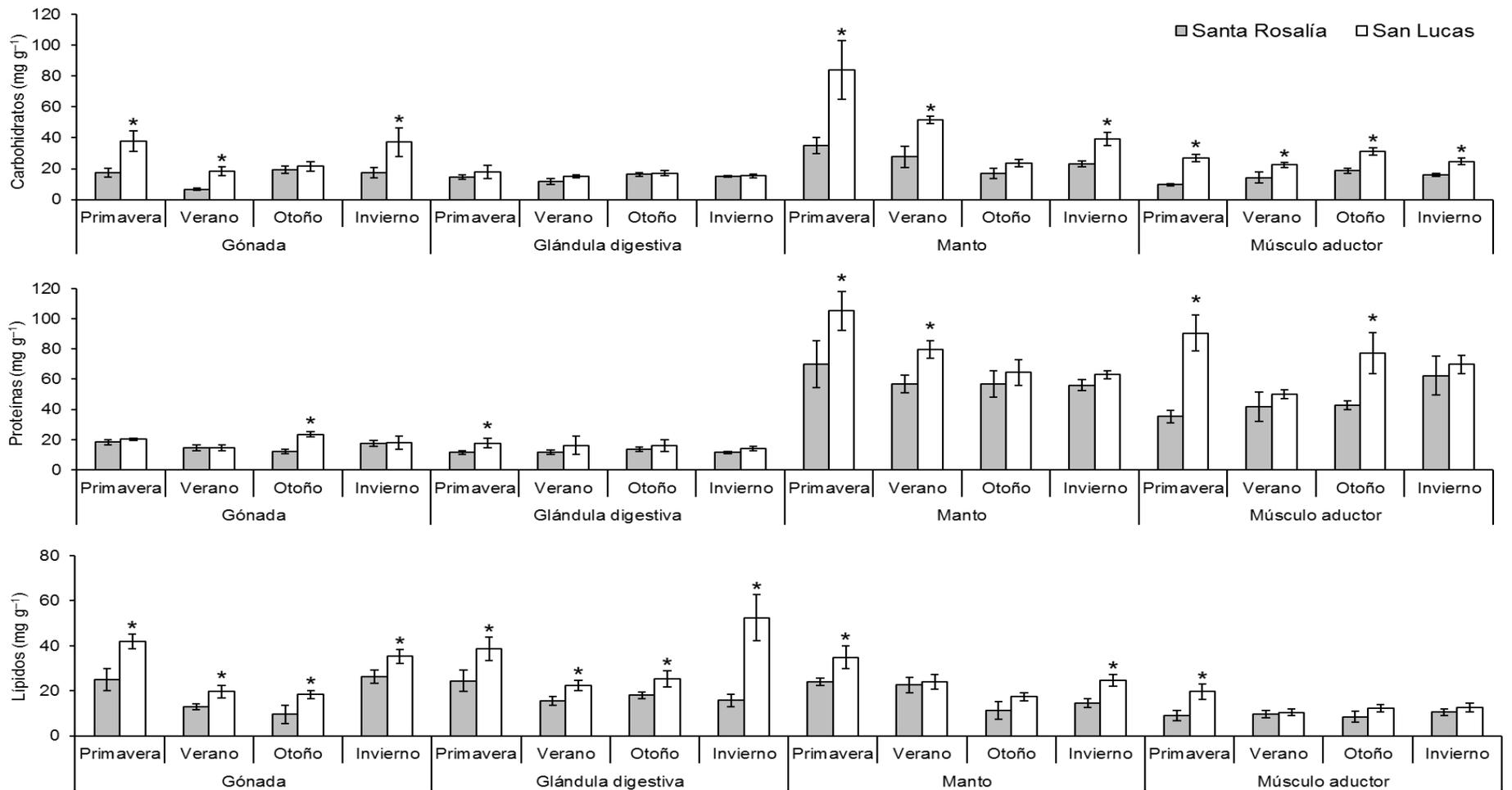
**Figura 5.** Diámetro por tipo de ovocito (A), área folicular (B) y número de ovocitos por folículo (C) de hembras de *Megapitaria squalida* por sitio de muestreo. Diferentes letras representan diferencias significativas entre sitios. Las barras indican el error estándar.

### **Evaluación bioquímica**

#### *Composición bioquímica*

Las concentraciones de carbohidratos, proteínas y lípidos fueron consistentemente más bajas en todos los tejidos de las almejas de Santa Rosalía y en todas las estaciones del año (Fig. 6). En esta zona, los carbohidratos totales en la gónada fueron significativamente más bajos ( $P < 0.05$ ) (poco más del doble), principalmente en primavera ( $17.28 \text{ mg g}^{-1}$  vs.  $37.87 \text{ mg g}^{-1}$  en San Lucas), en verano (tres veces más baja) ( $6.66 \text{ mg g}^{-1}$  vs.  $18.30 \text{ mg g}^{-1}$ ) y en invierno ( $17.50 \text{ mg g}^{-1}$  vs.  $37.23 \text{ mg g}^{-1}$ ). En la glándula digestiva no se presentaron diferencias significativas ( $P$

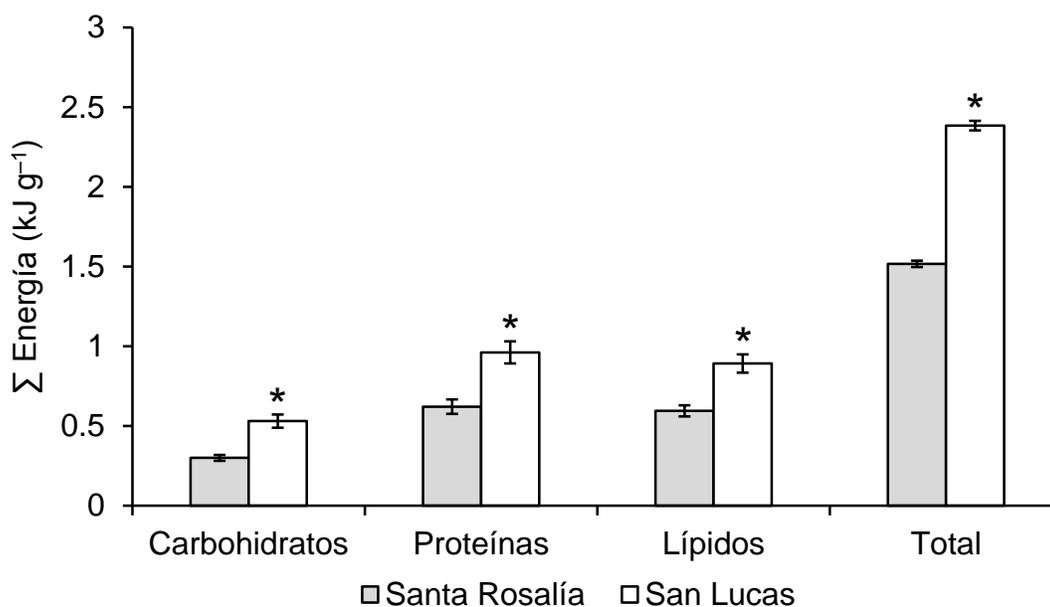
> 0.05) entre los sitios de muestreo. En el manto y el músculo aductor las concentraciones de carbohidratos también fueron más bajas en las almejas de Santa Rosalía, principalmente en el músculo en el cual se observaron diferencias significativas en todas las estaciones del año ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones de proteínas totales en la gónada y en la glándula digestiva se mantuvieron relativamente constantes entre sitios en todas las estaciones y fueron significativamente más bajas ( $P < 0.05$ ) en otoño (12.28 mg g<sup>-1</sup> vs. 23.37 mg g<sup>-1</sup>) y primavera (11.50 mg g<sup>-1</sup> vs. 17.67) en las almejas de Santa Rosalía, respectivamente. En el manto las concentraciones fueron significativamente más bajas en primavera (69.68 mg g<sup>-1</sup> vs. 105.24 mg g<sup>-1</sup>) y verano (56.65 mg g<sup>-1</sup> vs. 79.66 mg g<sup>-1</sup>) y el músculo fueron significativamente más bajas en primavera (poco más del doble) (35.24 mg g<sup>-1</sup> vs. 90.40 mg g<sup>-1</sup>) y otoño (42.71 mg g<sup>-1</sup> vs. 77.24 mg g<sup>-1</sup>). La concentración de lípidos totales en la gónada y en la glándula digestiva fue consistentemente más baja en las almejas de Santa Rosalía, y se observaron diferencias significativas entre sitios en todas las estaciones del año ( $P < 0.05$ ). En el manto las diferencias significativas entre sitios se observaron en concentración de lípidos en primavera (23.86 mg g<sup>-1</sup> vs. 34.89 mg g<sup>-1</sup>) y en invierno (14.64 mg g<sup>-1</sup> vs. 24.63 mg g<sup>-1</sup>). En el músculo la concentración de lípidos se mantuvo constante y fue significativamente más baja en primavera (el doble) (9.05 mg g<sup>-1</sup> vs. 19.59 mg g<sup>-1</sup>) en las almejas de Santa Rosalía.



**Figura 6.** Variación estacional y por sitios de muestreo de la concentración (mg g<sup>-1</sup> de peso seco) de carbohidratos, proteínas y lípidos totales en los tejidos de *Megapitaria squalida*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los sitios. Las barras indican el error estándar.

### Reservas energéticas

La cantidad de energía total (sumatoria de la energía que aportan los carbohidratos, proteínas y lípidos, incluyendo todos los tejidos) fue significativamente menor ( $F_{(1, 594)} = 50.07$ ;  $P = 0.0001$ ) en *M. squalida* de Santa Rosalía ( $1.51 \text{ kJ g}^{-1}$ ) con respecto a San Lucas ( $2.38 \text{ kJ g}^{-1}$ ) (Fig. 7). La cantidad de energía aportada por los carbohidratos (sumatoria, incluyendo todos los tejidos analizados) en las almejas de Santa Rosalía fue significativamente menor ( $F_{(1, 206)} = 25.837$ ,  $P = 0.0000$ ) respecto a las de San Lucas ( $0.30 \text{ kJ g}^{-1}$  y  $0.53 \text{ kJ g}^{-1}$ , respectivamente), al igual que las proteínas ( $F_{(1, 197)}=15.921$ ,  $P = 0.009$ ) ( $0.62 \text{ kJ g}^{-1}$  y  $0.96 \text{ kJ g}^{-1}$ , respectivamente) y los lípidos ( $F_{(1, 187)}=19.881$ ,  $P = 0.0001$ ) ( $0.59 \text{ kJ g}^{-1}$  y  $0.89 \text{ kJ g}^{-1}$ , respectivamente).



**Figura 7.** Cantidad de energía aportada por carbohidratos, proteínas y lípidos en los tejidos (suma de todos los tejidos) de *Megapitaria squalida* por sitio de estudio, así como el total de energía aportada por los tres componentes bioquímicos (suma de los tres componentes de todos los tejidos analizados). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los sitios. Las barras indican el error estándar.

## DISCUSIÓN

En este estudio, se presentaron diferencias notables en la reproducción (ciclo reproductivo, desarrollo de los ovocitos y tejido gonádico) y en las respuestas bioquímicas (reservas energéticas) de hembras de *Megapitaria squalida* que habitan en la zona contaminada con respecto a la zona de referencia. Está bien documentado que en condiciones naturales, la temperatura y la disponibilidad de alimento son los principales factores que regulan la reproducción en bivalvos marinos (Sastry, 1979; Barber & Blake, 2006), no obstante, este proceso puede verse afectado en condiciones de estrés crónico por contaminación (Baccetta & Mantecca, 2009; Tlili *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que ambas zonas de estudio no difieren en las condiciones de temperatura y concentraciones de clorofila *a*, por lo tanto, parece poco probable que las notables diferencias y anomalías en las funciones reproductivas y bioquímicas puedan ser atribuidas a la influencia de estas variables ambientales.

Las concentraciones de todos los elementos potencialmente tóxicos analizados en los sedimentos marinos de Santa Rosalía son consistentemente más altas que en la playa San Lucas y corroboran los altos niveles reportados previamente por Shumilin *et al.* (2011). De hecho, algunos elementos como el cobre y el zinc fueron hasta 35.5 y 11.8 veces más altos respectivamente (Santa Rosalía: Cu = 869 mg kg<sup>-1</sup>; Zn = 732 mg kg<sup>-1</sup> vs. San Lucas: Cu = 24.5 mg kg<sup>-1</sup>; Zn = 62 mg kg<sup>-1</sup>). Además, en algunas zonas cercanas a nuestro punto de muestreo en Santa Rosalía, las concentraciones de estos elementos superan por mucho los valores de Efectos de Rango Mediano (ERM), lo cual indica que podrían presentarse efectos negativos hasta en el 50% de la biota marina local (Long *et al.*, 1995; Shumilin *et al.*, 2013). La primera evidencia conspicua de la acumulación de metales en *M. squalida* de Santa Rosalía fue la coloración externa de sus conchas, la cual indica que éstas sirven como matriz de almacenamiento y depuración de metales. Se sabe que, debido a que la cinética de depuración en las conchas es considerablemente más lenta que en los tejidos blandos, éstas pueden preservar contaminantes por mayor tiempo y reflejarse en su coloración (Walsh *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2005). Particularmente, el perióstraco al ser la capa más externa de la concha, y por consiguiente, la primera en tener contacto con el medio exterior (sedimento y agua), puede presentar ciertas alteraciones en la

coloración como respuesta al estrés metálico. Asimismo, los bivalvos tienen la capacidad de desechar esta capa como parte de la depuración de los tóxicos y posteriormente regenerarla con la producción de conquiolina (Lares *et al.*, 2005). Todo lo anterior se evidencia por la coloración y apariencia externa de la concha de las almejas de Santa Rosalía.

Derivado de las concentraciones, significativamente mayores, de metales pesados encontrados en los sedimentos de Santa Rosalía, con respecto a San Lucas, y de las notables diferencias en la apariencia externa de las conchas entre ambas zonas; también se esperaba encontrar que los tejidos de las almejas de Santa Rosalía presentaran concentraciones consistentemente más altas de metales pesados en comparación con las almejas San Lucas. Sin embargo, las concentraciones de la mayoría de los metales en los tejidos de los individuos de ambas zonas se mantuvieron relativamente similares, lo cual puede indicar una capacidad diferencial de *M. squalida* para depurar y administrar los niveles de metales pesados en cada zona, similar a lo reportado para *Crassostrea hongkongensis* (Weng & Wang, 2015).

Aunque algunos elementos, como el cobre y el zinc, son esenciales para todos los seres vivos, ya que desempeñan un papel fundamental como cofactores de numerosas enzimas (Frassinetti *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2011), pueden llegar a ser tóxicos si están presentes en niveles superiores a los necesarios para llevar a cabo las funciones metabólicas normales, o si los organismos están expuestos crónicamente, incluso a bajos niveles (Gaetke & Chow, 2003). En coincidencia con lo anterior, el cobre y el zinc fueron los elementos que presentaron las concentraciones más altas en los tejidos de *M. squalida* de ambas zonas de estudio, principalmente en la glándula digestiva y las branquias. Lo anterior puede deberse a que, como en la mayoría de los bivalvos, estos tejidos diana, son los sitios principales de acumulación de metales pesados ya que poseen un papel importante en la regulación metabólica, detoxificación y eliminación, así como en los mecanismos de defensa inmunológica y homeostática (Marigómez *et al.*, 2002; Ciacci *et al.*, 2012). Cabe destacar que a pesar de no ser considerado como un tejido diana, la gónada fue el único tejido que presentó mayores concentraciones de todos los metales, principalmente zinc y cobre, en los individuos de *M. squalida* recolectados en Santa Rosalía con respecto a los de San

Lucas, lo cual podría aumentar las posibilidades de encontrar efectos adversos en la reproducción (Weng & Wang, 2015).

Estudios previos en distintas localidades costeras del Pacífico mexicano y del Golfo de California, han demostrado que *M. squalida* presenta diferentes patrones en su ciclo reproductivo. Por ejemplo, la mayoría de los trabajos coinciden en que este bivalvo presenta un ciclo reproductivo continuo asociado a la alta disponibilidad de alimento, con baja proporción de organismos en reposo (Baquerio & Stuardo, 1977; Singh *et al.*, 1991; Villalejo-Fuerte *et al.*, 1996; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000; Álvarez-Dagnino *et al.*, 2017). En contraste, Arellano-Martínez *et al.* (2006) reportaron un claro ciclo estacional con un prolongado periodo de actividad reproductiva que coincide con un aumento en la temperatura del agua, seguido de una inactividad reproductiva bien definida en la cual se presentó hasta un 100% de organismos en reposo. Evidentemente, estas diferencias están asociadas a las condiciones ambientales particulares de disponibilidad de alimento y de temperatura de cada localidad. En nuestro estudio, a pesar de que en ambas zonas la disponibilidad de alimento y la temperatura superficial del mar son similares, además de la cercanía geográfica entre una y otra (13 km) las diferencias en el patrón del ciclo reproductivo fueron notables, las cuales podrían estar relacionadas a la exposición crónica a la contaminación por metales pesados. El ciclo reproductivo de *M. squalida* de Santa Rosalía se ve interrumpido por la presencia de una intensa reabsorción de ovocitos (atresia) (58.2%) y una marcada fase de reposo (22%), a diferencia de las almejas de San Lucas que no presentaron ovocitos en reabsorción ni fase de reposo. Resultados similares fueron reportados en *Crassostrea angulata* cultivada en zonas costeras con fuentes de contaminación por metales pesados (principalmente Cu y Zn), con un 30% de gónadas en reposo y hasta un 100% de reabsorción de ovocitos (Vaschenko *et al.*, 2013). Ambas respuestas reproductivas son comunes en bivalvos que habitan ambientes contaminados y se ha determinado que los ciclos reproductivos pueden verse modificados, ya sea en tiempo, sincronización, así como la aparición e intensidad de cada fase reproductiva (Ruiz *et al.*, 2011; Izaguirre *et al.*, 2014). En este sentido, las almejas de Santa Rosalía presentaron solo un 3% de gónadas en madurez y aunque aparentemente llevan a cabo desoves, éstos son de muy baja intensidad con solo un

27% comparado con 65% de desove en las almejas de San Lucas. Lo anterior sugiere que existe un efecto adverso que provoca un retraso en la reproducción de *M. squalida* en Santa Rosalía y por consecuencia se puede restringir la madurez y dificultar el desove, una situación similar reportada en zonas contaminadas para otros bivalvos como *Mya arenaria* (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Siah *et al.*, 2003), *Donax trunculus* (Tlili *et al.*, 2011) y *Crassostrea angulata* (Vaschenko *et al.*, 2013).

La calidad de los ovocitos es un factor importante que influye en la viabilidad, supervivencia y desarrollo subsecuente de las larvas; se asume que un ovocito con buen tamaño y forma es funcionalmente viable (Mann, 1988). En invertebrados marinos, la vitelogénesis es un evento crucial que repercute en la reproducción, ya que el vitelo es el componente principal de los ovocitos y proporciona material y energía (Durou & Mouneyrac, 2007). Así, el desarrollo óptimo de los ovocitos y la cantidad total de material gametogénico depende del suministro de energía adecuado disponible para la gametogénesis (Barber & Blake, 1983). En este sentido, nuestro estudio reveló que en Santa Rosalía *M. squalida* presenta un diámetro de los ovocitos menor ( $21.7 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ) que en San Lucas ( $32.2 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ), y de hecho, dichos valores también son menores a los reportados para *M. squalida* en otras zonas costeras de México, tales como Bahía Juncalito, Golfo de California ( $25\text{--}40 \mu\text{m}$ ) (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000) y Laguna Ojo de Liebre en el Pacífico mexicano ( $30.6\text{--}42.2 \mu\text{m}$ ) (Arellano-Martínez *et al.*, 2006). Durante la ovogénesis, conforme avanza el desarrollo de las células, el costo energético es mayor debido a la producción de gránulos de vitelo en los ovocitos vitelogénicos y postvitelogénicos (Barber & Blake, 1991). En nuestro estudio, el diámetro de las ovogonias durante el desarrollo inicial fue similar en ambas zonas; sin embargo, a partir de los ovocitos previtelogénicos las almejas de San Lucas presentaron diámetros mayores que las almejas de Santa Rosalía. Lo anterior sugiere que *M. squalida* en Santa Rosalía presenta una cantidad de energía insuficiente para satisfacer de manera óptima la formación de los gametos, lo cual se ve reflejado en el diámetro menor de los ovocitos, el área folicular reducida y el bajo número de ovocitos por folículo. Estas condiciones ocasionarían una baja fecundidad y una reducción de la energía disponible para la viabilidad de las futuras larvas durante sus primeras etapas de vida (Bayne, 1975; McDowell *et al.*, 1999).

Esta condición se confirma con la consistente baja concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos en los tejidos de *M. squalida* de Santa Rosalía. Por lo general, la energía en bivalvos marinos es almacenada para que en cualquier evento de alta demanda energética éstas sean movilizadas e utilizadas. Por ejemplo, desde un punto de vista teórico, un organismo activo tiene una cierta cantidad de energía disponible que obtiene a través de su alimentación y que posteriormente invertirá en el crecimiento somático y la reproducción (Smolders *et al.*, 2005). Esta aseveración no parece aplicar en el caso de *M. squalida* de Santa Rosalía, debido a que sus reservas energéticas están siendo usadas para el mantenimiento homeostático (o la depuración) y agota la energía destinada para el crecimiento y la reproducción. En este sentido, un estudio reciente reportó que las almejas de este sitio presentan un deterioro en su crecimiento somático y un bajo índice de condición, el cual se evidenció con la presencia de tallas pequeñas (no sobrepasaron los 8 cm de longitud de la concha) y un crecimiento alométrico negativo (Yee-Duarte *et al.*, 2017a). Aunado a lo anterior, es evidente que la baja cantidad de energía está relacionada con las fallas reproductivas encontradas en este estudio y confirman que *M. squalida* presenta un déficit energético para soportar el proceso reproductivo, lo cual se ve reflejado en la interrupción de su ciclo reproductivo, el alto porcentaje de ovocitos maduros en reabsorción y su bajo porcentaje de desove, así como, su bajo diámetro de los ovocitos, área folicular y su bajo número de ovocitos por folículo. En contraste, las almejas de San Lucas optimizan su energía para crecer y reproducirse, lo que se ve reflejado en sus tallas grandes (hasta 12 cm de longitud de concha) y su tipo de crecimiento isométrico (Yee-Duarte *et al.*, 2017a), así como su ciclo reproductivo continuo y su mayor diámetro de los ovocitos.

En conclusión, la almeja chocolate *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía presenta una condición reproductiva deteriorada y presenta diversas fallas reproductivas correlacionadas con la exposición crónica a altas concentraciones de metales pesados en los sedimentos de este sitio. Estas fallas, están relacionadas con la poca cantidad de reservas energéticas (carbohidratos, proteínas y lípidos) que presenta *M. squalida* para llevar a cabo de manera óptima su reproducción.

## 7. DISCUSIÓN INTEGRATIVA

En los últimos años ha aumentado considerablemente la sensibilización por la conservación del medio ambiente y, en general, por el desarrollo de políticas dirigidas a la conservación y uso sostenible de los recursos naturales. Lo anterior se ha visto reflejado en la creación de numerosos convenios para prevenir efectos adversos de la contaminación en el medio ambiente, unos destinados al control de las fuentes contaminantes y otros a la conservación de determinados hábitats de especial interés. De igual forma, la aplicación de diversos programas y proyectos de monitoreo ambiental se han empleado en la mayoría de los mares del mundo, principalmente en los países de primer mundo (Torres *et al.*, 2008).

De hecho, existen programas específicos en los que se utilizan moluscos bivalvos como bioindicadores de contaminación. El más reconocido es el programa “Mussel Watch”, el cual surge en la década de los 1970s en los Estados Unidos (Goldberg, 1975). A partir de entonces, se reconoció como una valiosa herramienta para evaluar el impacto de las actividades humanas sobre el medio marino. En el contexto de los biomarcadores, el biomonitoreo se define como el uso sistemático de las respuestas biológicas que permiten evaluar los cambios en el entorno y establecer un programa de control de calidad ambiental (Torres *et al.*, 2008). En un contexto más general, el término se define como una técnica científica para evaluar los impactos ambientales, incluyendo la exposición humana a sustancias químicas naturales y sintéticas, con base en el muestreo y análisis de un individuo (Zhou *et al.*, 2008). Esta estrategia se basa en el conocimiento que se puede tener de los contaminantes que entran en el ambiente de un individuo, dejando en éste marcas que reflejan su exposición.

Dada la importancia de las zonas costeras y las comunidades bentónicas, y con el fin de proporcionar un uso óptimo de los recursos marinos, cada vez se hace más énfasis en crear herramientas y metodologías para evaluar y monitorear la calidad y salud de estos sistemas. Sin embargo, por muchos años estas investigaciones se centraron principalmente en mediciones de parámetros abióticos y hacia una perspectiva de salud humana, dejando de lado los efectos biológicos adversos que se puedan presentar en los organismos bentónicos marinos. Actualmente, los estudios

han puesto más empeño en determinar indicadores biológicos medibles a distintos niveles de organización biológica, que puedan revelar las alteraciones y situaciones de estrés a las que están sometidos los organismos en ambientes contaminados, y de esta manera, tener un panorama desde un punto de vista integral.

La presente tesis, corresponde a la primera evaluación de la condición de salud reproductiva de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* en la zona minera de Santa Rosalía, BCS, y de hecho, constituye una línea base de herramientas que pueden ser utilizadas para futuros estudios de salud, tanto ambiental como de los organismos. Las primeras señales de respuesta a la contaminación se pudieron evidenciar en el capítulo 1 por medio del cálculo de diferentes indicadores somáticos. De acuerdo a Peig & Green (2009) es muy común que la condición corporal o somática se aborde como una medida general de la salud, calidad o el vigor de un animal, y se ha afirmado ampliamente que es un determinante importante de la aptitud física (fitness). La aplicación de estos indicadores en *M. squalida* fue indispensable para conocer de manera preliminar su estado de salud general, además de arrojar una predicción de su estado energético y sirvió como una base para plantear los posteriores análisis de este trabajo. Respecto al capítulo 2, se tuvo un hallazgo importante en cuanto a la disposición de los parásitos dentro de la gónada de *M. squalida*. Si bien, la castración parasitaria es un fenómeno ampliamente descrito en diversos grupos de animales marinos tales como crustáceos, equinodermos, peces, mamíferos y moluscos (Schuldt & Lunaschi, 1987), las características de la castración pueden variar dependiendo del hospedero y de las condiciones en las que se desarrolle. En esta investigación, la disposición de las larvas de tremátodos dentro de la gónada de *M. squalida* difirió respecto a la descripción general que se hace en la mayoría de los trabajos sobre castración en moluscos bivalvos. En este sentido, la infección de los parásitos en la almeja ocurrió dentro de los folículos, algo que por lo regular ocurre en el espacio hemocélico de la gónada (Cort *et al.*, 1954; Lauckner, 1983; Galaktionov & Dobrovolskij, 2003; Valderrama *et al.*, 2004). Es probable que las condiciones ambientales de contaminación en la zona de Santa Rosalía estén propiciando este tipo de castración inusual, ya que al parecer la almeja chocolate es más susceptible a ser parasitada debido a la baja inmunocompetencia y por lo tanto, a la disminución de la

resistencia a ser parasitada. Por su parte, los análisis en el capítulo 3 abordan distintos enfoques que en conjunto dan un acercamiento más detallado sobre el impacto de la contaminación en la reproducción de *M. squalida*. Con el enfoque histopatológico, se pudo observar por primera vez algunas condiciones patológicas en la gónada de la almeja. La neoplasia gonadal y las diferentes alteraciones histopatológicas fueron hallazgos importantes debido al impacto que generan en la condición reproductiva. También, la modificación del ciclo reproductivo, la baja calidad de los ovocitos y la poca energía destinada para llevar a cabo el proceso reproductivo comprometen el éxito reproductivo de *M. squalida*. De manera integral, los resultados de esta tesis indican que *M. squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía presenta un estado de salud reproductiva deteriorado, lo cual sugiere un efecto adverso en la gametogénesis, en la calidad de los gametos y por lo tanto en su potencial reproductivo, correlacionado con la exposición crónica a la alta contaminación por metales pesados.

Finalmente, los resultados de esta investigación pueden ser utilizados para futuros trabajos de monitoreo ambiental. Adicionalmente, se propone la aplicación de más tipos de biomarcadores y hacer una combinación de ellos con la finalidad de evaluar de mejor manera los efectos biológicos en la zona costera del puerto minero de Santa Rosalía. En México y más aún en BCS, los programas de monitoreo relacionados a contaminantes están relativamente poco desarrollados. La necesidad de crear herramientas que proporcionen información sobre el estado de salud de los organismos es una tarea que se debe atender en un futuro. Actualmente, el país cuenta con un alto grado de industrialización, y por lo tanto, es indispensable emplear adecuadamente los recursos naturales como fuentes de producción y factores de desarrollo. Sus zonas costeras pueden aprovecharse como sitios de asentamientos humanos y de expansión industrial, pero tomando en cuenta que la contaminación va en aumento y que es fundamental legislar y regular los efectos de cualquier tipo de actividad que se lleve a cabo en la zona costera. Finalmente, es indudable que México necesita de más estudios que permitan manejar y administrar adecuadamente sus zonas costeras, para evitar que éstas sufran un deterioro ambiental y así preservar sus recursos, que son una fuente primordial de desarrollo y se espera que los resultados de mi investigación doctoral, puedan aportar información valiosa para tal motivo.

## 8. CONCLUSIONES

- Con la aplicación del análisis de tallas, el índice de condición y las relaciones peso–longitud, se pudo conocer de manera preliminar el estado de salud general de *Megapitaria squalida*, el cual nos indicó que esta almeja presenta un estado de salud general deteriorado en comparación con otras zonas costeras de Baja California Sur.
- El primer registro de larvas de tremátodos digéneos en la gónada de *M. squalida* indica que estos bivalvos sirven como hospederos intermediarios y que la elevada densidad de infección causa castración parasitaria, afectando así la reproducción del huésped. Lo más probable es que el ambiente contaminado de Santa Rosalía favorezca la aparición y alta densidad de infección de las almejas por las larvas de tremátodos, que aumenta en la estación cálida. Sin embargo, se necesitan más análisis y trabajo de laboratorio para examinar los mecanismos subyacentes a las infecciones, así como comprender mejor esta compleja relación parasitismo-contaminación.
- Basados en las características histológicas se determinó que *M. squalida* presenta neoplasia gonadal tipo germinoma. Estos tumores gonadales son malignos y afectan negativamente la espermatogénesis de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía, y aunado a la baja condición fisiológica reportada con anterioridad, la neoplasia posiblemente los conduzca a la muerte. Se sugiere un efecto del ambiente contaminado como agente etiológico de la neoplasia, sin embargo, se requiere de más investigación para comprender mejor su etiología.
- El análisis histopatológico evidenció un deteriorado estado de salud gonadal de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía y sugiere una correlación con la exposición crónica a la alta contaminación por metales pesados en ese sitio. La alta prevalencia e intensidad de las alteraciones histopatológicas en la gónada sugieren un fuerte efecto adverso en la gametogénesis, la calidad de

los gametos y, por lo tanto, en el potencial reproductivo de *M. squalida* de este sitio.

- El ciclo reproductivo de las hembras de *M. squalida* del puerto minero de Santa Rosalía es interrumpido por una intensa reabsorción de ovocitos y una notable fase de reposo. El porcentaje de almejas en madurez (3%) y en desove (27%) fue relativamente bajo, al igual que el diámetro de los ovocitos, el área folicular y el número de ovocitos por folículo. Las reservas energéticas (carbohidratos, proteínas y lípidos) en los tejidos de *M. squalida* de Santa Rosalía, son consistentemente más bajas que en las almejas de San Lucas, lo que representa una menor cantidad de energía para llevar a cabo óptimamente su reproducción
- De manera integral, se concluye que *M. squalida* en el puerto minero de Santa Rosalía presenta un estado de salud reproductiva deteriorado, lo cual sugiere un efecto adverso en la gametogénesis, en la calidad de los gametos y por lo tanto en su potencial reproductivo, correlacionado con la exposición crónica a la alta contaminación por metales pesados.

## 9. RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

La presente tesis, genera información base valiosa que puede ser complementada más a detalle con algunas investigaciones y análisis específicos (tanto en campo como en laboratorio a través de bioensayos).

- Realizar análisis que aborden aspectos fisiológicos de bivalvos marinos, tales como: la tasa de filtración (consumo de alimento), excreción, osmorregulación, consumo de oxígeno, proporción ADN/ARN y la tasa de crecimiento. Estos procesos tienen en común, que requieren de la acción en cadena de uno o más tejidos para llevar a cabo su objetivo. Además, son procesos que operan a nivel individuo y deben funcionar adecuadamente para que el organismo pueda sobrevivir, por lo que un deterioro en cualquier función inevitablemente reducirá el potencial de supervivencia de cualquier organismo.
- Analizar la ovogénesis y la espermatogénesis a nivel ultraestructura (microscopía electrónica de transmisión). Estas herramientas son reconocidas como piezas importantes para la evaluación de los efectos por contaminantes a niveles mucho más finos que la histología convencional.
- Caracterizar la respuesta inmune de *M. squalida* por medio del análisis de los hemocitos. Los cambios en la respuesta inmune representan buenos biomarcadores y son parte importante en los programas de investigación inmunotoxicológica. Particularmente, en los bivalvos la defensa inmunológica depende en gran medida de los hemocitos. Estas células juegan un papel muy importante en la respuesta inmune debido a que reconocen agentes extraños y participan activamente en la fagocitosis (principal mecanismo de defensa celular).

- Abordar aspectos endocrinos y cómo los contaminantes pueden actuar como disruptores hormonales que modulan o interrumpen la síntesis, secreción, transporte y la acción de las mismas, y como consecuencia, se puede alterar la homeostasis del sistema endocrino, dando lugar a efectos adversos en la salud, crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos.
- Realizar análisis sobre enzimas biomarcadoras de exposición, efecto y susceptibilidad a los contaminantes y de enzimas que estén implicadas en los procesos de detoxificación, tales como la glutatión-S-transferasa, así como algunas que participan en la defensa contra el estrés oxidativo (catalasa) que los contaminantes pudieran causar.
- Hacer una cuantificación de metalotioneínas, las cuales tienen la capacidad de unirse por medio de grupos sulfhídrico (grupo tiol) a metales pesados y están implicadas en varias funciones metabólicas incluyendo la homeostasis y la desintoxicación. La evaluación de las metalotioneínas en estudios de contaminación ambiental ha sido sumamente utilizada, ya que debido a su especificidad, son vistas como potentes biomarcadores de exposición a metales pesados.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adriano, D.C. 2001. *Trace elements in the terrestrial environment*. 2nd Edition. New York: Springer-Verlag. 867 pp.
- Ahearn, G.A., P.K. Mandal & A. Mandal. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. 174: 439-452.
- Aldana, M., K. González, G. Loot, J. Pulgar & P. Marquet. 2009. First intermediate host of the digenean trematode *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae) in Chile. *Journal of Parasitology*. 95: 1408-1414.
- Alonso, A., P. Suarez, C. Alvarez, F. San Juan & P. Molist. 2001. Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ria of Vigo (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 47: 73-79.
- Álvarez-Dagnino, E., A. Santamaría-Miranda, M. García-Ulloa & A.M. Góngora-Gómez. 2017. Reproduction of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) in the Southeast Gulf of California, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 65: 881-889.
- Arellano-Martínez, M., M.F. Quiñónez-Arreola, B.P. Ceballos-Vázquez & M. Villalejo-Fuerte. 2006. Reproductive pattern of the squalid callista *Megapitaria squalida* from the northwest of Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 25: 849-856.
- Arnold, W.S., D.C. Marelli, M. Parker, P. Hoffman, M. Frischer & J. Scarpa. 2002. Enhancing hard clam (*Mercenaria* spp.) population density in the Indian River Lagoon, Florida: a comparison of strategies to maintain the commercial fishery. *Journal of Shellfish Research*. 21: 659-672.
- Bacchetta, R. & P. Mantecca. 2009. DDT polluted meltwater affects reproduction in the mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*. 76: 1380-1385.
- Baqueiro, C.E & J. Stuardo. 1977. Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby, 1831), *M. squalida* (Sowerby, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) (Bivalvia; Veneridae) de la Bahía de Zihuatanejo e Isla de Ixtapa, Guerrero, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México*. 4: 161-208.

- Baqueiro-Cárdenas, E. & D. Aldana-Aranda. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from Mexico. *Bulletin of Marine Sciences*. 66: 13-27.
- Barber, B.J. & N.J. Blake. 1983. Growth and reproduction of the bay scallop, *Argopecten irradians (Lamarck)* at its southern distributional limit. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 66: 247-256.
- Barber, B.J. & N.J. Blake. 1991. Reproductive physiology, 377-409. In: Shumway, S.E. & G.J. Parsons (Eds.) *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*. Elsevier, Amsterdam, 1095 pp.
- Barber, B.J. 1996. Effects of gonadal neoplasms on oogenesis in softshell clams, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 161-168.
- Barber, B.J. 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources*. 17: 449-466.
- Barber, B.J. & N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology, 357-416. In: Shumway, S.E. & G.J. Parsons (Eds.) *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*. Elsevier, Amsterdam, 1500 pp.
- Barile, F.A. 2008. *Principles of toxicology testing*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Barnes, H. & J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 12: 103-118.
- Barry, M.M. & P.P. Yevich. 1972. Incidence of gonadal cancer in the quahog *Mercenaria mercenaria*. *Oncogenesis*. 26: 87-96.
- Barry, M. & P.P. Yevich. 1975. The ecological, chemical and histopathological evaluation of an oil spill site. Part I. Ecological studies. *Marine Pollution Bulletin*. 6: 164-173.
- Baussant, T., M. Ortiz-Zarragoitia, M. Cajaraville, R. Bechmann, I. Taban & S. Sanni. 2011. Effects of chronic exposure to dispersed oil on selected reproductive processes in adult blue mussels (*Mytilus edulis*) and the consequences for the early life stages of their larvae. *Marine Pollution Bulletin*. 62: 1437-1445.
- Bayne, B.L. 1975. Reproduction in bivalve molluscs under environmental stress, 259-277. *Physiological ecology of estuarine organisms*, University of South Carolina Press, Columbia.

- Bayne, R.D. 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs, 432-448. *In*: M. Wiley, editor. *Estuarine Processes*. Academic Press, Nueva York.
- Bayne, B.L., M.N. Moore, J. Widdows & D.R. Livingstone. 1979. Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 286: 563-581.
- Bergés-Tiznado, M.E., J.F. Márquez-Farías, Y. Torres-Rojas, F. Galván-Magaña & F. Páez-Osuna. 2015. Mercury and selenium in tissues and stomach contents of the migratory sailfish, *Istiophorus platypterus*, from the Eastern Pacific: Concentration, biomagnification, and dietary intake. *Marine Pollution Bulletin*. 101: 349-358.
- Bigas, M., M. Duefort & M. Poquet. 2001. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the European oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. *Tissue and Cell*. 33: 178-188.
- Binelli, A., R. Bacchetta, P. Mantecca, F. Ricciardi, A. Provini & G. Vailati. 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruption. *Aquatic Toxicology*. 69: 175-188.
- Boehs, G., A. Villalba, L. Ceuta & J. Rocha. 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine región of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103: 43-47.
- Boening, D.W. 1999. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental Monitoring and Assessment* 55: 459-470.
- Boscolo, R., M. Cornello & O. Giovanardi. 2003. Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) farming systems. *Aquaculture International*. 11: 243-254.
- Boscolo, M., D. Bertotto, F. Quaglio, M. Vascellari, F. Pascoli, E. Negrato, G. Binato & G. Radaelli. 2014. Histopathology and stress biomarkers in the clam *Venerupis philippinarum* from the Venice Lagoon (Italy). *Fish Shellfish Immunology*. 39: 42-50.

- Botello, A.V. & F. Páez-Osuna. 1986. El problema crucial de la contaminación, 82-85. *En: (Editado por el Centro de Ecodesarrollo) Serie Medioambiente. Coatzacoalcos, México.*
- Bower, S.M., S.E. McGladdery & I.M. Price. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*. 4: 1-199.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-253.
- Brody, S. 1945. Bioenergetics and growth. New York, Van Nostrand Reinhold. 1023 pp.
- Brown, M.E., M. Kowalewski, R.J. Neves, D.S. Cherry & M.E. Schreiber. 2005. Freshwater mussel shells as environmental chronicles: geochemical and taphonomic signatures of mercury-related extirpations in the North Fork Holston River, Virginia. *Environmental Science & Technology*. 39: 1455-1462.
- Brungs, W.A., R.A. Carlson, W.B. Horning, J.H. McCormick, R.L. Spehar & J.D. Young. 1978. Effects of pollution on freshwater fish. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 50: 1582-1637.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2002. *Invertebrates*. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A. 936 pp.
- Bush, A.O., K.D. Lafferty, J.M. Lotz & A. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*. 83: 575-583.
- Cadena-Cárdenas, L., L. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín, J. García-Hernández & B. Acosta-Vargas. 2009. Heavy metal levels in marine mollusks from areas with, or without, mining activities along the Gulf of California, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 57: 96-102.
- CAM, Corporación Ambiental de México. 2011. *Manifestación de impacto ambiental. Modalidad particular. Proyecto: Terminal Marítima "El Boleo"*. Minera Metalúrgica del Boleo. Proyecto CAM 11052. 293 pp.

- Camacho-Mondragón, M.A., M. Arellano-Martínez & B.P. Ceballos-Vázquez. 2012. Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Scientia Marina*. 76: 539-548.
- Cantú-Medellín, N., N. Olguín-Monroy, L. Méndez-Rodríguez & T. Zenteno-Savín. 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissue of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56: 60-66.
- Carballal, M.J., B.J. Barber, D. Iglesias & A. Villalba. 2015. Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131: 83-106.
- Carella, F., B. Restucci, P. Maiolino & G. De Vico. 2009. A case of germinoma in a limpet (*Patella coerulea*) (Patellogastropoda). *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 154-156.
- Carella, F., S.W. Feist, J.P. Bignell & G. De Vico. 2015. Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131: 107-120.
- Casado-Martínez, C. 2006. *Caracterización de material de dragado optimizando un método integrado de evaluación de la calidad ambiental*. Tesis de doctorado. Universidad de Cádiz. 344 pp.
- Ceuta, L.O. & G. Boehs. 2012. Parasites of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Camamu Bay, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 72: 421-427.
- Chakraborty, S. & S. Ray. 2009. Nuclear morphology and lysosomal stability of molluscan hemocytes as possible biomarkers of arsenic toxicity. *CLEAN-Soil Air Water*. 37: 769-775.
- Chandia, L.A.P., A.C. Alfaro, R. Flores-Aguilar, M. Godoy & A. Gutiérrez-Venegas. 2012. Histological evidence of accumulation of iron in postlarvae of red abalone, *Haliotis rufescens*. *Aquaculture Research*. 43: 1635-1642.
- Chen, Y., D.A. Jackson & H.H. Harvey. 1992. A comparison of von Bertalanffy and polynomial functions in modelling fish growth data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49: 1228-1235.

- Choi, D.L., N.S. Lee, H.J. Choi, M.A. Park, S.E. McGladdery & M.S. Park. 2004. Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova-like virus in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 59: 205-209.
- Ciacci, C., C. Barmo, G. Gallo, M. Maisano, T. Cappello, A. D'Agata, C. Leonzio, A. Mauceri, S. Fasulo & L. Canesi. 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 120-121: 109-118.
- Cima, F., V. Matozzo, M. G. Marin & L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunology*. 10: 677-693.
- Clark, R.B. 2002. *Marine Pollution*. Ed. Oxford sexta edición. 224 pp.
- Coe, W.R. 1943. Sexual differentiation in molluscs. I. Pelecypods. *The Quarterly Review of Biology*. 18: 154-164.
- CONAPESCA, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2014. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2014. SAGARPA. México.
- Cort, W.W., D.J. Ameel & A. Van der Woude. 1954. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes. *Experimental Parasitology*. 3: 185-225.
- Corte, G.N. 2015. Reproductive cycle and parasitism in the clam *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae). *Invertebrate Reproduction & Development*. 59: 66-80.
- Costa, P.M., S. Carreira, M.H. Costa, & S. Caeiro. 2013. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. *Aquatic Toxicology*. 126: 442-454.
- Cremonte, F., A. Figueras & E. Burreson. 2005. A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture*. 249: 23-33.
- Cuevas, N., I. Zorita, P. M. Costa, J. Franco & J. Larreta. 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels:

- Integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic Toxicology*. 162: 152-164.
- Darriba, S., D. Iglesias, J.C. Harshbarger & C. López. 2006. Germinoma in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 140-142.
- Darriba, S., D. Iglesias, M. Ruiz, R. Rodríguez & C. López. 2010. Histological survey of symbionts and other conditions in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Pharidae) of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 23-30.
- da Silva, P.M., A.R. Magalhães & M.A. Barracco. 2002. Effects of *Bucephalus* sp. (Trematoda: Bucephalidae) on *Perna perna* from a culture station in Ratonés Grande Island, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 79: 154-162.
- DeFur P.L., D. Crane, C. Ingersoll & L. Tattersfield. 1999. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment, 12-15 *In: Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates*, December 1998, Noordwijkerhout, Netherlands, SETAC Press, Pensacola.
- De Vico, G. & F. Carella. 2012. Morphological features of the inflammatory responses in molluscs. *Research in Veterinary Science*. 93: 1109-1115.
- Dillon, T.M. & M.P. Lynch. 1981. Physiological responses as determinants of stress in marine and estuarine organisms, 227-241. *In: G.W. Barrett & R. Rosenberg (eds.) Stress effects on natural ecosystems*. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, England.
- Dove, M. C. & J. Sammut. 2007. Histological and feeding response of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, to acid sulfate soil outflows. *Journal of Shellfish Research*. 26: 509-518.
- Durou, C. & C. Mouneyrac. 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *General and Comparative Endocrinology*. 150: 106-113.
- ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre). 1996. The role of bioaccumulation in environmental risk assessment: The aquatic

- environment and related food webs. European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Brussels, Belgium. 130 pp.
- Escobar-Sánchez, O., J. Ruelas-Inzunza, X.G. Moreno-Sánchez, A.K. Romo-Piñera & M.G. Frías-Espericueta. 2016. Mercury concentrations in pacific angel sharks (*Squatina californica*) and prey fishes from Southern Gulf of California, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 96: 15-19.
- FAO. 2001. Estadísticas Mundiales de Pesca. Roma FAO.
- Filgueira, R., L.A. Comeau, T. Landry, J. Grant, T. Guyondet & A. Mallet. 2013. Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. *Ecological Indicators*. 25: 215-229.
- Frassinetti, S., G.L. Bronzetti, L. Caltavuturo, M. Cini & C. Croce. 2006. The role of zinc in life: a review. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*. 25: 597-610.
- Frías-Espericueta, M.G., J.I. Osuna-López & F. Páez-Osuna. 1999. Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. *The Science of the Total Environment*. 231: 115-123.
- Frías-Espericueta, M.G., J. Osuna-López, D. Voltolina, G. López-López, G. Izaguirre-Fierro & M. Muy-Rangel. 2008. The metal content of bivalve molluscs of a coastal lagoon of NW Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 80: 90-92.
- Frías-Espericueta, M.G., R. Castro-Longoria, G.J. Barrón-Gallardo, J.I. Osuna-López, S.M. Abad-Rosales, F. Páez-Osuna & D. Voltolina. 2008. Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture*. 278: 97-100.
- Gaetke, L.M. & C.K. Chow. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. 189: 147-163.
- Gagné, F., C. Blaise, J. Pellerin, M. Douville, S. Gauthier-Clarc & L. Viglino. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 134: 189-198.

- Galaktionov, K.V. & A.A. Dobrovolskij. 2003. *The biology and evolution of trematodes: and essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions and evolution of digenetic trematodes*. Netherlands: Dordrecht Kluwer Academic. 592 pp.
- García-Gasca, A., B. Leal-Tarin, J. Ríos-Sicairos, R. Hernández-Cornejo, G. Aguilar-Zárate & M. Betancourt-Lozano. 2010. Follicular apoptosis in the mussel. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 45: 56-61.
- García-Hernández, J., L. García-Rico, M.E. Jara-Marini, R. Barraza-Guardado & A.H. Weaver. 2005. Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 733-739.
- Gaspar, M., M. Santos & P. Vasconcelos. 2001. Weight-length relationships of 25 bivalve species (Mollusca: Bivalvia) from the Algarve coast (southern Portugal). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 81: 805-807.
- Gauthier-Clerc, S., J. Pellerin, C. Blaise & F. Gagné. 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 131: 457-467.
- Giarratano, E., C.A. Duarte & O.A. Amin. 2010. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 270-279.
- Gilardoni, C., G. Posadas, M. A. Kroeck & F. Cremonte. 2011. Monorchiid and aporocotylid cercariae (Digenea) parasitising the purple clam *Amiantis purpurata* (Bivalvia, Veneridae) from the Southwestern Atlantic coast. *Acta Parasitologica*. 56: 385-391.
- Gilardoni, C., C. Ituarte & F. Cremonte. 2012. Castrating effects of trematode larvae on the reproductive success of a highly parasitized population of *Crepidatella dilatata* (Caenogastropoda) in Argentina. *Marine Biology*. 159: 2259-2267.
- Giri, A.N., D.K. Srivastava & S.P. Trivedi. 2000. Insecticide basathrin induced histoanatomical insult of ovarian tissue of Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. *Biological Memoirs*. 26: 20-24.
- Goldberg, E.D. 1975. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. 7: 91-103.

- Gomes, T., J.P. Pinheiro, I. Cancio, C.G. Pereira, C. Cardoso & M.J. Bebianno. 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology*. 45: 9356-9362.
- González, P.M., D. Abele & S. Puntarulo. 2010. Exposure to excess dissolved iron in vivo affects oxidative status in the bivalve *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 152: 167-174.
- Guerlet, E., K. Ledy & L. Giambérini. 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquatic Toxicology*. 77: 19-32.
- Gupte, A. & R.J. Mumper. 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*. 35: 32-46.
- Gutiérrez-Barrera, J.A., M. Maldonado-Díaz, M. Villalejo-Fuerte, M. Mandujano-Herrera & B. Bermúdez-Almada. 1999. Evaluación de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en el Parque Nacional Bahía de Loreto, Golfo de California, 41. *En: Libro de resúmenes del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés, A.C. y I Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés*. UNISON, Hermosillo.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., J.A. Villaescusa-Celaya & A. Arreola-Chimal. 1999. Bioaccumulation of metals in mussels from four sites of the coastal region of Baja California. *Ciencias Marinas*. 25: 557-578.
- Guzmán-García, X., A. Martínez-López, L. Rodríguez-Medina, H. González-Márquez & A. Vázquez-Botello. 2007. Tissue changes of the oyster *Crassostrea virginica* due to cadmium exposition and depuration. *Hidrobiológica*. 17: 41-48.
- Hesselman, D.M., N.J. Blake & E.C. Peters. 1988. Gonadal neoplasms in hard Shell clams *Mercenaria* spp., from the Indian River, Florida: occurrence, prevalence, and histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52: 436-446.
- Howard, D.W., E.J. Lewis, B.J. Keller & C.S. Smith. 2004. *Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans*. NOAA Technical Memorandum.
- Huerta-Díaz, M.A., A. Muñoz-Barbosa, X.L. Otero, J. Valdivieso-Ojeda & E.C. Amaro-Franco. 2014. High variability in geochemical partitioning of iron, manganese

- and harmful trace metals in sediments of the mining port of Santa Rosalia, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Geochemical Exploration*. 145: 51-63.
- Humason G.L. 1979. *Animal tissue techniques*, fourth ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 661 pp.
- Hummel, H., R. Modderman, C. Amiard-Triquet, F. Rainglet, Y. van Duijn, M. Hersevoort, J. de Jong, R. Bogaards, G. Bachelet, M. Desprez, J. Marchand, B. Sylvand, J. Amiard, H. Rybarczyk & L. de Wolf. 1997. A comparative study on the relation between copper and condition in marine bivalves and the relation with copper in the sediment. *Aquatic Toxicology*. 38: 165-181.
- Izaguirre, U., Garmendia, L., Soto, M., Etxebarria, N. & I. Marigómez. 2014. Health status assessment through an integrative biomarker approach in mussels of different ages with a different history of exposure to the Prestige oil spill. *Science of the Total Environment*. 493: 65-78.
- Jara-Marini, M.E., M.F. Soto-Jiménez & F. Páez-Osuna. 2009. Trophic relationships and transference of cadmium, copper, lead and zinc in a subtropical coastal lagoon food web from SE Gulf of California. *Chemosphere*. 77: 1366-1373.
- Jonnalagadda, P.R. & B.P. Rao. 1996. Histopathological changes induced by specific pesticides on some tissues of the fresh water snail, *Bellamya dissimilis* Müller. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 57: 648-654.
- Jorgensen, S.E. 2016. *Ecotoxicology and Chemistry Applications in Environmental Management*. CRC Press. Copenhagen University, Denmark. 326 pp.
- Keen, A.M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. Stanford University Press, Stanford, 1025 pp.
- Kennish, M.J. 1997. *Practical handbook of estuarine and marine pollution*. CRC press, EU. 315 pp.
- Ketata, I., W. Smaoui-Damak, F. Guermazi, T. Debai & A. Hamza-Chaffai. 2007. *In situ* endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 146: 415-430.
- Khaled, I., H. Ferjani, R.B. Ahmed & A.H. Harrath. 2016. Effects of oil-related environmental pollutants on gonads of the freshwater leech *Limnatis nilotica* (Annelida, Hirudinea). *Invertebrate Reproduction & Development*. 60: 263-270.

- Khan, R.A. & J. Thulin. 1991. Influence of pollution on parasites of aquatic animals. *Advances in Parasitology*. 30: 201-238.
- Kim, Y., E. Powell, T. Wade, B. Presley & J. Sericano. 1998. Parasites of sentinel bivalves in the NOAA status and trends program: Distribution and relationship to contaminant body burden. *Marine Pollution Bulletin*. 37: 45-55.
- Koprivnikar, J. & R. Poulin. 2009. Effects of temperature, salinity, and water level on the emergence of marine cercariae. *Parasitology Research*. 105: 957-965.
- Lafferty, K.D. 1997. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment?. *Parasitology Today*. 13: 251-255.
- Lares, M.L., L. Rivero & M.A. Huerta-Diaz. 2005. Cd concentration in the soft tissue vs. the nacreous layer of *Mytilus californianus*. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 1373-1381.
- Lasiak, T.A. 1993. Bucephalid trematode infections in the brown mussel *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). *African Journal of Marine Science*. 13: 127-134.
- Lauckner, G. 1983a. Diseases of mollusca: Bivalvia, 477-961 *In*: O. Kinne, editor. *Diseases of Marine Animals Vol. 2*. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland.
- Lauckner, G. 1983b. Neoplasia, 863-879. *In*: Kinne, O. (Ed), *Diseases of marine animals. II (Mollusca). Bivalvia to Scaphopoda*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- Lawrence, D. & G.I. Scott. 1982. The determination and use of condition index of oysters. *Estuaries*. 5: 23-27.
- Leavitt, D.F., B.A. Lancaster, A.S. Lancaster & J. Capuzzo. 1990. Changes in the biochemical composition of a subtropical bivalve, *Arca zebra*, in response to contaminant gradients in Bermuda. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 138: 85-98.
- Leung, K. & R. Furness. 2001. Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide. *Chemosphere*. 44: 321-325.
- Long, E.R.D., D. MacDonald, S.L. Smith & F.D. Calder. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*. 19: 81-97.

- López-Rocha, J.A., B.P. Ceballos-Vázquez, F.A. García-Domínguez, M. Arellano-Martínez, M.T. Villalejo-Fuerte & A.K. Romo-Piñera. 2010. La pesquería de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Baja California Sur, México. *Hidrobiológica*. 20: 230-237.
- Lluch-Belda, D., M.E. Hernández-Rivas, R. Saldierna-Martínez & R. Guerrero-Caballero. 2000. Variabilidad de la temperatura superficial del mar en Bahía Magdalena, B.C.S. *Oceánides*. 15: 1-23.
- Lovley, D.R. 2000. Fe (III) and Mn (IV) reduction, 3-30. *In*: Lovley, D.R. (ed), *Environmental Microbe-Metal Interactions*. ASM Press, Washington, DC.
- Lowe, D. & R. Pipe. 1986. Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems. *Aquatic Toxicology*. 8: 265-272.
- Lucas, A. & P.G. Beninger. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 44: 187-200.
- Malathi, S. & S. Thippeswamy. 2011. Morphometry, length-weight and condition in *Parreysia corrugata* (Mullar 1774) (Bivalvia: Unionidae) from river Malthi in the Western Ghats, India. *International Journal of Biological Sciences*. 2: 43-52.
- Mann, R. 1988. Distribution of bivalve larvae at a frontal system in the James River, Virginia. *Marine ecology Progress Series*. 50: 29-44.
- Margolis, L., G.W. Esch, J.C. Holmes, A.M. Kuris & G.A. Schad. 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology*. 68: 131-133.
- Marigómez, I., M. Soto, M.P. Cajaraville, E. Angulo & L. Giamberini. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*. 56: 358-392.
- Mazik, K., N. Hitchman, V. Quintino, C.J. Taylor, J. Butterfield & M. Elliott. 2013. Sublethal effects of a chlorinated and heated effluent on the physiology of the mussel, *Mytilus edulis* L.: A reduction in fitness for survival?. *Marine Pollution Bulletin*. 77: 123-131.

- Mayrand, E., S. St-Jean & S. Courtenay. 2005. Haemocytes responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate?. *Aquaculture Research*. 36: 962-971.
- McDowell, J., B. Lancaster, D. Leavitt, P. Rantamaki & B. Ripley. 1999. The effects of lipophilic organic contaminants on reproductive physiology and disease processes in marine bivalves molluscs. *Limnology and Oceanography*. 44: 903-909.
- Méndez, L., L.M. Salas-Flores, A. Arreola-Lizarraga, S.T. Alvarez-Castañeda & B. Acosta. 2002. Heavy metals in clams from Guaymas Bay, Mexico. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 68: 217-223.
- Méndez, L., E. Palacios, B. Acosta, P. Monsalvo-Spencer & T. Álvarez-Castañeda. 2006. Heavy metals in the clam *Megapitaria squalida* collected from wild and phosphorite mine-impacted sites in Baja California, Mexico. *Biological Trace Element Research*. 110: 275-287.
- Mendoza-Arroyo, J.M. 2003. Reseña de "La compañía El Boleo: su impacto en la municipalidad de Mulegé 1885-1918" de Edith González Cruz Tzintzun. *Revista de Estudios Históricos*. 37: 272-276.
- Meng, F., Z. Wang, F. Cheng, X. Du, W. Fu, Q. Wang, X. Yi, X. Li & Y. Zhou. 2013. The assessment of environmental pollution along the coast of Beibu Gulf, northern South China Sea: An integrated biomarker approach in the clam *Meretrix meretrix*. *Marine Environmental Research*. 85: 64-75.
- Mercado-Silva, N. 2005. Condition index of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in Sapelo Island Georgia – Effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *Journal of Shellfish Research*. 24: 121-126.
- Morley, N.J., J.W. Lewis & D. Hoole. 2006. Pollutant-induced effects on immunological and physiological interactions in aquatic host-trematode systems: implications for parasite transmission. *Journal of Helminthology*. 80: 137-149.
- Morley, N.J. 2010. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. *Aquatic Toxicology*. 96: 27-36.
- Morley, N.J. & J.W. Lewis. 2013. Thermodynamics of cercarial development and emergence in trematodes. *Parasitology*. 140: 1211-1224.

- Mouritsen, K.N. & R. Poulin. 2010. Parasitism as a determinant of community structure on intertidal flats. *Marine Biology*. 157: 201-213.
- Mouneyrac, C., S. Linot, J. Amiard, C. Amiard-Triquet, I. Métrais, C. Durou, C. Minie & J. Pellerin. 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. *General and Comparative Endocrinology*. 157: 133-141.
- Müller, T., M. Czarnoleski, A. M. Labecka, A. Cichy, K. Zając & D. Dragosz-Kluska. 2015. Factors affecting trematode infection rates in freshwater mussels. *Hydrobiologia*. 742: 59-70.
- Muñoz-Barbosa, A. & M.A. Huerta-Díaz. 2013. Trace metal enrichments in nearshore sediments and accumulation in mussels (*Modiolus capax*) along the Eastern coast of Baja California, Mexico: Environmental status in 1995. *Marine Pollution Bulletin*. 77: 71-81.
- Muñoz, G., P. Torres, J. Valdés & A. Rodríguez. 2013. Spatio-temporal variation in the prevalence of trematodes in the bivalve *Perumytilus purpuratus*. *Acta Parasitologica*. 58: 155-166.
- Najle, R., M. Elissondo, S. Gentile, G. Vacarezza & H. Solana. 2000. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. *The Science of the Total Environment*. 247: 263-268.
- Neveeskaja, L.A. 2009. Principles of Systematics and the System of Bivalves. *Journal of Paleontology*. 43: 1-11.
- Newman, M.C. 2014. *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*. Fourth Edition. CRC Press. New York. 633 pp.
- Nicholson, S. 1999. Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viridis* (L.) transplanted to contaminated sites in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*. 39: 261-268.
- Nicholson, S. & P.K.S Lam. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*. 31: 121-132.

- Oehlmann, J. & U. Schulte-Oehlmann. 2002. Molluscs as bioindicators, 577-635 *En: Eds. Market, B.A., Breure, A.M. & H. Zechmeister Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier Science B.V.
- Oliva, M.E. 1992. Parasitic castration in *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda) due to an adult digenea, *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87: 37-42.
- Ortiz-Zarragoitia, M. & M.P. Cajaraville. 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 361-369.
- Ortiz-Zarragoitia, M. & M.P. Cajaraville. 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 693-701.
- Páez-Osuna, F., G. Izaguirre-Fierro, R.I. Godoy-Meza, F. González-Farías & J.I. Osuna-López. 1988. Metales pesados en cuatro especies de organismos filtradores de la región costera de Mazatlán: Técnicas de extracción y niveles de concentración. *Contaminación Ambiental*. 4: 33-41.
- Páez-Osuna, F. & C. Marmolejo-Rivas. 1990. Occurrence and seasonal variation of heavy metals in the oyster *Saccostrea iridescens*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 44: 129-134.
- Páez-Osuna, F., J.I. Osuna-López, G. Izaguirre-Fierro & H.M. Zazueta-Padilla. 1993. Heavy metals in clams from a subtropical coastal lagoon associated with an agricultural drainage basin. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 50: 915-921.
- Páez-Osuna, F. & C. Osuna-Martínez. 2011. Biomonitores de la contaminación costera con referencia a las costas mexicanas: una revisión sobre los organismos utilizados. *Hidrobiológica*. 21: 229-238.
- Páez-Osuna, F. & C. Osuna-Martínez. 2015. Bioavailability of cadmium, copper, mercury, lead, and zinc in subtropical coastal lagoons from the Southeast Gulf of California using mangrove oyster (*Crassostrea corteziensis* and *Crassostrea palmula*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 68: 305-316.

- Paillard, C., F. Le Roux & J.J. Borrego. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*. 17: 477-498.
- Pampanin, D.M., E. Volpato, I. Marangon & C. Nasci. 2005. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the Canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 140: 41-52.
- Park, J. & J. Lee. 2010. Ultrastructural changes in digestive gland and lipofuscin accumulation of the equilateral Venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae) on Tributyltin chloride (TBTCI) toxicity. *Korean Journal of Malacology*. 26: 63-78.
- Paul-Pont, I., X. de Montaudouin, P. González, F. Jude, N. Raymond, C. Paillard & M. Baudrimont. 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the introduced marine bivalve *Ruditapes philippinarum* in European populations. *Environmental Pollution*. 158: 3401-3410.
- Peig, J. & A.J. Green. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*. 118: 1883-1891.
- Peteiro, L.G., J.M. Babarro, U. Labarta & M.J. Fernández-Reiriz. 2006. Growth of *Mytilus galloprovincialis* after the *Prestige* oil spill. *ICES Journal of Marine Sciences*. 63: 1005-1013.
- Peters, E.C., P.P. Yevich, J.C. Harshbarger & G.E. Zaroogian. 1994. Comparative histology of gonadal neoplasms in marine bivalve molluscs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 20: 59-76.
- Phipps, D.A. 1981. Chemistry and biochemistry of trace metals in biological systems, 1-54. *En: Effect of heavy metal pollution on plants*. Springer Netherlands.
- Pipe, R.K., J.A. Coles, F. Carissan & K. Ramanathan. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 46: 43-54.
- Poleksic, V. & V. Mitrovic-Tutundzic. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution, 339-352 *In: R. Müller and R. Lloyd, editors. Sublethal*

- and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Poulin, R. 2006. Global warming and temperature mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*. 132: 143-151.
- Poulin, R. & K.N. Mouritsen. 2006. Climate changes, parasitism and the structure of intertidal ecosystems. *Journal of Helminthology*. 80: 183-191.
- Poutiers, J.M. 1995. Bivalvos, 100-222. *En*: Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter & V.H. Niem (Eds.) *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico 95 centrooriental*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Prinz, K., T.C. Kelly, R.M. O'Riordan & S.C. Culloty. 2010. Occurrence of macroparasites in four common intertidal molluscs on the south coast of Ireland. *Marine Biodiversity Records*. 3: 1-7.
- Puy-Azurmendi, E., M. Ortiz-Zarragoitia, M. Kuster, E. Martínez, M. Guillamón, C. Domínguez, T. Serrano, M. Barbero, M. López de Alda, J. Bayona, D. Barceló & M. Cajaraville. 2010. An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Marine Environmental Research*. 69: 63-66.
- Rainbow, P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 183-192.
- Ricker, W. 1975. *Computation and interpretation of biological statistics of fish populations*. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada. Department of the Environment Fisheries and Marine Service, Ottawa, Canada. 382 pp.
- Riosmena-Rodríguez, R., A. Talavera-Sáenz, B. Acosta-Vargas & S.C. Gardner. 2010. Heavy metals dynamics in seaweeds and seagrasses in Bahía Magdalena, B.C.S., México. *Journal of Applied Phycology*. 22: 283-291.
- Rodríguez de la Rúa, A., J.M. Arellano, M.L. González de Canales, J. Blasco & C. Sarasquete. 2005. Accumulation of copper and histopathological alterations in the oyster *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas*. 31: 455-466.

- Rodríguez-Figueroa, G.M. 2004. *Geoquímica de los oligoelementos, elementos mayores y elementos de las tierras raras, en los sedimentos marinos del distrito minero de Santa Rosalía, B.C.S., México*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 137 pp.
- Rodríguez-Figueroa, G.M., E. Shumilin & I. Sánchez-Rodríguez. 2009. Heavy metal pollution monitoring using the brown seaweed *Padina durvillaei* in the coastal zone of the Santa Rosalía mining region, Baja California Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology*. 21: 19-26.
- Roe, J.H. 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with antrone reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 212: 335-343.
- Roesijadi, G. & W.E. Robinson. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquatic Toxicology*. 102: 125-133.
- Roldán-Wong, N.T., A.K. Kidd, A.J. Marmolejo-Rodríguez, E. Shumilin, B.P. Ceballos-Vázquez & M. Arellano-Martínez. 2017. Bioaccumulation and biomagnification of potentially toxic elements in the octopus *Octopus hubbsorum* from the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. Online.
- Román, G.G., G. Martínez, G. García & L. Freites. 2001. Reproducción. 27-59. En: Maeda-Martínez, A.N. (ed.) *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Limusa Noriega editores, México, 501 pp.
- Romero-Gil J.M. 1991. *El Boleo, Santa Rosalía, Baja California Sur: un pueblo que se negó a morir, 1885-1954*. Universidad de Sonora. México. 434 p.
- Romo-Piñera, A.K., B.P. Ceballos-Vázquez, F. García-Domínguez & M. Arellano-Martínez. 2009. Unusual high frequency of hermaphroditism in the gonochoric bivalve *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Veneridae). *Journal of Shellfish Research*. 28: 785-789.
- Romo-Piñera, A.K. 2010. *Estrategia reproductiva de Megapitaria squalida (Sowerby, 1835) en dos zonas de Baja California Sur, México*. Tesis doctoral. CICIMAR-IPN. 107 pp.
- Ruelas-Inzunza, J.R. & F. Páez-Osuna. 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coastal environment (Southeast Gulf of California). *Environmental Pollution*. 107: 437-444.

- Ruelas-Inzunza, J. & F. Páez-Osuna. 2002. Distribution of Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in selected tissues of juvenile whales stranded in the SE Gulf of California (Mexico). *Environment International*. 28: 325-329.
- Ruelas-Inzunza, J., L.A. Soto & F. Páez-Osuna. 2003. Heavy-metal accumulation in the hydrothermal vent clam *Vesicomya gigas* from Guaymas basin, Gulf of California. *Deep-Sea Research I*. 50: 757-761.
- Ruelas-Inzunza, J., O. Escobar-Sánchez, J. Patrón-Gómez, X.G. Moreno-Sánchez, A. Murillo-Olmeda, M. Spanopoulos-Hernández & D. Corro-Espinosa. 2013. Mercury in muscle and liver of ten ray species from Northwest Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 77: 434-436.
- Ruiz, Y., P. Suarez, A. Alonso, E. Longo, A. Villaverde, & F. San Juan. 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: Pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environmental Pollution*. 159: 250-265.
- Ruiz, M., S. Darriba, R. Rodríguez & C. López. 2013. Histological survey of symbionts and other conditions of pod razor clam *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 112: 74-82.
- Ruiz, P., M. Ortiz-Zarragoitia, A. Orbea, S. Vingen, A. Hjelle, T. Baussant & M. Cajaraville. 2014. Short- and long-term responses and recovery of mussels *Mytilus edulis* exposed to heavy fuel oil no. 6 and styrene. *Ecotoxicology*. 23: 861-879.
- Rzymiski, P., P. Niedzielski, P. Klimaszuk & B. Poniedzialek. 2014. Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186: 3199-3212.
- Sacchi, A., C. Mouneyrac, C. Bolognesi, A. Sciutto, P. Roggieri, M. Fursi, G. M. Beone & E. Capri. 2013. Biomonitoring study of an estuarine ecosystem, the Sacca di Goro lagoon, using *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental Pollution*. 177: 82-89.
- SAGARPA. 2004. *Actualización de la Carta Nacional Pesquera y su anexo*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial. México), 1-112 pp.

- SAGARPA. 2006. *Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, 1-219 pp.
- Saghali, M., S. Hoseini, S. Hosseini & R. Baqraf. 2014. Determination of heavy metal (Zn, Pb, Cd and Cr) concentration in benthic fauna tissues collected from the Southeast Caspian Sea, Iran. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*. 92: 57-60.
- Sanders, M.J. 1966. Parasitic castration of the scallop *Pecten alba* (Tate) by a bucephalid trematode. *Nature*. 212: 307-310.
- Santamaría-del Ángel, E., S. Álvarez-Borrego, R. Millán-Nuñez & F.E Müller-Karger. 1999. Sobre el efecto débil de las surgencias de verano en la biomasa fitoplanctónica del Golfo de California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 49: 207-212.
- Sastry, A. 1979. Pelecypoda (Excluding Ostreidae), 113-292. *In: Giese, A. & J.Pearse (Eds.) Reproduction of marine invertebrates*. Academic Press, Nueva York.
- Schuldt, M. & L.I. Lunaschi. 1987. Apreciaciones acerca de la "castración parasitaria". *Anales de la Sociedad Científica Argentina*. 48: 29-37.
- Schweers, T., M. Wolff, V. Koch & F. Sinsel-Duarte. 2006. Population dynamics of *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) at Magdalena Bay, Baja California Sur, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 54: 1003-1017.
- Sheir, S.K., R.D. Handy & T.B. Henry. 2013. Effect of pollution history on immunological responses and organ histology in the marine mussel *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 701-716.
- Shumilin, E., G.M. Rodríguez-Figueroa, O. Morton-Bermea, E. Lounejeva-Baturina, E. Hernández & D. Rodríguez-Meza. 2000. Anomalous trace element composition of coastal sediments near the copper mining district of Santa Rosalía, Peninsula of Baja California, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 65: 261-268.
- Shumilin, E., V. Gordeev, G.M. Figueroa, L. Demina & K. Choumilina. 2011. Assessment of geochemical mobility of metals in surface sediments of the Santa

- Rosalía mining region, western Gulf of California. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 8-25.
- Shumilin, E., A. Jiménez-Illescas & S. López-López. 2013. Anthropogenic contamination of metals in sediments of the Santa Rosalía Harbor, Baja California Peninsula. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 90: 333-337.
- Siah, A., J. Pellerin, J.C. Amiard, E. Pelletier & L. Viglino. 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 135: 145-156.
- Simkiss, K. & M. Taylor. 1981. Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indices of pollution. *Aquatic Toxicology*. 1: 279-290.
- Singh, C. J., J. A. Vélez & M. C. Fajardo. 1991. Estudio poblacional de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby 1835) en Punta Coyote, Bahía de La Paz, B.C.S., México. *Ciencia Pesquera*. 8: 7-22.
- Smaoui-Damak, W., T. Rebai, B. Berthet & A. Hamza-Chaffai. 2006. Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 143: 252-261.
- Smolders, R., W. De Coen & R. Blust. 2005. Integrative measures of toxicant exposure in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization 3-18. *En: Ostrander, G. K. (Ed.). Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC Press, United States of America.
- Soto, M., J.M. Gil, I. Marigomez & E. Angulo. 1990. Histochemistry and elemental composition of the stomach cells in *Littorina littorea* (L.). *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 28: 239-248.
- Stegeman, J.J., M. Brouwer, R.T. DiGuilio, L. Ftrlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders & P.A. van Veld. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect, 235-335. *In: Eds. Huggett, R.J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. & H. L. Bergman Biomarkers:*

- Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Stentiford G.D. & S.W. Feist. 2005. First reported cases of intersex (ovotestis) in the flatfish species dab *Limanda limanda*: Dogger Bank, North Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 301: 307-310.
- Sures, B. 2008. Environmental parasitology. Interactions between parasites and pollutants in the aquatic environment. *Parasite*. 15: 434-438.
- Taskinen, J. & E.T. Valtonen. 1995. Age-, size-, and sex-specific infection of *Anodonta piscinalis* (Bivalvia: Unionidae) with *Rhipidocotyle fennica* (Digenea: Bucephalidae) and its influence on host reproduction. *Canadian Journal of Zoology*. 73: 887-897.
- Taskinen, J. 1998. Influence of trematode parasitism on the growth of a bivalve host in the field. *International Journal of Parasitology*. 28: 599-602.
- Taskinen, J. & M. Saarinen. 1999. Increased parasite abundance associated with reproductive maturity of the clam *Anodonta piscinalis*. *Journal of Parasitology*. 85: 588-591.
- Tay, K.L., S.J. Teh, K. Doe, K. Lee & P. Jackman. 2003. Histopathologic and histochemical biomarkers responses of Baltic clam, *Macoma balthica*, to contaminated Sydney harbour sediment, Nova Scotia, Canada. *Environmental Health Perspectives*. 111: 273-280.
- Terrazas-López, R., L. Arreola-Mendoza, F. Galván-Magaña, M. Anguiano-Zamora, S.B. Sujitha & M.P. Jonathan. 2016. Cadmium concentration in liver and muscle of silky shark (*Carcharhinus falciformis*) in the tip of Baja California, south, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 107: 389-392.
- Thieltges, D.W. 2006. Effect of infection by the metacercarial trematode *Renicola roscovita* on growth in intertidal blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*. 319: 129-134.
- Thieltges, D.W., M. Krakau, H. Andresen, S. Fottner & K. Reise. 2006. Macroparasites community in molluscs of a tidal basin in the Wadden Sea. *Helgoland Marine Research*. 60: 307-316.

- Thieltges, D. 2008. Effect of host size and temporal exposure on metacercarial infection levels in the intertidal cockle *Cerastoderma edule*. *Journal of the Marine Biological Association of UK*. 88: 613-616.
- Tlili, S., I. Métais, N. Ayache, H. Boussetta & C. Mouneyrac. 2011. Is the reproduction of *Donax trunculus* affected by their sites of origin contrasted by their levels of contamination? *Chemosphere*. 84: 1362-1370.
- Torres, M.A., M.P. Barros, S. Campos, E. Pinto, S. Rajami, T. Sayre & P. Colepicolo. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 1-15.
- Usheva, L.N., M.A. Vaschenko & V.B. Durkina. 2006. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from Southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*. 32: 166-172.
- Valderrama, K., M. Oliva, B. Campos & D. Brown. 2004. Parasitic castration of *Eurhomalea lenticularis* (Bivalvia: Veneridae) by a digenetic trematode: quantitative histological analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*. 59: 151-158.
- Valdez, F., M. Azevedo, M.D. Silva, M.A. Randi, C. Freire, H. Silva de Assis & C.A. Oliveira. 2007. Multibiomarker assessment of three brazilian estuaries using oyster as bioindicators. *Environmental Research*. 105: 350-363.
- Van der Oost, R., J. Beyer & N. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- Vaschenko, M.A., I.G. Syasina, P.M. Zhadan & L.A. Medvedeva. 1997. Reproductive function state of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* Jay from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Hydrobiologia*. 352: 231-240.
- Vaschenko, M.A., H.L. Hsieh & V. Radashevsky. 2013. Gonadal state of the oyster *Crassostrea angulata* cultivated in Taiwan. *Journal of Shellfish Research*. 32: 471-482.
- Vasanthi, L., P. Revathi, C. Arulvasu & N. Munuswamy. 2012. Biomarkers of metal toxicity and histology of *Perna viridis* from Ennore estuary, Chennai, south east coast of India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 84: 92-98.

- Vázquez, N., E. Bruno, F. Márquez, S. Van der Molen, C. Gilardoni & F. Cremonte. 2013. A histopathological survey of the razor clam *Ensis macha* (Pharidae) along the Patagonian Argentina coast. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112: 253-259.
- Villalba, A., S. G. Mourelle, M. J. Carballal & C. López. 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 31: 127-139.
- Villalejo-Fuerte, M., G. García-Melgar, R. Ochoa-Báez & A. García-Gasca. 1996. Ciclo reproductivo de *Megapitaria squalida*, (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Boletín Científico*. 4: 29-39.
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, B. P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiológica*. 10: 165-168.
- Voets, J., W. Talloen, T. de Tender, S. van Dongen, A. Covaci, R. Blust & L. Bervoets. 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology*. 79: 213-225.
- Volke-Sepúlveda T., G. Solórzano, A. Rosas, C. Izumikawa, G. Aguilar, J. Velasco & S. Flores. 2003. Remediación de sitios contaminados por metales provenientes de jales mineros en los distritos de El Triunfo-San Antonio y Santa Rosalía, Baja California, Sur. CENICA. INE. México, D. F., 37 pp.
- Walsh, K., R.H. Dunstan & R.N. Murdoch. 1995. Differential bioaccumulation of heavy metals and organopollutants in the soft tissue and Shell of marine gastropod, *Austrocochlea constricta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 28: 35-39.
- Wedepohl, K.H. 1995. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 59: 1217-1232.
- Weng, N. & W.X. Wang. 2015. Reproductive responses and detoxification of estuarine oyster *Crassostrea hongkongensis* under metal stress: A seasonal study. *Environmental Science & Technology*. 49: 3119-3127.

- Wilson, I.F. & V.S. Rocha. 1955. *Geology and mineral deposits of the Boleo copper district, Baja California, Mexico*. Washington: Geological Survey Professional Paper. US Government Printing Office. 134 pp.
- Winstead, J., A.K. Volety & S. Tolley. 2004. Parasitic and symbiotic fauna in oysters (*Crassostrea virginica*) collected from the Caloosahatchee River and estuary in Florida. *Journal of Shellfish Research*. 23: 831-840.
- Wolowicz, M., K. Smolarz & A. Sokolowski. 2005. Neoplasia in estuarine bivalves: effect of feeding behaviour and pollution in the Gulf of Gdansk (Baltic Sea, Poland), 165-182. *En: Dame, R.F., Olenin, S. (Eds.), Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems*. Springer, Berlin.
- Yee-Duarte, J.A., B.P. Ceballos-Vázquez, E. Shumilin, K. Kidd & M. Arellano-Martínez. 2017a. Evidence of health impairment in *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae) near the “hot spot” of a mining port, Gulf of California. *Hidrobiológica*. 27(3): 1-8.
- Yee-Duarte, J.A., B.P. Ceballos-Vázquez, E. Shumilin, K. Kidd & M. Arellano-Martínez. 2017b. Parasitic castration of chocolate clam *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) caused by trematode larvae. *Journal of Shellfish Research*. 36: 1-7.
- Yevich, P.P. & M. Barry. 1969. Ovarian tumors in the quahog *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 14: 266-267.
- Yurchenko, O. & M. Vaschenko. 2010. Morphology of spermatogenic and accessory cells in the mussel *Modiolus kurilensis* under environmental pollution. *Marine Environmental Research*. 70: 171-180
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3rd edition, Prentice Hall, Inc, New Jersey, USA. 662 pp.
- Zaroogian, G.E. & P. Yevich. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*. 37: 355-373.
- Zhou, Q., J. Zhang, J. Fu, J. Shi & G. Jiang. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. 606: 135-150.

## ANEXOS

### PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

#### PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. 2017. **EVIDENCE OF HEALTH IMPAIRMENT IN *Megapitaria squalida* (BIVALVIA: VENERIDAE) NEAR THE “HOT SPOT” OF A MINING PORT, GULF OF CALIFORNIA.** *Hidrobiológica*. 27(3): 1–8.

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. 2017. **PARASITIC CASTRATION OF CHOCOLATE CLAM *Megapitaria squalida* (SOWERBY, 1835) CAUSED BY TREMATODE LARVAE.** *Journal of Shellfish Research*. 36(3): 1–7.

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Camacho-Mondragón, M.A., Uría-Galicia, E. and Arellano-Martínez, M. **HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE GONAD OF *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) INHABITING A HEAVY METALS POLLUTED ENVIRONMENT.** *Journal of Aquatic Animal Health*. Sometido.

Yee-Duarte, J.A., Ceballos-Vázquez B.P., Shumilin, E., Kidd, K. and Arellano-Martínez, M. **GONADAL NEOPLASIA IN MALES OF CHOCOLATE CLAM *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) FROM A HEAVY METALS POLLUTED HARBOR.** *Journal of Invertebrate Pathology*. Sometido

Yee-Duarte, J.A., Barber, B.J., Ceballos-Vázquez, B.P., Camacho-Mongradón, M.A., Shumilin, E., Kidd, K.A. and Arellano-Martínez, M. **REPRODUCTIVE FAILURES AND ENERGY RESERVES OF *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) UNDER CHRONIC METAL STRESS.** En preparación.

#### PREMIOS Y DISTINCIONES:

Galardonado con el “Prêmio Parasitologia Geral – Prof. Aduino José G. de Araújo” por haber obtenido el **1er lugar como mejor ponencia oral** en el XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA – FLAP, celebrado en Salvador de Bahía, Brasil. Del 27 al 31 de octubre de 2015.

Obtención del **2do lugar como mejor ponencia** en la categoría de Histopatología, modalidad oral en el XXXVIII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGÍA Y III

CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA, llevado a cabo en Tulancingo, Hidalgo, México. Del 26 al 28 de octubre de 2016.

**PONENCIAS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES:**

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Choumiline, Evgueni; Rodríguez-Figueroa, Griselda Margarita; Arellano-Martínez, Marcial. 2014. **EFFECTO DE LA CONTAMINACION POR METALES PESADOS EN LA REPRODUCCIÓN DE LA ALMEJA CHOCOLATA (*Megapitaria squalida*), DEL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO.** XIV Semana de Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México. Del 22 al 26 de abril de 2014.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Rivera-Camacho, Alma Rosa. 2014. **PARÁSITOS EN LA GÓNADA DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (BIVALVIA: VENERIDAE).** Mollusca 2014: The meeting of the Americas de la Sociedad de Malacología de México (SMMAC), la Asociación Latinoamericana de Malacología (CLAMA), la American Malacological Society (AMS) y la Western Society of Malacologists (WSM). Ciudad de México, México. Del 22 al 27 de junio de 2014.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Rivera-Camacho, Alma Rosa. 2014. **HISTOPATOLOGÍA DE LA GLÁNDULA DIGESTIVA DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida*: EL CASO DE UN AMBIENTE CONTAMINADO.** XXXVII Congreso Nacional de Histología y 1er Congreso Iberoamericano de Histología. Cuernavaca, Morelos, México. Del 29 al 31 de octubre de 2014.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Choumiline, Evgueni; Rodríguez-Figueroa, Griselda Margarita; Arellano-Martínez, Marcial. 2015. **ALMEJAS Y METALES PESADOS: EL CASO DE UN ANTIGUO PUERTO MINERO DE B.C.S.** XV Semana de Posgrado en Baja California Sur. La Paz, B.C.S. México. Del 11 al 14 de mayo de 2015.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Choumiline, Evgueni; Arellano-Martínez, Marcial. 2015. **ÍNDICE DE CONDICIÓN Y RELACIONES PESO-LONGITUD DE LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* DEL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, B.C.S., MÉXICO.** XXII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Ensenada, Baja California, México. Del 22 al 25 de septiembre de 2015.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Evgueni, Shumilin; Kidd, Karen; Arellano-Martínez, Marcial. 2015. **FIRST RECORD OF TREMATODES IN GONADS OF *Megapitaria squalida* (BIVALVIA:**

**VENERIDAE) IN A MINING PORT.** XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia – SBP y XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología – FLAP. Salvador de Bahía, Brasil. Del 27 al 31 de octubre de 2015.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Choumiline, Evgueni; Rodríguez-Figueroa, Griselda Margarita; Arellano-Martínez, Marcial. 2016. **ANOMALÍAS HISTOLÓGICAS EN LA GÓNADA DE LA ALMEJA CHOCOLATA (*Megapitaria squalida*) DEL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, B.C.S.** XVI Semana de Posgrado en Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur, México. Del 17 al 20 de mayo de 2016.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Evgueni, Shumilin; Arellano-Martínez, Marcial; Rivera-Camacho, Alma Rosa; Kidd, Karen. 2016. **INFECTION INTENSITY BY TREMATODES IN *Megapitaria squalida* (BIVALVIA: VENERIDAE) AND ITS IMPACT ON THE REPRODUCTION.** 49th Western Society of Malacologists and 82nd American Malacological Society Annual Meeting. Ensenada, Baja California, México. Del 12 al 16 de junio de 2016.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Arellano-Martínez, Marcial; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Rivera-Camacho, Alma Rosa; Evgueni, Shumilin; Uría-Galicia, Esther; Kidd, Karen. 2016. **ANOMALÍAS HISTOLÓGICAS DE *Megapitaria squalida* (BIVALVIA: VENERIDAE) DE UN SITIO CONTAMINADO POR METALES PESADOS.** VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental – AMEQA. Ciudad de México, México. Del 1 al 5 de agosto de 2016.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Arellano-Martínez, Marcial; Evgueni, Shumilin; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Kidd, Karen. 2016. **NEOPLASIA GONADAL EN LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) DE UN PUERTO CONTAMINADO POR METALES PESADOS.** XXXVIII Congreso Nacional de Histología y III Congreso Iberoamericano de Histología. Tulancingo, Hidalgo, México. Del 26 al 28 de octubre de 2016.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Evgueni, Shumilin; Arellano-Martínez, Marcial. 2017. **SALUD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA CHOCOLATA (*Megapitaria squalida*) DEL PUERTO MINERO DE SANTA ROSALÍA, BCS, MÉXICO.** XVII Semana de Posgrado en Baja California Sur, México. Del 5 al 9 de junio de 2017.

Yee-Duarte, Josué Alonso; Ceballos-Vázquez, Bertha Patricia; Camacho-Mondragón, Marian Alejandra; Shumilin, Evgueni; Arellano-Martínez, Marcial. 2017. **REPRODUCTIVE IMPAIRMENT IN *Megapitaria squalida* (MOLLUSCA: BIVALVIA) INHABITING AN ANOMALOUS HEAVY METALS**

**ENVIRONMENT, GULF OF CALIFORNIA, MÉXICO.** XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular, IV Congreso Iberoamericano de Histología y VII International Congress of Histology and Tissue Engineering. Santiago de Compostela, España. Del 5 al 8 de septiembre de 2017.

**ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN:**

Estancia de investigación en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en la Central de Instrumentación de Microscopía y en el Departamento de Morfología. El objetivo principal de la estancia fue realizar análisis de ultraestructura de la ovogénesis y la espermatogénesis, así como el análisis de la glándula digestiva.