

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



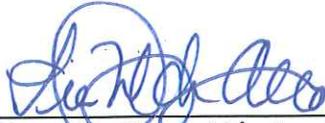
**Evaluación de la Síntesis de Metalotioneínas Inducidas
por Cadmio en la Almeja *Megapitaria squalida*
de Bahía La Paz, B.C.S.**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

CRISTINA ESCOBEDO FREGOSO

ENSENADA BAJA CFA, MEXICO SEPTIEMBRE DE 2006

TESIS DEFENDIDA POR
Cristina Escobedo Fregoso
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
Director del Comité



Dra. María Elena Solana Arellano
Miembro del Comité



Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del Comité



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Miembro del Comité



Dr. Juan Carlos Herguera García
*Coordinador del programa de
posgrado en Ecología Marina*



Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

20 de septiembre del 2006.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**"Evaluación de la síntesis de metalotioneinas inducidas
por cadmio en la almeja *Megapitaria squalida*
de Bahía La Paz, B.C.S."**

TESIS

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

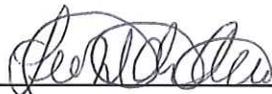
CRISTINA ESCOBEDO FREGOSO.

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2006.

RESUMEN de la tesis de **Cristina Escobedo Fregoso**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2006.

EVALUACIÓN DE LA SÍNTESIS DE METALOTIONEINAS INDUCIDAS POR CADMIO EN LA ALMEJA *Megapitaria squalida* DE BAHÍA LA PAZ. B.C.S.

Resumen aprobado por:



Dra. Lía C. Méndez Rodríguez.

Una de las principales fuentes de contaminación del medio acuático son los metales pesados. El cadmio es uno de los más tóxicos, dado que ocasiona daños fisiológicos, reproductivos y genotóxicos en los organismos. La síntesis de metalotioneinas (MT) tiene como función en los organismos, la detoxificación de metales tóxicos, así como la homeostasis de metales esenciales. En moluscos bivalvos el Cd es el principal inductor de metalotioneinas, se caracterizan por ser proteínas de bajo peso molecular (6 a 10 KDa), con un alto contenido de grupos sulfidrilo que forman complejos con metales pesados. Los depósitos naturales de fosforita son uno de los principales aportes de Cd en el norte de Bahía La Paz, B.C.S. En este sitio se han reportado altos niveles de Cd en la almeja chocolate *Megapitaria squalida*, la cual es consumida a nivel local. En el presente estudio se colectaron almejas *M. squalida* procedentes de Punta Coyote en Bahía La Paz, B.C.S., México. Se expusieron grupos de 3 organismos de 0.2 y 0.5 mg Cd/l durante 10, 20 y 30 días. La bioacumulación de Cd en branquias, glándula digestiva y nefridio fue analizada mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA). La cuantificación de MT se efectuó en HPLC, utilizando una columna supelcosil LC-318. El tiempo de retención de esta proteína fue a los 2.7 min, en la fracción 2.5-3 se obtuvieron los niveles más altos de Cd. Con electroforesis se detectó una proteína de bajo peso molecular (6,000 Da). Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que la exposición de *M. squalida* a concentraciones subletales de Cd, modifican la concentración de MT en branquias y glándula digestiva, obteniendo en este último órgano los mayores niveles de esta proteína. La bioacumulación de Cd en branquias se presentó a los 10 días de exposición, a diferencia de la glándula digestiva y el nefridio en donde se incrementaron los niveles del metal significativamente a los 20 y 30 días respectivamente. Adicionalmente se realizaron colectas de nueve almejas *M. squalida* en Punta Coyote, San Juan de la Costa, Quelele y Balandra, obteniendo un gradiente de MT en glándula digestiva>branquias>nefridio, siendo las almejas de Punta Coyote y Balandra las que presentaron altas concentraciones de MT. En glándula digestiva de organismos del Quelele se presentaron diferencias significativas de Cd, siendo en este sitio en donde se obtuvieron las menores concentraciones. Mediante la cuantificación de Cd total en tejido completo de 6 almejas colectadas en las 4 estaciones, se obtuvo bajo contenido de Cd en almejas de Balandra, tal como había sido reportado en la bibliografía.

Palabras claves: Cadmio, *Megapitaria squalida*, Metalotioneinas, Bahía La Paz, B.C.S.

ABSTRACT of the thesis presented by **Cristina Escobedo Fregoso** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2006.

EVALUATION OF SITHETYS OF METALLOTHIONEINS INDUCED BY CADMIUM IN CLAM *Megapitaria squalida* FROM LA PAZ BAY, B.C.S.

Heavy metals are a principal source of pollution in aquatic ecosystems. Cadmium is a toxic element that causes physiological, reproductive and genotoxic effects. Metallothionein (MT) play a role on essential metals homeostasis and protection against metal toxicity. Cadmium is the most inducer MT on bivalves organism. MT are low molecular weight proteins, binds metals, have a high cysteine content and sulfhydryls groups. A phosphorite bank is the principal natural source of cadmium at north of La Paz Bay, B.C.S. High cadmium levels has been reported on the clam *Megapitaria squalida*, consumed locality. A present study, clams *M. squalida* were collected from Punta Coyote, La Paz Bay . Groups of 3 organisms were exposed at 0.2 and 0.5 mg Cd/l per 10, 20 and 30 days. Cadmium bioaccumulation was analyzed in gills, digestive gland and kidney by atomic absorption spectrophotometric (SAA). An HPLC whit supelcosil LC-18 column was used to quantify MT, the retention time of these protein was at 2.7 min, found higher cadmium levels on fraction 2.5-3. A low molecular protein was detected by electrophoresis (6,000 Da). The results showed that MT concentrations were modified on gills and digestive gland after 10 days of sublethals expositions cadmium,. Higher MT level was found in digestive gland. Cadmium was bioaccumulated in gills after 10 days of exposure, a difference of digestive gland and kidney showed accumulation at 20 and 30 days respectively. Six clams *M. squalida* from Punta Coyote, San Juan de la Costa, Quelele and Balandra showed a cadmium decrease; digestive gland>gills>kidney. Punta Coyote and Balandra showed higher MT concentrations. significative differences were found on digestive gland of Quelele clams, showed a lower cadmium levels. Total cadmium was measure on six clams from 4 stations, seem that Balandra have a low contenido cadmium, like has been reported on bibliography.

Key works; Cadmium, *Megapitaria squalida*, metallothionein, La Paz Bay, B.C.S.

DEDICATORIA

A mi mamá, Carlota Fregoso N.

Por su amor, comprensión y enseñanza, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible, por ser tan maravillosa y darme una hermosa familia.

A mi papá, Jose R. Escobedo R.

Por su amor y tenacidad de inculcarme el seguir en este camino y por confiar en mi en todos estos momentos.

A mis hermanos

A Damián y Anahí Escobedo Fregoso.

Por todos los buenos momentos que pasamos juntos, por hacerme la vida tan divertida y por ser unas grandes personas.

A Raúl A. Llera Herrera.

Por ser parte de mi vida, por todo tu apoyo otorgado en las buenas y en las malas, por alentarme a seguir en este camino, pero sobre todo por el gran amor que te tengo.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Lia C. Méndez R. Por todo el apoyo y confianza otorgada para la realización de este trabajo. Lia gracias por tu amistad y por adoptarme durante mi estancia en La Paz.

A mis sinodales, Dra. Elena Solana, Dr. Ernesto García y Dr. Jorge Cáceres, les agradezco sus comentarios certeros y el apoyo para la elaboración de este trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta investigación.

Al proyecto P.C.2.2 del CIBNOR por su cooperación con esta investigación.

A los técnicos de CIBNOR, Pablito Mosalvo, que me ayudo a cuidar a mis almejas todos los días. A los técnicos Baudilio y Lilia por su paciencia y disponibilidad para realizar los análisis, a Gris y Rene por su ayuda.

Le agradezco a la Dra. Celia Vázquez B. por su disponibilidad para utilizar su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio que siempre me estuvieron apoyando y dando sus aportes para que este trabajo saliera bien, Juan Serrano, Mónica y a Nadia por su amistad. A los magistrales maestros y compañeros de laboratorio Poncho y Raúl, muchas gracias por guiarme en el camino del conocimiento y por sus tan acertadas aportaciones a este trabajo.

A mis amigas Claudia, Marcela y Melissa porque a pesar de la distancia siempre estan conmigo. A Miriam por ser una gran amiga. Aines por se una excelente compañera de casa.

A todos mis compañeros y amigos de maestria, por todos esos momentos felices que pasamos. A Franciso López R. por toda su ayuda. A mis amigos Canek y Bruce por su amistad.

A mi gran familia Fregoso por todo su cariño, consejos, apoyo, pero sobre todo por todos los momento felices que hacen que la vida sea alegre.

A mis abuelitos Carlota y Nicolas porque son un ejemplo a seguir, los quiero muchisimo. A las maravillosas Ely e Itari por su cariño y ocurrencias. A la familia Escobedo por apoyarme y preocuparse por mi.

A todos los que hicieron que mi estancia en La Paz, B.C.S. fuera divertida.

CONTENIDO	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	5
II.I. Aporte de metales al medio ambiente acuático.	5
II.II. Aporte de Cd.....	5
II.III. Cadmio en organismos acuáticos.....	6
II.IV. Toxicidad del Cd.....	7
II.V. Uso de MT como biomarcadores de contaminación por metales pesados.....	8
II.VI. Variaciones en las MT.	11
II.VII. Peso molecular de las Metalotioneinas.....	11
II.VIII. Bivalvos como bioindicadores de contaminación por metales.	12
II.IX. Órganos de acumulación de metales y síntesis de MT.	13
II.X. <i>Megapitaria squalida</i> como bioindicador de contaminación por Cd.....	15
III. HIPÓTESIS.	18
IV. OBJETIVO.	19
IV.I. Objetivo general.	19
IV.II. Objetivos específicos.	19
V. ÁREA DE ESTUDIO.....	20
VI. METODOLOGÍA.	23
VI.I. Obtención de la concentración letal media.	23
VI.II. Recolecta de organismos.....	24
VI.III. Biometría.	25
VI.IV. Purificación de la muestra.	25

CONTENIDO (continuación)	Página
VI.VI. Análisis del contenido de Cadmio.....	27
VI.VII. Cuantificación de proteínas solubles.....	29
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
VIII. RESULTADOS.....	32
VIII.I. Concentración letal media de Cd para <i>M. squalida</i>	32
VIII.II. Bioensayo.....	34
VIII.II.I. Análisis biométrico.....	34
VIII.II.II. Cuantificación de Metalotioneinas mediante HPLC.....	35
VIII.II.II.I. Condiciones Analíticas.....	35
VIII.II.II.II. Niveles de MT en organismos expuestos a Cd en función del tiempo.....	38
VIII.II.II.III. Niveles de MT en función a la concentración de exposición.....	38
VIII.II.II.IV. Distribución de MT entre los órganos analizados.....	42
VIII.II.III. Acumulación de Cd durante 30 días de exposición.....	43
VIII.II.IV. Acumulación de Cd en <i>M. squalida</i> expuesta a diferentes concentraciones de Cd.....	43
VIII.II.III.I. Bioacumulación de Cd entre órganos.....	45
VIII.III. Campo.....	46
VIII.III.I. Recolecta de organismos.....	46
VIII.III.III. Cadmio en organismos de Bahía La Paz.....	48
VIII.III.III.I. Distribución de Cd entre órganos.....	49
VIII.III.III.II. Cadmio total en organismos de Bahía La Paz.....	50
VIII.IV. Caracterización de proteínas de bajo peso molecular.....	50
IX. DISCUSIONES.....	52
IX.I. Concentración letal media.....	52
IX.II. Identificación de la MT en <i>M. squalida</i>	53

CONTENIDO(continuación)	Página
IX.III. Niveles basales de MT.....	54
IX.IV. Presencia de MT respecto al tiempo.....	55
IX.V. MT dependiendo de la concentración de exposición.....	56
IX.VI. Síntesis de MT entre órganos.	57
IX.VII. Acumulación de Cd en <i>M. squalida</i> en función al tiempo de exposición.....	58
IX.VIII. Acumulación de Cd en <i>M. squalida</i> en función al la concentración expuesta. ..	59
IX.IX. Acumulación de Cd entre órganos.	61
IX.XI. Cd en las almejas recolectadas en Bahía La Paz, B.C.S.	64
IX.XII. Concentraciones de Cd en el tejido completo.	66
IX.XIII. Relación entre MT y Cd.	67
X. CONCLUSIONES.....	70
XI. BIBLIOGRAFÍA.	72
XII. ANEXOS.....	80

Figura 1.- Dominio alfa y beta de la formación del complejo MT-metal (Otvos y Armitage, 1980, Dallinger <i>et al.</i> , 2001).	2
Figura 2.- Estaciones de muestreo localizadas dentro de Bahía La Paz, B.C.S.	22
Figura 3.- Porcentaje de mortalidad de la almeja <i>M. squalida</i> en función al tiempo de exposición a Cd a distintas concentraciones (0.1(□), 0.2(♦), 0.3(*), 0.5(▲), 0.7(○), 1(+), 2(Δ), 3(■), 6(◇) y Control(●)).	32
Figura 4.- LC ₅₀ (mg l ⁻¹ Cd) calculada para <i>M. Squalida</i> por el método probit.	33
Figura 5.-Cromatograma que muestra las diferencias entre longitudes de onda; 230nm (azul) y 280nm (roja) para muestras de glándula digestiva de <i>M. squalida</i> expuesta durante 10 días a 0.5 μg l ⁻¹ Cd, inyección de 5μl de muestra.	36
Figura 6.- Cromatograma (230 nm) para muestras expuestas durante 10 días a 0.5 μg l ⁻¹ Cd.	37
Figura 7.- Cromatograma de branquias de organismos control a 30 días.	39
Figura 8.-Cromatograma de branquias de organismos expuestos a 0.2 mg l ⁻¹ Cd durante 10 días.	39
Figura 9.- Cromatogramas de glándula digestiva de organismos control-10.	40
Figura 10.- Cromatogramas de glándula digestiva de organismos expuestos durante 10 días a 0.2 mg l ⁻¹ Cd.	41
Figura 11.- Cromatograma de glándula digestiva de organismos expuestos durante 10 días a 0.5 mg l ⁻¹ Cd.	41
Figura 12.- Concentración de MT (μg g ⁻¹ p.h.) en branquias, glándula digestiva y nefridio de <i>M. Squalida</i> expuestos a concentraciones de 0.2 y 0.5 mg l ⁻¹ Cd ⁻¹ durante 10, 20 y 30 días además del control (C). Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias por tratamiento para cada órgano.	42
Figura 13.- Concentración de Cd (media± error std.) en branquias, glándula digestiva y nefridio de <i>M. squalida</i> expuestos a concentraciones de 0.2 y 0.5 mg l ⁻¹ Cd ⁻¹ durante 10, 20 y 30 días además del control (C). Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias por tratamiento para cada órgano.	45
Figura 14.- Concentración de MT (μg g ⁻¹ p.h.) en branquias, glándula digestiva y nefridio de <i>M. Squalida</i> recolectadas (n=9 por estación) en cuatro estaciones dentro de Bahía La Paz, B.C.S. Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias por estación para cada órgano.	48
Figura 15.-Concentración de Cd en branquias, glándula digestiva y nefridio en cuatro sitios de muestreo dentro de Bahía La Paz, B.C.S. Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias por estación para cada órgano.	49

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Página

- Figura 16.- Electroforesis (SDS-PAGE) de izquierda a derecha se puede observar la banda de MT de hígado de conejo (STD), marcador de peso molecular (MPM), las dos columnas siguientes son muestras de glándula digestiva (G.D.) y la última es una muestra de branquias (BRA), las tres muestras son de organismos expuestos a 0.2 mg l⁻¹ Cd. Los pesos moleculares del MPM están en Da.51
- Figura 17.- Electroforesis (SDS-PAGE) de izquierda a derecha se puede observar la banda de MT de las muestras de glándula digestiva (20 µg de proteínas totales): 0.2-30, 0.2-20, MPM, control-30, 0.2-10, control-20, control-10 (concentración-días de exposición). Los pesos moleculares están en Da.51

LISTADO DE TABLAS

Página

Tabla I.- Biometría (promedio \pm desv. std) de almejas <i>M. Squalida</i> expuestas a diferentes concentraciones de cadmio durante diferentes tiempos de exposición (10, 20 y 30 días).....	35
Tabla II.-Área de los picos del cromatograma al correr el estándar de MT a diferentes concentraciones.....	35
Tabla III.- Parámetros ambientales de las estaciones de muestreo en Bahía La Paz, B.C.S. en abril del 2005.	46
Tabla IV.- Biometría (promedio \pm desv. std) de almejas colectadas en cuatro estaciones dentro de Bahía La Paz, B.C.S. en abril del 2005.....	46
Tabla V.- Concentración (media \pm error std.) de cadmio total ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el tejido completo (peso húmedo) de <i>Megapitaria squalida</i> (n=6 por estación) en los cuatro sitios de muestreo en Bahía La Paz,B.C.S. en abril del 2005.	50

I. INTRODUCCIÓN.

El cadmio es considerado el metal contaminante de mayor importancia en el ambiente marino por su alta toxicidad y biomagnificación a través de la red trófica. Su presencia puede ser detectada en agua, sedimento y organismos. La mayoría de los estudios para monitorear este tipo de contaminación utilizan moluscos bivalvos, debido a su naturaleza sedentaria y por ser filtroalimentadores, permiten reflejar la concentración de metales en el agua en determinado tiempo y representar el valor promedio de la disponibilidad biológica relativa de estos en una zona (Muñoz-Barbosa, 1997).

La exposición a este metal tanto en condiciones naturales como experimentales puede ocasionar disrupciones fisiológicas, modificación de la actividad enzimática (Geret *et al.*, 2002), daño genotóxico y desordenes reproductivos, (Vetillard y Bailhache, 2004). El Cd es concentrado principalmente por filtradores como son los bivalvos, siendo las branquias, glándula digestiva (Tanguy *et al.*, 2003, Boutet *et al.*, 2002) pie, manto (Serra *et al.*, 1995) y nefridio (Blackmore y Wang, 2004) en donde lleva a cabo la mayor acumulación. Estos organismos forman complejos metalotioneina-metal, los cuales se forman de acuerdo a su afinidad con el metal ($\text{Hg}^{+2} > \text{Ag}^{+1} \cong \text{Cu}^{+1} > \text{Cd}^{+2} > \text{Zn}^{+2}$). En bivalvos el Cd es el principal elemento que estimula la síntesis de Metalotioneinas (MT) (Dabrio *et al.*, 2002), en contraste con los mamíferos, el Zn estimula la mayor síntesis de MT (Palmiter, 1994).

Las MT son proteínas de bajo peso molecular, con alto contenido de grupos sulfidrilo provenientes de aminoácidos cisteínicos (20 grupos que forman parte de la estructura), sin

residuos aromáticos y caloríficamente estables (Roesijadi, 1992, 1996). Estas proteínas pueden contener hasta dos metales diferentes en su estructura, con capacidad de acomplejar siete átomos de metales divalentes. Su estructura esta compuesta por ligaduras de dominio α y β (Fig. 1), el dominio β se ubica en la terminación amino de la proteína (N-terminal) ligando tres átomos del metal (Me_3^{+2} , S_9) en la secuencia de los residuos 1 al 30, el dominio α se encuentra al final del grupo carboxílico (C-terminal) de los residuos 31 al 61 ligando cuatro iones metálicos (Me_4^{+2} , S_{11}) (Hidalgo *et al.*, 2001).

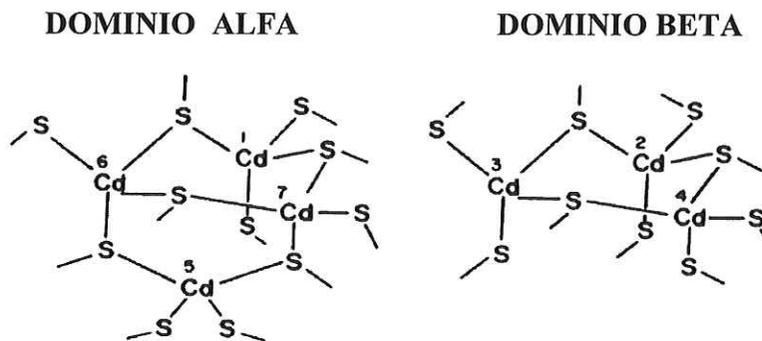


Figura 1.- Dominio alfa y beta de la formación del complejo MT-metal (Otvos y Armitage, 1980, Dallinger *et al.*, 2001).

A nivel celular, las MT se localizan principalmente en el citoplasma, lisosomas y en el núcleo (Roseijadi, 1992). Su función principal es la homeostasis de metales esenciales (Zn y Cu) y la detoxificación de metales no esenciales (Hg y Cd) (Klaassen *et al.*, 1999). Adicionalmente protegen de inmunotoxicidad, hematotoxicidad, nefrotoxicidad y son eficientes en la captura e inactivación de radicales hidroxilo, sugiriendo que los grupos tiol de las tioneinas pueden ser los responsables de la captura e inactivación de radicales libres. (Bordin, G., 2000).

Las técnicas para la cuantificación de MT se clasifican en métodos indirectos y directos. Los indirectos se basan en la determinación de metales unidos a MT asumiendo la saturación de la molécula con iones metálicos, entre ellos se encuentra la espectrofotometría de absorción atómica (EAA), espectrofotometría acoplada a masas (ICP-MS) y polarografía de pulsos diferenciales (DPP). Los métodos directos mas comunes son: electroforesis capilar (CE), inmunodetección (ELISA) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es una técnica rápida y sensible (Alhama *et al.* 2006).

Las MT han sido utilizadas como: biomarcadores de la exposición de metales en organismos acuáticos, indicadores específicos biológicos y como posibles “marcadores de precaución” para la detección de efectos nocivos causados por la exposición a metales (Olafson *et al.* 1979, Dabrio *et al.*, 2002, Tanguy *et al.*, 2003, Blackmore y Wang, 2004). Bebianno y Langston (1991) demuestran que la medición de metalotioneinas inducidas en mejillones es un método viable para determinar la respuesta biológica a la contaminación por metales. Además, han sido propuestas por la Comisión Europea para ser incluidas en programas de monitoreo ambiental como biomarcadores para la evaluación por contaminación de metales en ambientes acuáticos (Dabrio *et al.* 2002).

El vertido de agua de origen antropogénico con alto contenido de Cd provocado por la extracción de fósforo, y la presencia de bancos naturales de fosfórita con altos niveles de Cd localizados al noroeste de Bahía La Paz Baja California Sur, han generado concentraciones de Cd que sobrepasan el límite establecido por la norma mexicana NOM-

031-SSA1-1993 en almeja *Megapitaria squalida* (Méndez, *et al.*, 2006), siendo Punta Coyote y San Juan de La Costa en donde se presentan altos niveles de Cd.

La presencia de altos niveles de Cd en la almeja *M. squalida* que es el segundo molusco bivalvo de mayor abundancia en B.C.S., el cual es importante económicamente por su consumo local y nacional, propicia la búsqueda de una relación entre el contenido de Cd y la presencia de MT, con la finalidad de utilizar a las MT como biomarcador de respuesta biológica por exposición a Cd.

II. ANTECEDENTES.

II.I. Aporte de metales al medio ambiente acuático.

La contaminación en los océanos es un tema de preocupación internacional. El medio ambiente marino es afectado por la introducción de contaminantes provenientes de actividades humanas (agricultura, industria, transporte, crecimiento demográfico, etc.) y naturales (erupciones volcánicas, terremotos, huracanes, etc.).

Una de las principales fuentes de contaminación son los metales pesados. Su introducción al medio es por aportes naturales (actividad volcánica o erosión de rocas) y antropogénicos (colorantes, pesticidas, fungicidas, baterías de cadmio-níquel, industria de galvanizado, minera, eléctrica, farmacéutica y metalúrgica Olguín-Espinoza, 1989 y Romero Vargas, 1995). Los metales biodisponibles son clasificados como esenciales y no esenciales, los primeros son aquellos necesarios para el metabolismo, entre ellos se encuentran el Zn, Cu, Fe entre otros, y no esenciales son los que no tienen ninguna función biológica y pueden ser tóxicos, como el Cd, Hg y Pb (Ahearn *et al.*, 2000).

II.II. Aporte de Cd.

Aunque el Cd no se encuentra en estado puro en la naturaleza, es un constituyente natural de las rocas y depósitos fosfatados que son explotados para la obtención de fertilizantes (WHO, 1992). Se estima que las fuentes naturales y antropogénicas introducen al medio acuático 5,540 y 3,700 toneladas de Cd al año. El caso más grave de contaminación por

cadmio fué el que ocurrió en los años 50's, en la cuenca del río Jintsu cerca de la ciudad de Toyama, en donde una compañía minera y fundidora de Zn, Pb y Cd descargaba sus aguas residuales. Las personas de esta localidad ingirieron agua y arroz irrigado por el río contaminado, consumiendo durante varios años (Yamagata y Shigematsu, 1970) dosis de $600 \mu\text{g día}^{-1}$, provocándoles la enfermedad degenerativa de los huesos, por la cual se estima que murieron 100 personas hacia el final de 1965.

Actualmente la Norma Oficial Mexicana de la Salud NOM-031-SSA1-1993 establece como límite máximo para consumo humano una concentración de $0.5 \mu\text{g Cd g}^{-1}$, además, la Food and Drug Administration of the United States (USFDA, 2003) permite como máximo $4 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ peso seco en moluscos. El límite permisible según la Regulación Alimenticia de Malasia (1985) es de $1 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ peso húmedo, la Organización Mundial de la Salud permite niveles máximos de Cd de $2 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ peso húmedo o $11 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ peso seco en mejillones para consumo humano (Phillips, 1983).

II.III. Cadmio en organismos acuáticos.

El Cd puede entrar al organismo a través del integumento, branquias o intestino después de consumir alimento. Su eliminación puede realizarse a través de los mismos tejidos o por el riñón (variando entre especies). Los invertebrados poseen mecanismos de detoxificación celular con la que se reduce la toxicidad de metales bioacumulados. Estas rutas comprenden mecanismos fisiológicos reguladores de excreción de metales, mecanismos de

secuestación intracelular que implica sitios de alta afinidad para unir metales a proteínas de bajo peso molecular conocidas como metalotioneinas seguido de una eliminación a través del sistema de la endomembrana lisosomal. Otro mecanismo es la secuestación intracelular de metales en vacuolas específicas mediante la formación de gránulos de fosfatos o sulfuros que posteriormente son eliminados por exocitosis (Ahearn *et al.*, 2004).

II.IV. Toxicidad del Cd.

El Cd es un elemento tóxico para el ser humano ya sea inhalado o consumido en el alimento. La intoxicación por Cd esta asociada a la osteomalacia (ablandamiento de huesos) y osteoporosis. Este metal es acumulado en el cuerpo humano principalmente en el hígado y los riñones, teniendo una vida media de 16 a 33 años (Manaham, 1990). Observaciones histológicas indican que este elemento causa disrupciones funcionales en ciertas estructuras de la nefrona tales como: el retículo endoplásmico, mitocondrias, lisosomas y membrana celular, afectando también funciones de respiración, transporte y procesos bioquímicas que se llevan a cabo en el retículo endoplásmico. La citotoxicidad ocurre principalmente en los túbulos proximales y parcialmente causa daños en los glomérulos renales. Los daños en el riñón ocurren cuando la cantidad de Cd sobrepasa la habilidad de este órgano para formar complejos de metalotioneinas.

II.V. Uso de MT como biomarcadores de contaminación por metales pesados.

Dada la necesidad de obtener biomarcadores de contaminación, Margoshes y Vallee (1957) realizaron los primeros estudios con metalotioneinas aisladas de la corteza renal de equinos, identificándolas como proteínas capaces de acomplejar cadmio. El primer reporte de MT en organismos acuáticos fue realizado por Olafson y Thomson (1974) en el pez marino *Sebastes senoides*, continuando con investigaciones en moluscos como el mejillón *Mytilus edulis* (Noel-Lambot, 1976) y el ostión *Crassostrea virginica* (Casterline y Yip, 1975), en los 80's los principales estudios de MT en almejas se efectuaron en *Macoma balthica* (Johansson *et al.*, 1986), *Protothaca straminea* (Roseijadi *et al.*, 1980) y *Calpytogenia magnifica* (Roseijadi *et al.*, 1985), recientemente se ha estado trabajando en la almeja *Ruditapes decussatus* (Mouneyrac *et al.*, 1998). Actualmente estas proteínas han sido detectadas en el reino animal, plantas superiores, algas, microorganismos eucariotas y procariotas, constituyendo un grupo de proteínas ampliamente distribuidas en los organismos (Roesijadi, 1996).

La inducción de la síntesis de las MT en los diferentes órganos depende del metal y de los diferentes sistemas biológicos. Siendo el hígado en donde se inicia la síntesis de MT en vertebrados. Una fracción limitada del complejo MT-Cd ingresa a la circulación, posteriormente es filtrado a través de los glomérulos renales y reabsorbido en los túbulos proximales en donde se acumula gradualmente. El complejo MT-Cd es continuamente destruido por los lisosomas de las células tubulares y el cadmio libre induce nuevamente la síntesis renal de MT que se une al Cd y vuelve a ser degradada, siendo solamente una

fracción de Cd la que no forma este complejo que no es tóxico. Cuando las concentraciones de Cd exceden la capacidad de síntesis del complejo ocurre la toxicidad (Nordberg y Nordberg, 1988). Aunque no se conoce mucho sobre el mecanismo de formación del complejo MT-Cd en moluscos bivalvos, en estos organismos las branquias son la única entrada de metales que son distribuidos a todos los órganos a través de la hemolinfa, siendo finalmente almacenados en el nefridio (Leland y Kuwabara, 1985).

La variación de los niveles de MT puede estar influenciada por el contenido de metales, temperatura, salinidad, estado reproductivo, estado nutricional, edad/talla y tasa, velocidad y ritmo de crecimiento del organismo (Olsson *et al.* 1987). Por otra parte, el transporte y acumulación de las proteínas disponibles para el control de la concentración intracelular de iones metálicos varía según el grado de saturación del metal. La mayoría de estas proteínas son continuamente degradadas y sintetizadas a una tasa relativamente rápida; la vida media de las MT es de 5 días (variando de acuerdo al metal predominante en el tejido), aunque se ha reportado que para *Mytilus edulis* es de 25 días (Bebiano y Langston, 1993). La concentración típica de MT en *M. edulis* en sitios no contaminados es de 2-3 mg g⁻¹ peso seco y se incrementa hasta 9 mg g⁻¹ cuando el organismo es expuesto a 400 µg l⁻¹ Cd durante 30 días (Bebiano y Langston, 1991).

Una de las metodologías están siendo utilizadas para la identificación de MT es mediante el uso del HPLC, esta técnica ha sido empleada principalmente para caracterizar las isoformas de MT. Uno de los primeros estudios lo realizaron Klauser *et al.* (1983) caracterizando las isoformas de MT en riñón de caballo, posteriormente Bordin *et al.*

(1996) utilizando una columna Hi-Pore 318, reportan isometalotioneinas de hígado de conejo y riñón de caballo. Estudios recientes como el de Alhama *et al.* (2006) en donde utilizaron una columna Supelcosil C-18, obtuvieron mediante el HPLC-RP que la concentración de MT es 10 veces mayor a lo cuantificado con el método colorimétrico en glándula digestiva de almeja.

La contaminación de metales pesados en el ambiente marino en las costas de Europa, ha sido estudiado principalmente en la almeja *Ruditapes decussatus* por medio de las MT, siendo en glándula digestiva en donde se presenta la mayor concentración. Aunque el contenido de algunas proteínas es diferente entre hembras y machos, estos autores encontraron que en ambos sexos el contenido de MT es igual. (Serafim y Bebianno, 2001).

La mayor parte de la investigación orientada al uso de metalotioneinas como biomarcadores ha sido desarrollada en países, por lo que las especies utilizadas han sido las que se encuentran en ambientes marinos de aguas frías como es el caso del estudio de MT en *Mytilus edulis* del suroeste de Inglaterra (Bebianno y Langston, 1991), *M. galloprovincialis* y la almeja *Ruditapes decussatus* de las costas del Sur de Portugal, *Crassostrea gigas* colectadas en las costas de Francia (Mouneyrac *et al.* 1998), entre otros. La información relacionada a niveles de metalotioneinas en almejas de zonas cálidas como el noroeste mexicano es nula.

II.VI. Variaciones en las MT.

Las MT se clasifican en cuatro clases principales: la clase I comprende a las MT aisladas de los mamíferos. La clase II comprende a las MT con una secuencia de aminoácidos diferente a las presentada en mamíferos, además la distribución de los aminoácidos cisténicos es diferentes entre la clase I y II. Las MT de la clase I y II se caracterizan por ser proteínas de cadena sencilla, mientras que las MT de la clase III son polipéptidos formados por la repetición de 2 a 11 unidades de glutamil-cisteinil. Estas MT son estructuras oligoméricas formadas por 2 o mas cadenas polipeptídicas de longitud variable localizadas principalmente en el cerebro. Las MT IV se localizan en los tejidos córneos, tejidos estratificados y escamosos de la piel, en la lengua, en la parte superior del tracto digestivo y en la vagina (Kägi y Shäffer, 1989).

II.VII. Peso molecular de las Metalotioneinas.

Aunque en general se sabe que las MT son proteínas de bajo peso molecular (6,000-7,000 Da) (Klaassen *et al.*, 1999), este puede variar dependiendo de la especie y el tiempo de residencia en un ambiente dado, como en la almeja *Scapharca inaequivalis* en la cual se obtuvieron proteínas de 10,000 Da sugiriendo que pudieran ser proteínas ligadas a cadmio (Serra *et al.*, 1995). Otros estudios como el de Viarengo *et al.* (1981) reportan que el peso molecular de MT tanto en *Mytilus galloprovincialis* como en la almeja *Ruditapes decussatus* es de 7,400 Da. Mouneyrac *et al.* (1999) encontraron MT en *Crassostrea gigas*

con peso molecular de $\leq 20,000$ Da en organismos trasplantados a un sitio con alto contenido de Cd, y 420,000 Da en los nativos, sugiriendo que el peso molecular y la proporción del metal ligado a las MT se incrementa conforme aumenta el tiempo de exposición al metal.

II.VIII. Bivalvos como bioindicadores de contaminación por metales.

Los organismos utilizados como indicadores de cierto efecto ecológico son denominados "bioindicadores", siendo necesario que reúna ciertos aspectos: ser sedentario, fácil de identificar, abundante, tener larga vida, estar disponible para su colecta durante todo el año, tener suficiente tejido para el análisis, ser resistente al estrés causado por el manejo en laboratorio y/o transplatación en el campo. Por otro lado se debe analizar si existe una correlación entre la concentración de metales en el tejido blando y la concentración en el ambiente durante un periodo dado (Rainbow, 1995). Por su capacidad de bioacumular metales en el ambiente acuático, los bioindicadores que frecuentemente se han utilizado son: mejillones (*Mytilus* spp.), ostras (*Ostrea* spp. y *Crassostrea* spp.) y almejas (*Tapes* spp. *Ruditapes decussatus*). En particular los bivalvos poseen sistemas subcelulares de acumulación, regulación e inmovilización para los excedentes de metales tanto esenciales como no esenciales (homeostasis) y la formación de MT (Bebianno y Serafim, 1998).

Para evaluar el nivel de toxicidad de una sustancia química en organismos se realizan bioensayos de toxicidad, iniciando con pruebas subletales para posteriormente calcular la concentración letal media (LC_{50}), que corresponde a la concentración que causa la muerte

del 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado (generalmente, 48 o 96 horas) (Esclápes, 1999).

Las concentraciones letales medias que se han reportado en organismos expuestos a cloruro de cadmio son: 3 mg l⁻¹ para la almeja *Ruditapes decussatus* (Henry *et al.*, 1984), de 25 a 165 mg l⁻¹ para el mejillón *Mytilus edulis* expuesto de 48 a 96 horas en bioensayo estático (Eisler, 1971), aunque en bioensayos con flujo continuo la LC₅₀ para este mismo organismo es de 9.6 mg l⁻¹ (Nelson, 1988), concentraciones mas bajas (3.6 a 6.2 mg l⁻¹) se reportan para el mejillón *Mytilus galloprovincialis* en organismos adultos en bioensayos con recambio durante 30 días (Pavicic y Jarvenpaa, 1974).

II.IX. Órganos de acumulación de metales y síntesis de MT.

Algunos autores como Serra, *et al.* (1995) reportan que las branquias y el manto por ser los órganos que están en contacto directo con el agua, serán los primeros en ser afectados por la incorporación de los elementos presentes en el medio acuático.

Estos autores expusieron almejas (*Scapharca inaequivalvis*) a una concentración de 0.5 mg Cd l⁻¹ durante 28 días el gradiente entre tejidos fue: nefridio>manto>branquias>víceras. Posteriormente se observó que cuando a estos organismos eran mantenidos en acuarios sin adicionarles Cd, el gradiente de acumulación después de 30 días de no estar expuestos fue el mismo al gradiente de acumulación.

Bebiano y Serafim (1998) sugieren utilizar las branquias para el análisis de metalotioneinas, obteniendo que al comparar concentraciones de MT en la fracción citolítica (soluble) del homogenizado de branquias de *Mytilus galloprovincialis* y *Ruditapes decussatus* expuestos a concentraciones subletales de Cd de 0.1 mg l^{-1} el incremento de MT fue cuatro veces más en *M. galloprovincialis* que en la almeja *R. decussatus*. En este estudio al igual que otros realizados por Romeo y Gnassia-Barelli (1995) reportan que las branquias funcionan como sitio de contacto, acumulación de metales y generación de MT, aunque Bebianno *et. al.*, (1994) reportan que en los primeros 14 días de exposición a 0.1 mg l^{-1} de Cd la almeja *Ruditapes decussatus* presenta concentraciones iguales en la glándula digestiva y branquias. Después de este periodo la concentración aumenta en la glándula, indicando que el transporte de cadmio ocurre de las branquias a la glándula digestiva en donde es finalmente almacenado. Este tipo de organismos son capaces de sobrevivir a altas concentraciones de Cd puesto que tienen una alta capacidad de sintetizar MT que inhiben los efectos tóxicos de este elemento.

Geret *et al.*, (2002) encuentran que en el mejillón *M. edulis* y el ostión *C. gigas* después de 4 días de exposición a Cd no se presentan variaciones de síntesis de MT respecto a organismos control, siendo hasta el día 21 cuando la inducción de síntesis de MT se incrementa tanto en branquias como en la glándula digestiva de ambos bivalvos, demostrando que la exposición a concentraciones subletales a metales causa modificaciones en la concentración de proteínas, adicionalmente obtiene una disminución en los niveles de proteínas totales el cual es explicado por un decremento general de la actividad metabólica del organismo.

En un estudio realizado por Mouneyrac *et al.* (1998) en el ostión *Crassostrea gigas* recolectadas en tres sitios del estuario Gironde, Francia demuestran que la concentración de MT ligadas a Cd es significativamente mayor en la glándula digestiva que en las branquias. Además obtuvo una relación inversa entre el peso del organismo y la concentración de MT, lo cual coincide a lo encontrado en *Macoma balthica* y *Mytilus edulis* del estuario Ártico (Amiard-Triquet *et al.*, 1998) y contrastando con lo reportado para la lapa *Patella Vulgata*, concluyendo que los organismos mas grandes presentan la mayor concentración de MT (Nöel-Lambot *et al.*, 1980).

El mecanismos de detoxificación por medio de MT fue observado en organismos control, cuando los niveles de MT en el tejido completo de la almeja *Corbicula fluminea* disminuyeron durante los primeros 30 días, contrario a lo obtenido en las branquias y víceras de organismos expuestos a Cd observando una correlación entre el contenido de Cd y la concentración de MT (Budrimont *et al.*, 1997).

II.X. *Megapitaria squalida* como bioindicador de contaminación por Cd.

La almeja comúnmente conocida como "almeja chocolata" (*M. squalida*) tiene como peculiaridad la concha de color café claro o crema u ornamentada, es lisa y gruesa con aspecto a porcelana, con forma triangular alargada anteposteriormente e internamente es blanca con un tinte ligeramente violáceo (Baqueiro y Stuardo, 1997).

Se distribuye desde Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México, hasta Macora, Perú (Keen, 1971). Habita en fondos arenosos o lodosos a una profundidad entre 1 y 20 m. Alcanza densidades de 1 a 16 organismos por metro cuadrado. Tiene gran importancia económica puesto que es capturada para consumo a nivel nacional y local. En San Ignacio, El Comitán, El Bateque y en el complejo Bahía Magdalena-Almejas se encuentran bancos de explotación de la costa occidental, mientras que en el Golfo de California se captura en el límite de Santa Rosalía, Bahía de Santa Inés, Bahía Concepción, y en el área de Loreto, en las localidades conocidas como Notri, Juncalito, Ensenada Blanca y Lingui. Además se reportan capturas en Islas de San José, Espíritu Santo y en Bahía La Paz (SEPESCA, 1994). Esta especie se encuentra dentro de los pelecípodos más abundantes en Baja California Sur, aunque sufre de una explotación desmedida. Es principalmente utilizada para consumo humano, y en menor escala, su concha que es utilizada para manufactura de artesanías (Castro-Ortiz *et al.*, 1992).

La longitud de *M. squalida* que reporta Villalejo *et al.* (1991) en dos localidades de Bahía Concepción, B.C.S. es entre 6 y 8 cm, aunque se encontraron organismos con una talla máxima de 11 cm y mínima de 3.6 cm. La temporada de desove durante el periodo de 1988 a 1990 fue principalmente en los meses de abril a octubre con frecuencias máximas de junio a agosto; sin embargo, existen diferencias entre sitios, puesto que Baqueiro y Stuardo (1997) reportan que para Zihuatanejo ocurre en octubre y mayo, y en Bahía La Paz es de agosto a octubre (Singh *et al.*, 1991).

Estas diferencias en la producción de gametos en bivalvos está fuertemente influenciada por factores exógenos como la temperatura, fotoperíodo, disponibilidad de alimento, entre otros, además de factores endógenos genéticos u hormonales (Cruz y Villalobos, 1993), sugiriendo que el patrón del ciclo reproductivo de una especie en un área geográfica puede variar y las diferencias entre poblaciones pueden ser el resultado de respuestas fenotípicas a la disponibilidad de alimento y temperatura (Ropes, 1968). Baqueiro y Aldana-Aranda (2000) mencionan que las variaciones en los patrones de reproducción de la misma especie pueden estar asociadas a inestabilidades ambientales o variaciones en parámetros críticos con tendencia a optimizar los procesos reproductivos.

A pesar de que esta especie es de importancia comercial y es abundante en la región de Bahía La Paz, se conoce muy poco sobre su biología y es nulo el conocimiento acerca de la respuesta biológica tal como la síntesis de MT generada por la exposición de contaminación por metales tóxicos. Aunque en México generalmente se utiliza al mejillón para el análisis de metales pesados por ser un buen bioindicador de este tipo de contaminación, en el área de estudio no se distribuye este organismo. Por ello en este estudio se propone utilizar a la almeja *Megapitaria squalida* como especie sentinela para la evaluación de la síntesis de MT y evaluar si esta proteína es un buen biomarcador de contaminación por Cd.

III. HIPÓTESIS.

La exposición a Cd inducirá la síntesis de MT en branquias, glándula digestiva y nefridio de la almeja *M. squalida*.

Los niveles de Cd en Bahía la Paz, B.C.S. inducen MT en branquias, glándula digestiva y nefridio en la almeja *M. squalida*.

Existe una relación entre la concentración de Cd y el contenido de MT en branquias, glándula digestiva y nefridio de *M. squalida*.

IV. OBJETIVO.

IV.I. Objetivo general.

Evaluar la síntesis de metalotioneinas inducidas por cadmio en la almeja *Megapitaria squalida* de Bahía La Paz, B.C.S.

IV.II. Objetivos específicos.

1. Obtener la concentración letal media de *M. squalida* expuesta a Cd.
2. Analizar si existen diferencias en la concentración de MT en branquias, glándula digestiva y nefridio de *M. squalida* en función al tiempo de exposición a Cd.
3. Analizar si existe una relación entre la concentración de MT y el contenido de Cd en branquias, glándula digestiva y nefridio de *M. squalida* .
4. Analizar si existen diferencias en la concentración de MT en *M. squalida* entre los cuatro sitios de colecta en Bahía La Paz.
5. Evaluar la acumulación de Cd y síntesis de MT entre los órganos estudiados de la almeja *M. squalida* recolectadas de Bahía la Paz, B.C.S.
6. Caracterizar el peso molecular de la MT sintetizada por *M. squalida*.

V. ÁREA DE ESTUDIO.

Bahía La Paz esta ubicada en la zona suroriental de la península de Baja California, es considerada como el cuerpo de agua más grande del litoral Este de la península de Baja California con una superficie de aproximadamente 2,635 km². Se localiza entre los 24° 10' y 24° 47' N y los 110° 20' y 110°44' W. La temperatura promedio del agua de la Bahía de La Paz es de 24.7° con un intervalo de 20 a 29.5 °C. La Salinidad media del agua superficial es de 34.6 (Cruz *et al.*, 1989). A excepción de las escasas lluvias temporales que se presentan en verano, esta Bahía carece de una fuente de aporte constante de agua dulce. La precipitación promedio anual es de 210 mm con un periodo de lluvias de agosto a octubre, siendo septiembre el mes más lluvioso (Villaseñor-Casales, 1979).

Tanto la Bahía como la Ensenada de La Paz son cuerpos de agua que reciben el impacto de las descargas de la ciudad, plantas de Petróleos Mexicanos (PEMEX) y de la Comisión Federal de Electricidad, así como de la desaparecida empresa minera Roca Fosfórica Mexicana, S. A. de C. V., ubicada en el área de San Juan de la Costa que estuvo trabajando por un periodo de 25 años, la cual ha estado fuera de operación durante los últimos 5 años. La litología de este sitio esta conformada por la alternancia de areniscas tobaceas, lutitas silicificadas, fangositas, areniscas conglomeráticas y capas de fosforita intercaladas (Hausback, 1984).

Se obtuvieron almejas en cuatro sitios de Bahía La Paz B.C.S.: 1) Punta Coyote y 2) San Juan de La Costa que se encuentran ubicados al noroeste de la Bahía, 3) El Quelele,

ubicado en el Sur y 4) Balandra que se localiza en el Sureste de la Bahía (Fig. 2). Méndez *et. al.* (2006) reporta que el primer sitio es el mas contaminado con Cd, seguido de las estaciones 2 y 4, siendo la tercera estación la que tiene las menores concentraciones de este metal.

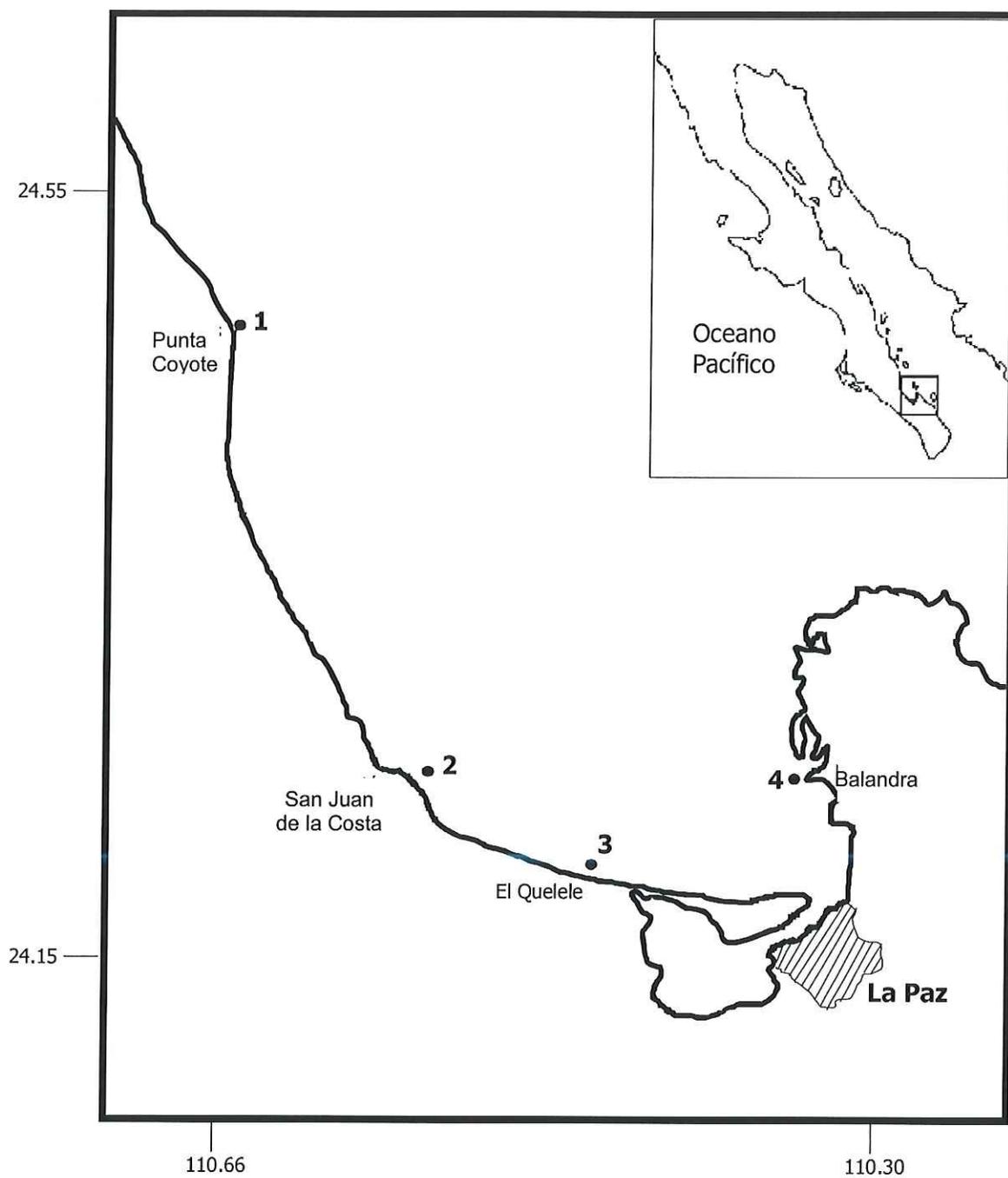


Figura 2.- Estaciones de muestreo localizadas dentro de Bahía La Paz, B.C.S.

VI. METODOLOGÍA.

VI.I. Obtención de la concentración letal media.

Con la finalidad de estimular la producción de MT, se determinaron concentraciones subletales de Cd. Para ello se obtuvo la concentración letal media (LC_{50}) de organismos procedentes de Punta Coyote. Antes del bioensayo los organismos fueron aclimatados durante una semana en agua de mar con aereación y a temperatura ambiente (20 ± 1.7), salinidad de 35 ± 1 y pH 7.7. Durante el bioensayo las almejas fueron alimentadas diariamente con *Isochrysis galbana* ($30,000 \text{ cel. ml}^{-1}$) en tanques de 30 L.

Para obtener la concentración letal media de *M. Squalida*, se expusieron grupos de 36 almejas a 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 1 mg l^{-1} Cd, al no obtener mortalidad a las 48 hrs. se aumentó la concentración a 2, 3 y 6 mg l^{-1} . Mediante el método probit se calculó la concentración letal media (LC_{50}), esta transformación probit resulta en un ajuste que logra normalizar los datos, generando una curva sigmoideal que al ser sometida a una transformación logarítmica, logra la linealización. El método consiste en convertir a Log_{10} las diferentes concentraciones de Cd a las cuales fueron expuestas las almejas, el número de organismos muertos durante 10 días (por tratamiento) es transformado a porcentaje de mortalidad (%M) para obtener de tablas los valores probit (válida para mortalidades entre el 1 y 99%), que son utilizados para elaborar una regresión lineal entre el valor probit y la concentración de exposición de Cd (Log_{10}), de la cual se obtiene la ecuación ($y=4.8036+2.4383*x$) para calcular la LC_{50} , en donde “y” es el porcentaje de mortalidad y “x” es $\log(LC)$.

Una vez obtenida la concentración letal media, se realizaron bioensayos para cuantificar la síntesis de metalotioneinas en función al tiempo de exposición a Cd. Para ello, dos grupos de almejas fueron expuestos, el primero a 0.2 y el segundo a 0.5 mg ml⁻¹ Cd, adicionalmente se mantuvo un grupo control (sin exposición a Cd). Cada grupo estuvo conformado por 12 organismos en unidades experimentales de 30 litros, realizando recambios de agua cada tercer día. La colecta de 3 organismos por grupo se llevo a cabo a los 10, 20 y 30 días de exposición, siendo mantenidos en congelación hasta su análisis.

VI.II. Recolecta de organismos.

La recolecta de organismos en los cuatro sitios de muestreo se realizó mediante buceo autónomo. Se recolectaron manualmente nueve organismos de talla comercial (6-8 cm). Las muestras fueron puestas en bolsas limpias de polietileno etiquetadas, se almacenaron en una hielera durante el transporte hacia el laboratorio y fueron congeladas a -20°C hasta su análisis. En cada sitio se midió: profundidad, oxígeno disuelto, salinidad, temperatura superficial y de fondo. Adicionalmente, en recipientes de plástico de 1 L se tomaron tres muestras de agua de fondo para cuantificar Cd, las cuales fueron conservadas con 1 ml de ácido nítrico concentrado.

VI.III. Biometría.

Se descongelaron organismos para obtener: ancho (a), largo (l) y alto (h) de la concha, peso húmedo total y peso húmedo del tejido (pt), una vez obtenida la biometría se retiró el tejido de la concha para su disección, recuperando en charolas de plástico las branquias, glándula digestiva y nefrídios, los cuales fueron pesados en una balanza analítica. Durante el procedimiento se mantuvieron los órganos en hielo para evitar la degradación de proteínas.

Para hacer comparaciones entre organismos fue necesario calcular si estos tienen la misma talla, para lo cual se utilizó el índice $I = (l + h + a) / pt$, propuesto por Méndez *et al.* (2002). Valores altos de este índice representan organismos de tallas chicas y viceversa, sugiriendo que cuando no hay diferencias estadísticas entre los índices, la edad de los organismos es la misma.

VI.IV. Purificación de la muestra.

El tejido se macero mediante un homogenizador manual (Potter) sumergido en hielo, se recuperó 0.5 g de branquias y glándula digestiva, y aproximadamente 0.1 g de nefridio en tres partes de amortiguador Tris-HCl (20 mM a pH 8.4) por una parte de tejido. El homogenado fué centrifugado durante 1 hr a 10,000 rpm a 4°C en una centrifuga Allegra 21 R con rotor Beckam F2402H. Se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf los cuales

fueron calentados a 80°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas de alto peso molecular, nuevamente se colectó y se centrifugó como anteriormente se mencionó (Bebianno y Serafim, 1998, Wolf *et al.*, 2000). Finalmente se recuperó la parte soluble y se mantuvo en congelación hasta el análisis de MT.

IV.V. Cuantificación de MT mediante HPLC.

Las proteínas del extracto fueron cuantificadas por medio de HPLC, es un método separa compuestos en base a sus características polares, saliendo primero las partículas hidrofílicas y al final las hidrofóbica. Se utilizó el HPLC-1100 (serie Agilet), estando compuesto por una bomba binaria, degasificador, automuestreador, compartimiento de columnas y detector de arreglo de diodos (DAD).

Una vez que el automuestreador inyecta el extracto (5 μ l), la bomba binaria automáticamente proporciona la fase móvil que esta conformada del solvente A (TFA 0.1% en agua desionizada, pH 3) y solvente B (TFA 0.1% en acetonitrilo) pasando al degasificador y posteriormente a la columna fase reversa (supelcosil LC-318 de 25 cm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno) con tamaño de partícula de 5 μ m, la presencia de las proteínas fue detectada por un DAD a longitudes de onda de 230 y 280 (modificación del método propuesto por Bordin, *et al.*, 1996 y Alhama *et al.*, 2006). El flujo se mantuvo constante (1 ml min⁻¹) y se recuperó cada fracción en tubos de vidrio mediante un colector automatizado (FRC-100 Pharmacia).

El gradiente con el cual se logró cuantificar la MT fue: de 0% de B en 10 min. seguido de 0 a 30% de B en 20 min. y de 30 a 35% de B en 5 min. para finalizar con un lavado de 100% de B en 5 min., al finalizar se equilibra y lava la columna automáticamente durante 5 minutos.

Para cuantificar la concentración de MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) de *M. squalida* se realizó una curva de calibración con MT pura de hígado de conejo (SIGMA-ALDRICH M7641) con 5.4% de Cd y 0.7% de Zn, posteriormente se integraron las áreas de los picos de los cromatogramas y se utilizó la ecuación obtenida en la curva de calibración ($y=13546x-17.17$, “y” área del pico, “x” concentración). Para determinar el pico de MT se compararon: los cromatogramas con el estándar, los cromatogramas del control con los extractos de los organismos inducidos y se verificaron todas las fracciones mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) para obtener la fracción con Cd, asumiendo que la fracción con Cd es en donde se encuentra la MT.

VI.VI. Análisis del contenido de Cadmio.

Para cuantificar el contenido de Cd en la muestra, primeramente se lavó toda la cristalería y los tubos de polietileno con jabón micro (SIP Brand MICRO, BAXTER DIGNORTIC, Inc), se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en ácido nítrico al 50% durante 3 días para eliminar posibles residuos de metales, finalmente el material se enjuagó con agua desionizada y se dejó secar.

El análisis de Cd se efectuó en el extracto que se utilizó antes de ser inyectado en el HPLC. La cuantificación de cadmio fue realizada mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (GBC Scientific equipment, modelo AVANTA, Dandenon, Australia) usando flama de aire-acetileno, se utilizó una lampara a una longitud de onda de 228 nm.

El análisis de Cd total (en toda la almeja) se realizó en 6 organismos por estación, se homogenizó el organismo completo en un homogenizador Ultra Turrax a 7,000 rpm durante 15 minutos. Para obtener el peso seco del homogenizado se secó en una estufa (Precision Scientific 18EM) a 70°C durante 5 días. La digestión fue realizada por 2 métodos: (1) A 0.5 g de tejido seco se le adicionaron y 5 ml de ácido nítrico concentrado expuestos sobre parrillas, una vez realizada la digestión se aforó a 50 ml, (2) Se realizó en un horno de microondas (CEM modelo Mars 5X, Matthews, NC), programado para controlarse por rampa de presión según las siguientes condiciones: 1200 W de potencia máxima, 80% de potencia, 20 min. de rampa, 20 psi y 210 °C durante 10 minutos.

Finalmente las muestras fueron leídas en EAA, los datos absorbancia fueron transformados a concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) de acuerdo con la ecuación de la curva estándar. Las concentraciones realizadas para la curva de calibración fueron: 0.5, 0.250, 0.125, 0.0625 mg l^{-1} . Se utilizaron estándares certificados por el National Research Council of Canada (estándar TORT-2 de hepatopáncreas de langosta).

Las muestras de agua de mar recolectadas en los cuatro sitios de muestreo fueron analizadas directamente en el EAA anteriormente mencionado.

VI.VII. Cuantificación de proteínas solubles.

Se utilizó el método Bradford (1976) para cuantificar proteínas totales solubles de cada muestra (PTS), se realizaron diferentes diluciones del extracto (1:1000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:50), en una microplaca (NUNC- F) se agregaron 25 μ l de la dilución y 200 μ l de comassie (diluido, 1:4), 15 minutos posteriores a la adición de comassie se efectuaron lecturas con lector de microplaca a 595 nm.

La curva estándar fue elaborada con suero de albúmina bovina (BSA) a concentraciones de 5 a 160 μ g ml⁻¹. Tanto la curva como las muestras se realizaron por triplicado, además de contar con seis blancos (25 μ l agua destilada y 200 μ l de Commassie).

VI.VIII. Caracterización del peso molecular de la MT.

Para corroborar la presencia de MT tanto en los extractos como en las fracciones obtenidas mediante HPLC, se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 16.5% (acrilamida:bisacrilamida, 37:1). Los geles fueron elaborados con: 5 ml de acrilamida y bisacrilamida (30%), Tris (3M, 0.3% de SDS), 3.4 ml de agua destilada, 1.5 ml de glicerol, 150 μ l de persulfato de amonio al 10% (APS) y 10 μ l de TEMED, el gel de separación al 4% se elaboró con 266 μ l de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 37:1), 333 μ l ml de Tris (3M, 0.3% de SDS), 2.230 ml de agua destilada, 30 μ l de APS al 10% y 5 μ l de TEMED (Laemmli, 1970).

Las muestras de extracto se sometieron a 90° C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas, posteriormente nueve carriles fueron cargados con 25 µl de muestra mas 25 µl de buffer de cargado desnaturalizante (Laemmli 1970), además un carril fue cargado con un marcador de peso molecular de bajo rango (1,060-26,000, SIGMA).

Una vez cargado el gel se le agrega el amortiguador de ánodo (Tris 0.2 M, pH 8.9 y amortiguador del cátodo (tris 0.1 M, tricina 0.1 M, SDS 0.1%; pH de 8.25), se corre el gel a 30 mA a 5°C (amperaje constante) hasta que el indicador de bromofenol llegue al final del gel, posteriormente el gel se tiñe con azul de coomassie durante 45 min. y se destiñe durante 12 hrs con una solución que contiene 20% de acetona y 15% de ácido acético. Para los geles que contenían bajas concentraciones de proteínas se utilizó tinción con plata.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Debido a que los datos no cumplieron con los requisitos para realizar análisis estadístico paramétrico, se efectuaron análisis no paramétricos (Mann Whitney). Los resultados obtenidos permiten determinar las diferencias estadísticas en la inducción de la síntesis de metalotioneinas con respecto a la concentración de cadmio en los bioensayos, y con respecto a los sitios de muestreo durante la fase de campo. Se utilizó el programa de cómputo STATISTICA 7.

VIII. RESULTADOS.

VIII.I. Concentración letal media de Cd para *M. squalida*.

Las concentraciones de exposición a Cd utilizadas en el bioensayo para obtener la LC₅₀ de la almeja *M. squalida* fueron; 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 3 y 6 mg Cd⁻¹ l⁻¹ (Fig. 3), observando que la mortalidad se incrementó notablemente durante los primeros 10 días en organismos expuestos desde 0.7 hasta 0.6 mg l⁻¹, presentando mortalidades mayores al 50% a exposiciones de 2, 3 y 6 mg l⁻¹.

Para calcular la LC₅₀ por medio del método probit, no se utilizaron los datos de mortalidad de organismos expuestos a 3 y 6 mg l⁻¹, porque el supuesto del método probit no permite concentraciones que hayan causado el 100% de mortalidad, utilizando únicamente los datos de mortalidad causados por exposiciones de 0.1 a 2 mg l⁻¹ Cd.

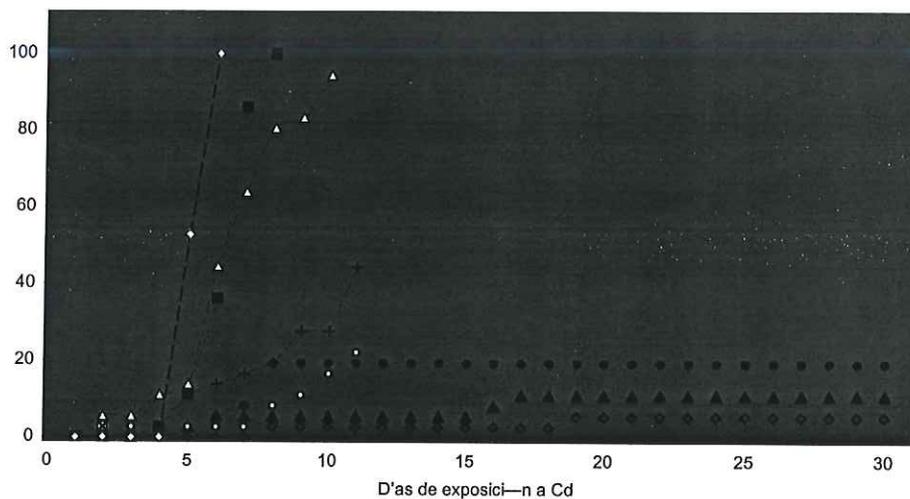


Figura 2.- Porcentaje de mortalidad de la almeja *M. squalida* en función al tiempo de exposición a Cd a distintas concentraciones (0.1(□), 0.2(◆), 0.3(*), 0.5(▲), 0.7(○), 1(+), 2(Δ), 3(■), 6(◇) y Control(●)).

Al realizar la regresión lineal entre el valor probit y el Log_{10} de la concentración de Cd mg l^{-1} se obtuvo la ecuación: $y=4.8036+2.4383(x)$, $R^2=0.74$, en donde (y) es el porcentaje de mortalidad, siendo 5 el valor medio de mortalidad (50% de mortalidad) y (x) es el Log_{10} de la concentración de Cd (mg l^{-1}), con ello se calculó la concentración de Cd necesaria para causar cierta mortalidad, obteniendo para *M. Squalida* una LC_{50} de 1.20 mg l^{-1} Cd (Fig. 4).

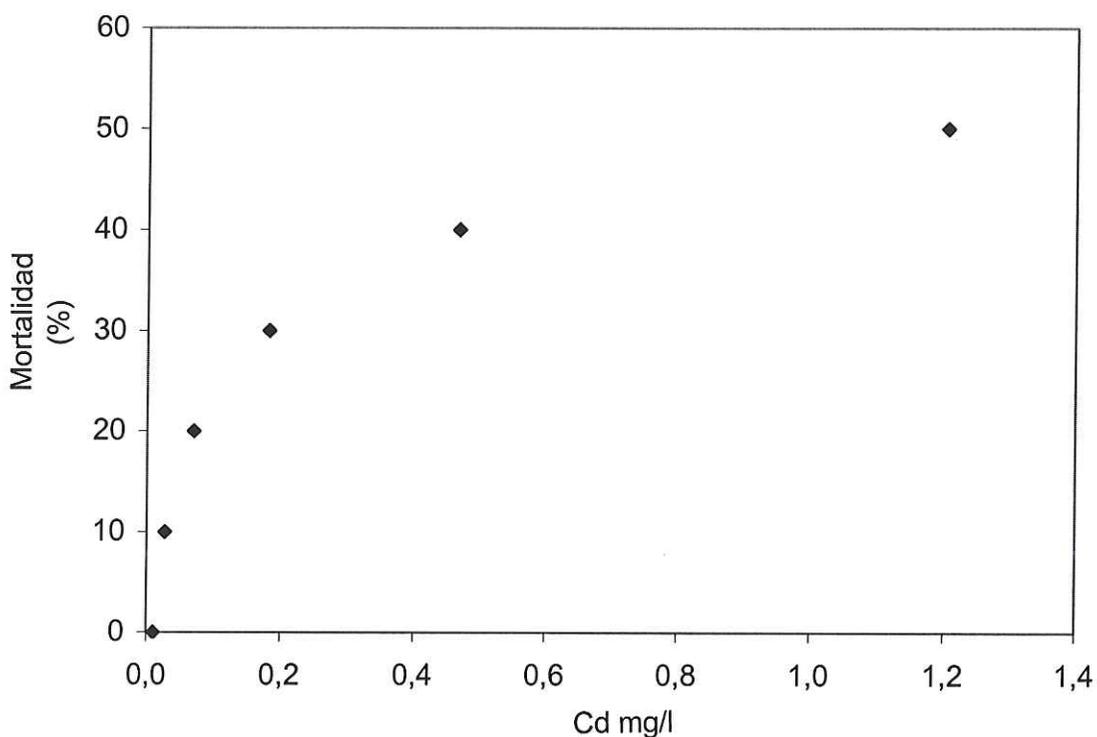


Figura 4.- LC_{50} (mg l^{-1} Cd) calculada para *M. Squalida* por el método probit.

Una vez conocida la LC_{50} para la almeja *M. Squalida* y con los resultados obtenidos de los bioensayos (Fig.4) en los que se observó que a concentraciones de Cd mayores de 0.5 mg l^{-1} el porcentaje de mortalidad es muy alto para exponer a los organismos durante 30 días, se

decidió hacer bioensayos utilizando 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ de Cd, siendo 0.2 mg l⁻¹ Cd el límite máximo permisible de descarga en aguas nacionales de acuerdo a la NOM-SEMARNAT-001-1996. Durante el bioensayo el oxígeno se mantuvo entre 6.4 y 6.6 mg l⁻¹, la temperatura de 20.9 a 21.9°C, la salinidad 35‰, y el pH 7.6-7.9.

A las concentraciones a las que fueron expuestos los organismos se podía pronosticar mediante el método probit que el %M sería entre el 30 y 40% , sin embargo, al final del bioensayo (día 30) el %M fue de 2.3 en el control y de 0.7 y 1.3% en los tratamientos con 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ de Cd respectivamente. Los días en que se presentó mortalidad fueron: los días 7 y 8 en el control, 8 y 19 en organismos expuestos a 0.2 mg l⁻¹ y 4, 6, 16 y 17 en los expuestos a 0.5 mg l⁻¹.

VIII.II. Bioensayo.

VIII.II.I. Análisis biométrico.

Los datos biométricos de las almejas utilizadas en los bioensayos para evaluar la estimulación de la síntesis de metalotioneinas dependiendo de la concentración de cadmio en el medio se presentan en la Tabla I, obteniendo mediante el índice propuesto por Mendéz *et al.*, (2002); que todos los organismos utilizados en el bioensayo son proporcionalmente iguales.

Tabla I.- Biometría (promedio \pm desv. std) de almejas *M. Squalida* expuestas a diferentes concentraciones de cadmio durante diferentes tiempos de exposición (10, 20 y 30 días).

Tratamiento	C-10	0.2-10	0.5-10	C-20	0.2-20	0.5-20	C-30	0.2-30	0.5-30
Peso total (gr)	81 ^a ± 6.08	110.67 ^{ab} ± 11.93	110 ^{ab} ± 19.29	129 ^b ± 4.58	106.67 ^{ab} ± 7.51	114.67 ^{ab} ± 3.78	116.38 ^{ab} ± 8.37	107.29 ^{ab} ± 17.58	111.65 ^{ab} ± 21.21
Largo (mm)	68.69 ^a ± 3.05	73.64 ^{ab} ± 2.39	74.12 ^{ab} ± 2.49	80.25 ^b ± 0.75	75.81 ^{ab} ± 0.72	75.24 ^{ab} ± 1.05	74.90 ^{ab} ± 1.38	73.64 ^{ab} ± 4.94	77.37 ^b ± 4.99
Ancho (mm)	56.23 ^a ± 2.44	60.68 ^{ab} ± 1.75	65.92 ^b ± 4.18	66.78 ^b ± 3.07	64.2 ^{ab} ± 3.55	64.24 ^{ab} ± 0.96	64.34 ^{ab} ± 1.65	63.46 ^{ab} ± 5.25	63.01 ^{ab} ± 2.97
Alto (mm)	34.79 ± 1.02	37.78 ± 0.30	37.06 ± 2.09	38.09 ± 0.70	36.30 ± 1.76	36.47 ± 0.30	36.98 ± 1.23	36.40 ± 1.63	36.59 ± 2.05
Peso tejido (gr)	24.00 ± 1.73	31.00 ± 20.88	31.33 ± 14.22	38.67 ± 3.79	25.67 ± 11.37	39.73 ± 4.03	35.42 ± 3.25	31.80 ± 10.06	28.99 ± 8.36
Índice	6.67 ± 0.48	10.67 ± 11.43	6.99 ± 4.44	4.82 ± 0.52	8.33 ± 4.99	4.45 ± 0.40	5.00 ± 0.41	5.75 ± 1.41	6.37 ± 1.40

C= control, 0.2 y 0.5 = 0.2, 0.5 mg l⁻¹ Cd a los cuales fueron expuestos durante 10, 20 y 30 días. Diferencia de letras indican diferencias estadísticas ($p < .05$)

VIII.II.II. Cuantificación de Metalotioneinas mediante HPLC.

VIII.II.II.I. Condiciones Analíticas.

Las metalotioneinas fueron cuantificadas por cromatografía líquida, empleando una curva de calibración elaborada a partir de un estándar de MT de hígado de conejo (Tabla II), el tiempo de retención fue entre los 18 y 19 minutos

Tabla II.- Área de los picos del cromatograma al correr el estándar .

Concentración mg ml ⁻¹	Área
0.0055	57.79
0.0110	131.45
0.0165	204.85
0.0220	282.68
0.0330	429.40

Con los resultados presentados en la tabla II se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 13546x - 17.17 \quad R^2 = 0.9999$$

La fórmula empleada para obtener la concentración de metalotioneinas en una muestra la fue: $X = (y + 17.17)/13546$, en donde: $Y = \text{Área}$, $X = \text{Concentración}$.

Las longitudes de onda que se utilizaron para la detección de MT fueron a 230 y 280 nm (Fig. 5). Obteniendo en el cromatograma una mejor señal a 230 nm, este resultado dió la pauta para llevar a cabo la integración del pico de MT detectado a esta longitud de onda.

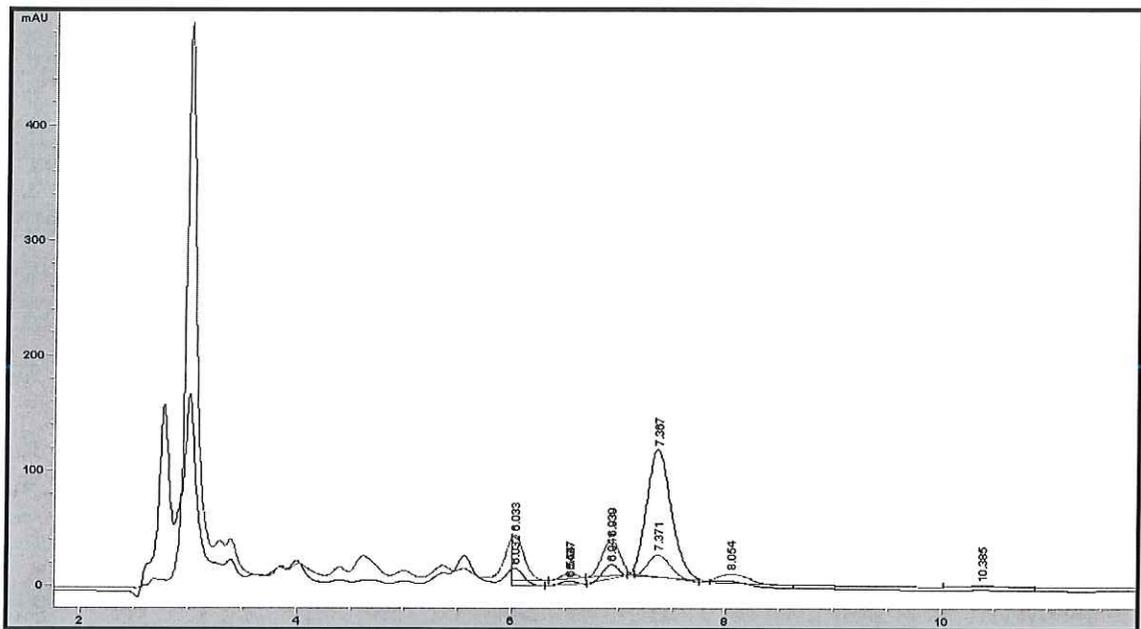


Figura 5.-Cromatograma que muestra las diferencias entre longitudes de onda; 230nm (azul) y 280nm (roja) para muestras de glándula digestiva de *M. squalida* expuesta durante 10 días a $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd, inyección de $5\mu\text{l}$ de muestra.

La presencia de MT fue detectada en la fracción que corresponde al minuto 2.7 (Fig.6), a una longitud de onda de 230 nm. En este tiempo de retención también se registró contenido de Cd por medio del Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA). En los tres órganos se obtuvo la presencia de MT en la misma fracción (mismo tiempo de retención) del cromatograma.

Adicionalmente se evaluó la magnitud de la señal relacionada con la concentración de MT al inyectar en el HPLC 5 μl y 50 μl del extracto. Se observó que no existe una relación lineal entre la cantidad de estándar y el área de la curva, esto es, no se incrementa la concentración 10 veces mas cuando se inyectan 50 μl . Al probar que sucedía al inyectar 100 μl se observó que la capacidad de la columna disminuía, por ello se realizaron los análisis de MT con los resultados generados al inyectar 5 μl .

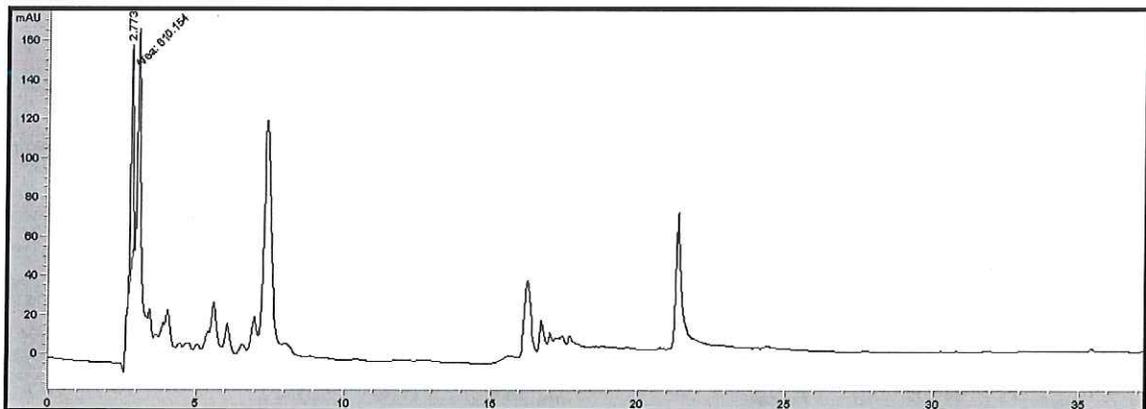


Figura 6.- Cromatograma (230 nm) para muestras expuestas durante 10 días a $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd.

VIII.II.II.II. Niveles de MT en organismos expuestos a Cd en función del tiempo.

El análisis de Cd en las fracciones colectadas (fracción 1 a 30) del HPLC, arrojó resultados positivos en las fracciones 3, 5 y 28, sin embargo, los resultados de MT presentados en este escrito se realizaron con la fracción del minuto dos al tres (fracción 3), esto se debe a que en las fracciones 5 y 28 del cromatograma no se obtuvieron picos confiables (alto y ancho requerido).

Los cromatogramas de glándulas digestivas mostraron un claro aumento en el área del pico al minuto 2.7 tanto del organismo expuesto a 0.2 como en el expuesto a 0.5 mg l⁻¹ Cd⁻¹ con respecto a los organismos controles. La mayor concentración de MT se presentó a los 10 días de exposición, obteniendo un aumento en branquias del 50% y 3% en organismos expuestos a 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ respectivamente, a diferencia de la glándula digestiva que sintetizó 53% y 60% para las mismas concentraciones.

VIII.II.II.III. Niveles de MT en función a la concentración de exposición.

Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que la exposición de *M. squaleda* a concentraciones subletales de Cd, modifica la concentración de MT en branquias y glándula digestiva. Estas diferencias ($p < .05$) fueron significativas (Fig. 7 y 8) entre branquias de organismos control del día 30 (6.8 ± 1.5) respecto a los expuestos a 0.2 mg l⁻¹ Cd durante 10 días (18.1 ± 2.6), indicando que cuando la almeja esta expuesta a un aumento de Cd, la síntesis de MT se incrementa.

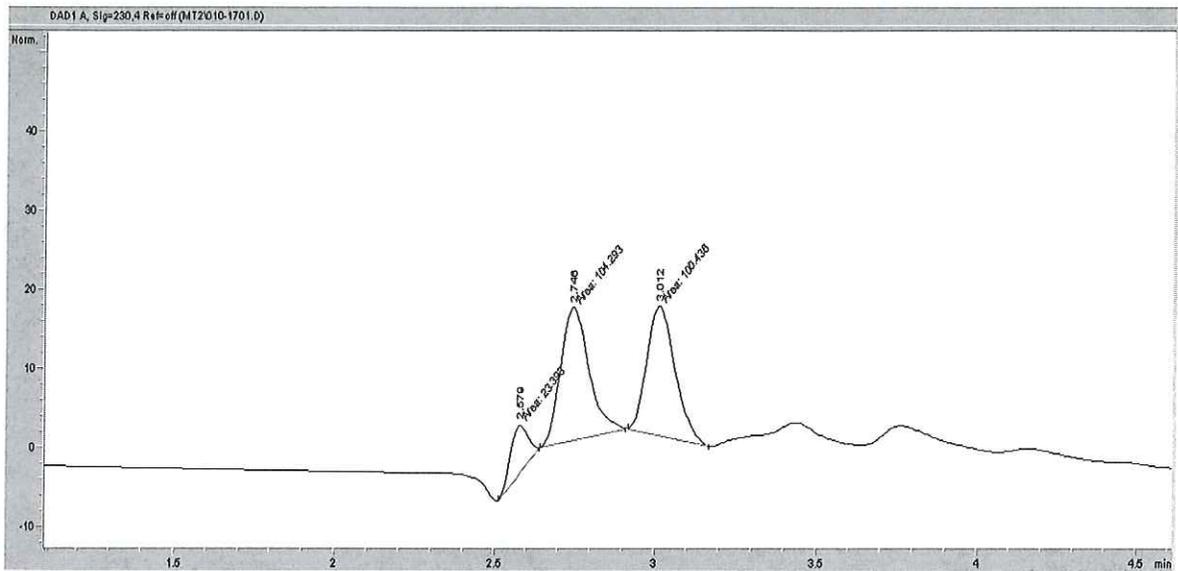


Figura 7.- Cromatograma de branquias de organismos control a 30 días.

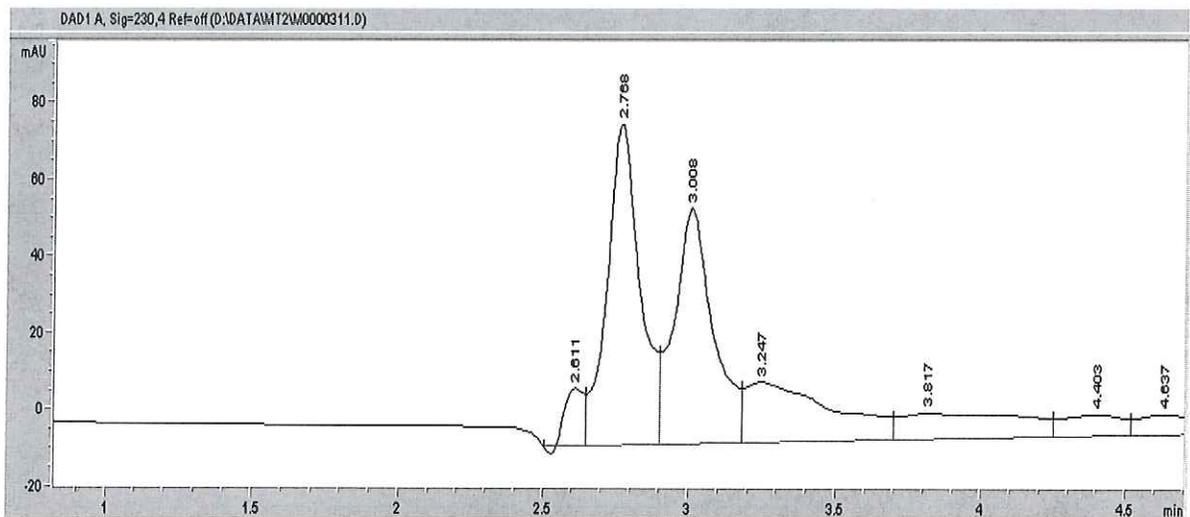


Figura 8.- Cromatograma de branquias de organismos expuestos a $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ durante 10 días.

Las branquias de los organismos expuestos a $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ no mostraron diferencias significativas en los niveles de MT con respecto al resto de las almejas. Probablemente

porque el error estándar es grande debido al bajo número de muestras, recomendando que en trabajos posteriores se aumente el número de muestras.

La concentración de MT en la glándula digestiva fue diferente ($p < .05$) (Fig.12) en los organismos expuestos durante 10 días (Fig. 10 y 11) a concentraciones de 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ Cd con respecto al resto de las almejas, siendo en este periodo (10 días) cuando se presentaron los niveles mas altos de MT (22.6 ± 1.9 , 23.6 ± 0.8). El mecanismo de detoxificación fue detectable en almejas control detoxificadas durante 30 días, presentado la menor concentración de MT (6.1 ± 1) y fueron estadísticamente diferentes al resto de los organismos (Tabla III).

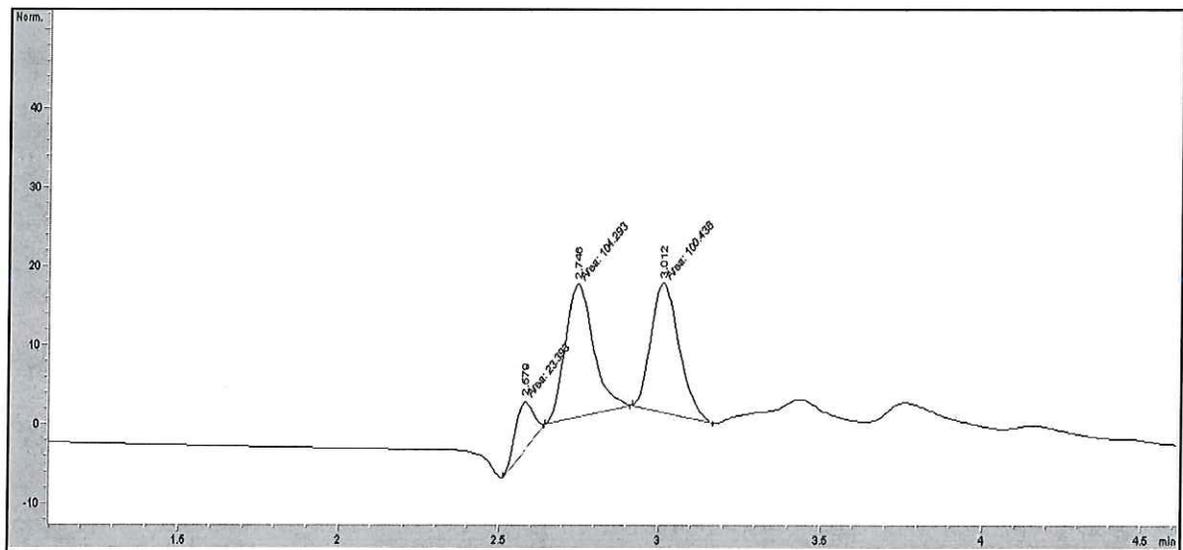


Figura 9.- Cromatograms de glándula digestiva de organismos control-10.

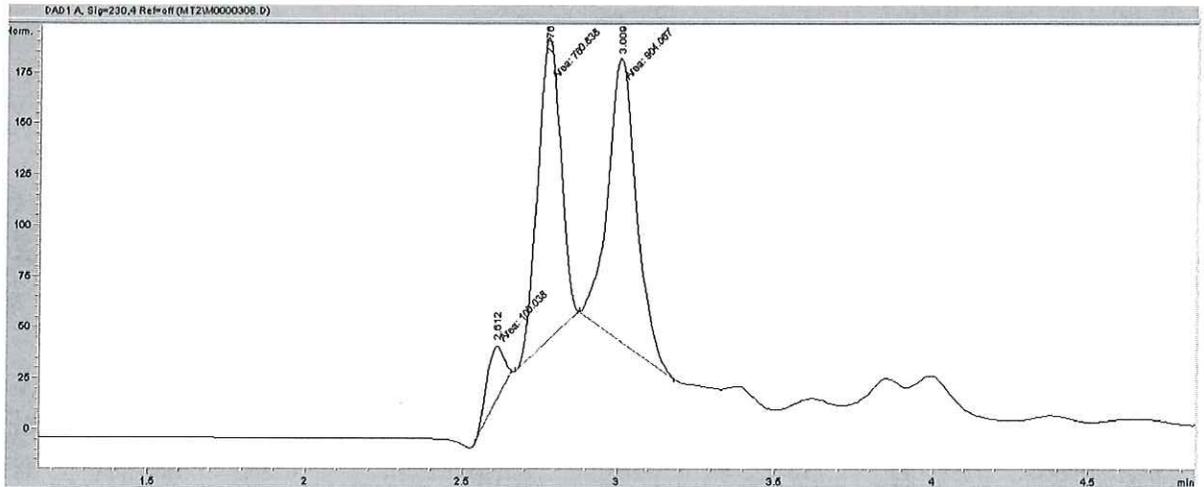


Figura 10.- Cromatogramas de glándula digestiva de organismos expuestos durante 10 días a $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$.

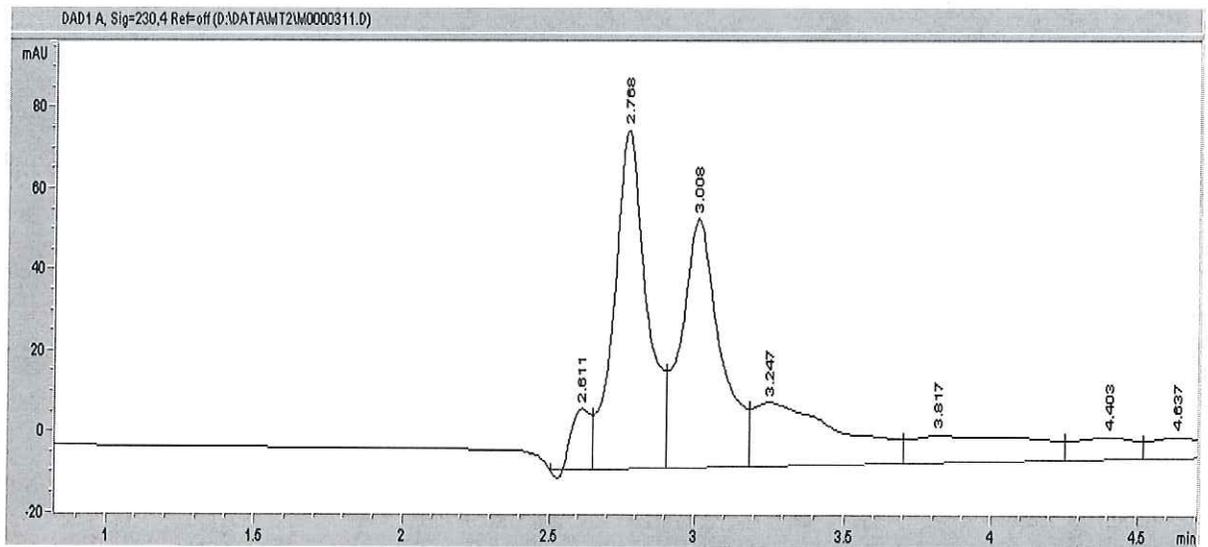


Figura 11.- Cromatograma de glándula digestiva de organismos expuestos durante 10 días a $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$.

Siendo el nefridio un órgano de almacenamiento cuando los organismos son expuestos a Cd durante largos periodos, no presentó diferencias estadísticas en el contenido de MT durante los 30 días de exposición a este metal.

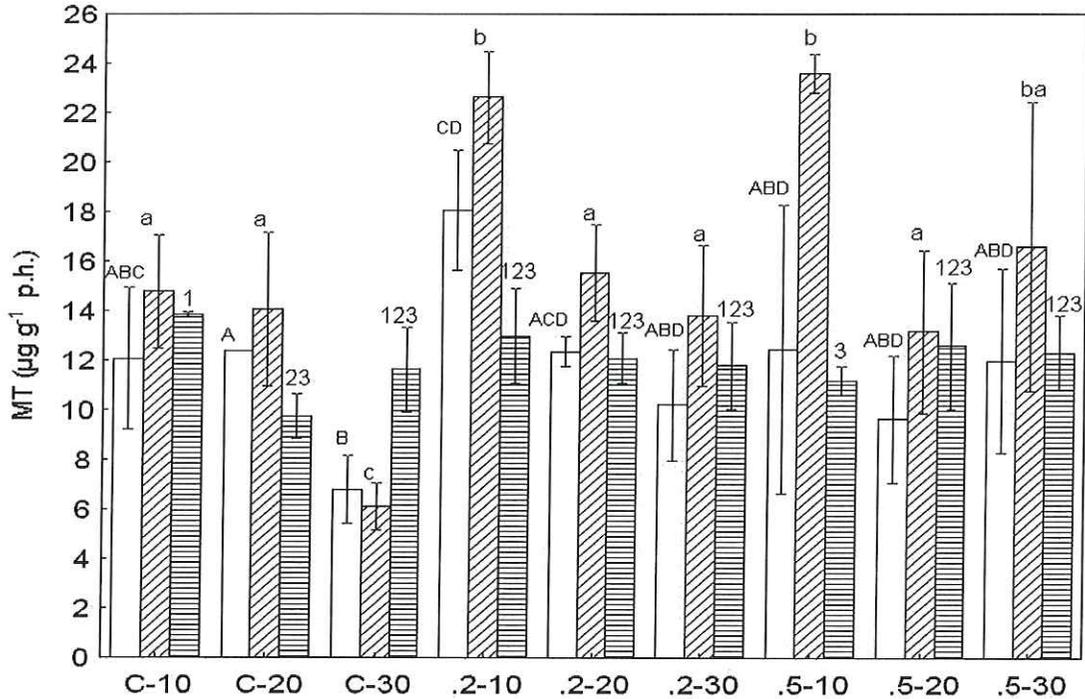


Figura 12.- Concentración de MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) en branquias \square , glándula digestiva $\▨$ y nefridio $\▤$ de *M. Squalida* expuestos a concentraciones de 0.2 y 0.5 mg l^{-1} Cd^{-1} durante 10, 20 y 30 días además del control (C). Cada letra y numero que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias significativas ($p < .05$) por tratamiento para cada órgano.

VIII.II.IV. Distribución de MT entre los órganos analizados.

Al hacer el análisis de contenido promedio de MT entre órganos se obtuvo que hay diferencias significativas ($p < .05$) entre el nefridio (12.020 ± 0.493) con respecto a la

glándula digestiva (15.6 ± 1.3) y branquias (11.8 ± 1), siendo estas últimas las que presentaron la menor concentración de MT durante el bioensayo, seguidas del nefridio y la glándula digestiva.

VIII.II.III. Acumulación de Cd durante 30 días de exposición.

En los organismos control, la concentración de cadmio de branquias y glándula digestiva se mantuvo constante, sin embargo, en el nefridio de los organismos control 30 se obtuvo una disminución del metal. Analizando los resultados de branquias, glándulas digestivas y nefridios de organismos expuestos a 0.2, se obtiene una acumulación de Cd constante durante los 30 días de exposición. En almejas expuestas a 0.5 se obtuvo que en la glándula digestiva hubo un notable incremento de Cd a los 20 y 30 días, a diferencia del nefridio que aumentó su concentración hasta los 30 días del bioensayo (Fig. 12).

VIII.II.IV. Acumulación de Cd en *M. squalida* expuesta a diferentes concentraciones de Cd.

Como respuesta a la exposición de Cd, las branquias de *M. Squalida* de organismos expuestos presentaron un incremento en la concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) del metal, siendo estadísticamente diferentes ($p < .05$) a las branquias de organismos control (Fig.13), obteniendo que las almejas control-30 presentaron la menor concentración de Cd (0.12 ± 0.02). Adicionalmente, en los grupos expuestos a Cd se presentaron diferencias

estadísticas ($p < .05$) en branquias de organismos expuestos 30 días a 0.5 mg l^{-1} (2.8 ± 0.9) respecto al grupo de 0.2 mg l^{-1} Cd expuestos durante 10 y 30 días (0.8 ± 0.2 y 1 ± 0.3).

La acumulación de Cd en la glándula digestiva de *M. Squalida* fue diferente entre almejas control respecto a las expuestas 20 días a 0.2 mg l^{-1} y a 0.5 mg l^{-1} Cd durante 20 y 30 días. Aunque los organismos expuestos a 0.2 mg l^{-1} fueron diferentes a los controles, la concentración del metal durante los 30 días del bioensayo se mantuvo constante, presentando diferencias estadísticas ($p < .05$) durante este intervalo, sin embargo, las glándulas digestivas de los organismos expuestos durante 10 y 20 días a 0.5 mg l^{-1} Cd fueron diferentes estadísticamente, obteniendo para estos organismos la máxima concentración de Cd a los 20 días (14.1 ± 0.5).

El cadmio acumulado en el nefridio únicamente mostró (Fig.13) diferencias significativas en almejas expuestas a 0.5 mg l^{-1} Cd durante 30 días (3.3 ± 1.2) con respecto a los controles. Aunque no se mostraron diferencia significativas en los moluscos expuestos a 0.2 mg l^{-1} Cd, se puede observar que la acumulación de este metal se incrementa ligeramente en almejas expuestas a esta concentración durante 30 días. Las mayores concentraciones de Cd en el nefridio se presentaron en ambas exposiciones el día 30 al igual que en los organismos expuestos a 0.5 mg l^{-1} Cd durante 10 días.

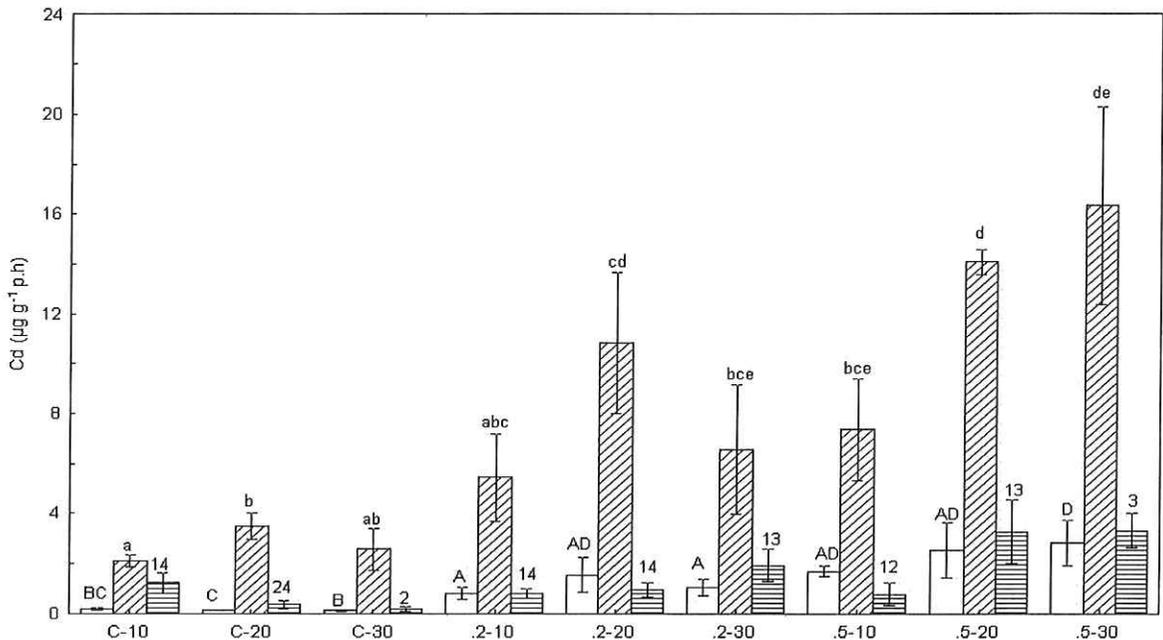


Figura 13.- Concentración de Cd (media± error std.) en branquias □ , glándula digestiva ▨ y nefridio ▤ de *M. squalida* expuestos a concentraciones de 0.2 y 0.5 mg l⁻¹ Cd⁻¹ durante 10, 20 y 30 días además del control (C). Cada letra y numero que se encuentra en la parte superior de las barras indican las diferencias estadísticas ($p < .05$) por tratamiento para cada órgano.

VIII.II.III.I. Bioacumulación de Cd entre órganos.

La acumulación promedio de Cd entre en glándula digestiva, branquias y nefridio fue estadísticamente diferente, mostrando un gradiente de acumulación de Cd en: glándula digestiva>nefridio>branquias, este patrón de acumulación es igual al obtenido en el contenido de MT.

VIII.III. Campo.

VIII.III.I. Recolección de organismos.

Los parámetros ambientales y la localización de las estaciones en donde se realizaron las colectas de almejas se presentan en la tabla III. Según el índice calculado, las almejas de la estación 1 (Punta Coyote) fueron de menor tamaño respecto al resto de las estaciones (tabla IV).

Tabla III.- Parámetros ambientales de las estaciones de muestreo en Bahía La Paz, B.C.S. en abril del 2005.

Nombre estación	No. estación	Coordenadas	Z (m)	O ₂	T°C	S
Punta Coyote	1	24°41'30", 110°42'26"	10	5.35	23	34.1
San Juan de la Costa	2	24°24'00", 110°41'07"	7	5.62	23.2	34.6
EL Quelele	3	24°11'53", 110°30'03"	4	4.8	24	34.8
Balandra	4	24°10'32", 110°21'36"	6	4.98	22.4	34.7

Tabla IV.- Biometría (promedio \pm desv. std) de almejas colectadas en cuatro estaciones dentro de Bahía La Paz, B.C.S. en abril del 2005.

Estación	1	2	3	4
Peso total (gr)	112.09 ^a ± 8.96	163.18 ^{bc} ± 23.34	121.22 ^{ac} ± 14.91	142.87 ^c ± 18.33
Largo (mm)	76.62 ^a ± 2.97	83.69 ^b ± 3.66	78.37 ^{ac} ± 3.43	81.63 ^{bc} ± 3.70
Ancho (mm)	63.59 ^a ± 2.18	68.65 ^b ± 3.49	63.76 ^a ± 3.18	67.91 ^b ± 3.26
Alto (mm)	37.84 ^a ± 1.07	42.65 ^b ± 1.14	38.3 ^a ± 1.51	40.44 ^c ± 1.98
Peso tejido (gr)	36.65 ^a ± 3.02	57.31 ^b ± 18.29	45.24 ^{ab} ± 8.35	49.41 ^{ab} ± 6.75
Índice	4.89 ^a ± 0.40	3.61 ^b ± 0.79	4.07 ^b ± 0.56	3.89 ^b ± 0.41

VIII.III.II. Metalotioneinas en organismos de Bahía La Paz.

El muestreo realizado en cuatro sitios de Bahía La Paz, B.C.S. indicó que la menor concentración de MT en branquias de *M. squalida* fué en San Juan de La Costa (9.2 ± 1.2) siendo estadísticamente diferentes ($p < .05$) únicamente con organismos de Balandra (14 ± 1.6). También los organismos de San Juan de La Costa (10.2 ± 1.3) presentaron diferencias significativas ($p < .05$) en el contenido de MT en la glándula digestiva con respecto a las de Punta Coyote (13.9 ± 1.2) siendo las de este sitio las que registraron la mayor concentración.

El contenido de MT en el nefridio indican que la mayor síntesis de MT (Fig.14) ocurre en los organismos de las estaciones Punta Coyote (14.3 ± 2.3) y Balandra (12.9 ± 1.3) siendo diferentes significativamente ($p < .05$) con respecto a las almejas de San Juan de La Costa (6.9 ± 1.340) y El Quelele (5.1 ± 0.8), obteniendo que los organismos de esta última estación presentan la menor concentración de MT. Al realizar el análisis estadístico del contenido de MT entre órganos se obtuvo que el nefridio es diferente con respecto a las branquias y la glándula digestiva.

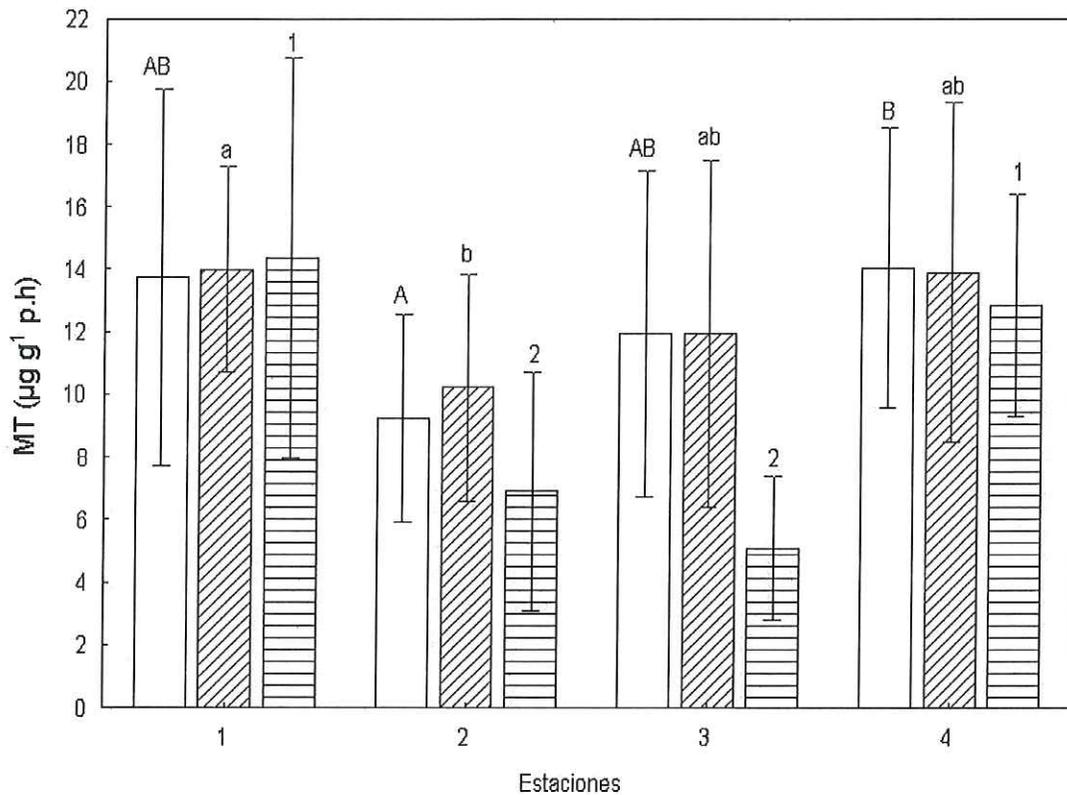


Figura 14.- Concentración de MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) en branquias \square , glándula digestiva ▨ y nefridio ▤ de *M. Squalida* recolectadas ($n=9$ por estación) en cuatro estaciones dentro de Bahía La Paz, B.C.S. Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias ($p<.05$) por estación para cada órgano.

VIII.III.III. Cadmio en organismos de Bahía La Paz.

Tal como se presentó en el bioensayo, la glándula digestiva fue el órgano que acumuló la mayor concentración de Cd en los organismos recolectados de los cuatro sitios de Bahía La Paz, B.C.S. (Fig.15), obteniendo que el contenido del metal es diferente entre almejas del Quelele respecto a las demás estaciones, siendo las almejas de este sitio las que menor concentración (1.9 ± 0.2) de Cd presentaron en la glándula digestiva. Mediante la cuantificación de Cd en el nefridio se obtuvieron diferencias significativas ($p<.05$) entre los

organismos de Balandra (0.024 ± 0.016) y San Juan de la Costa (0.163 ± 0.059), siendo estos últimos los que presentaron los niveles más altos de Cd.

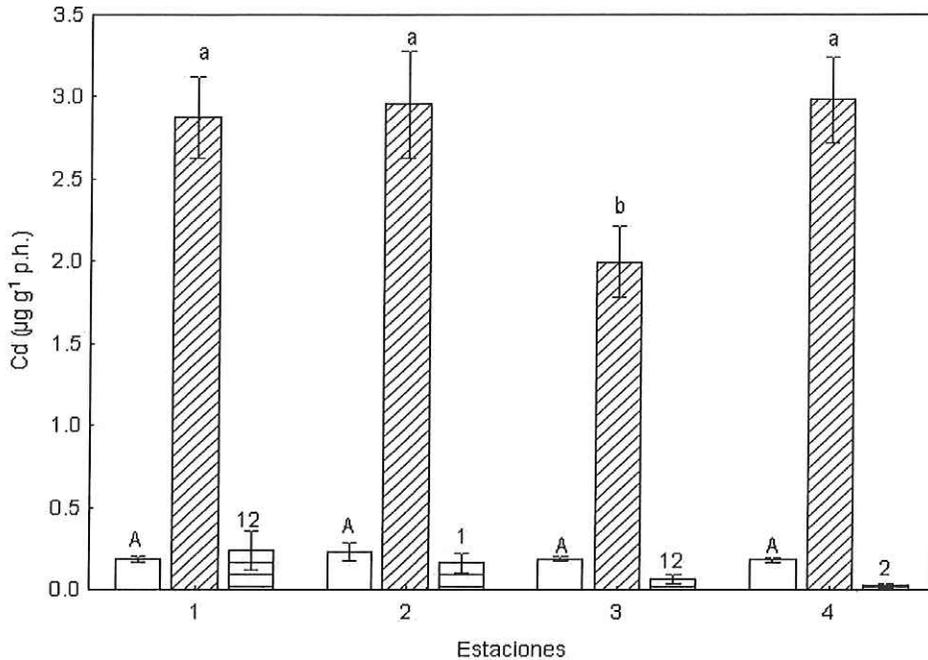


Figura 15.-Concentración de Cd en branquias \square , glándula digestiva ▨ y nefridio ▤ en cuatro sitios de muestreo dentro de Bahía La Paz, B.C.S. Las letras y números que se encuentran en la parte superior de las barras indican las diferencias por estación para cada órgano.

VIII.III.III.I. Distribución de Cd entre órganos.

Los organismos recolectados en las cuatro estaciones de Bahía La Paz, presentaron diferencias estadísticas ($p < .05$) en el contenido de Cd entre órganos, siendo la glándula digestiva el órgano en donde se presentó la mayor concentración de Cd seguido de las branquias y el nefridio.

VIII.III.III.II. Cadmio total en organismos de Bahía La Paz.

El Cadmio total fue medido en el tejido completo de 6 almejas por estación (Tabla V), siendo los organismos de Balandra los que presentaron diferencias significativas ($p < .05$) con respecto a las almejas recolectadas de Punta Coyote, obteniendo que el contenido de Cd en el tejido completo de almejas procedentes de Balandra presentan la menor acumulación del metal. El porcentaje de humedad obtenido para estos organismos ($n=6$ por estación) fue de 86.84%.

Tabla V.- Concentración (media \pm error std.) de cadmio total ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el tejido completo (peso húmedo) de *Megapitaria squalida* ($n=6$ por estación) en los cuatro sitios de muestreo en Bahía La Paz, B.C.S. en abril del 2005.

Estación	1	2	3	4
$\mu\text{g Cd g}^{-1}$	1.104 ^a	1.120 ^{ab}	0.777 ^{ab}	0.693 ^b
	± 0.162	± 0.168	± 0.112	± 0.107

VIII.IV. Caracterización de proteínas de bajo peso molecular.

Con la ayuda de electroforesis confirmamos que hay proteínas con peso molecular aproximado a los 6,000 Da (Fig.16,17) obteniendo una banda mas definida en la muestra de glándula digestiva a diferencia de la banda tenue que se observa en la figura 6 de la muestra de branquia.

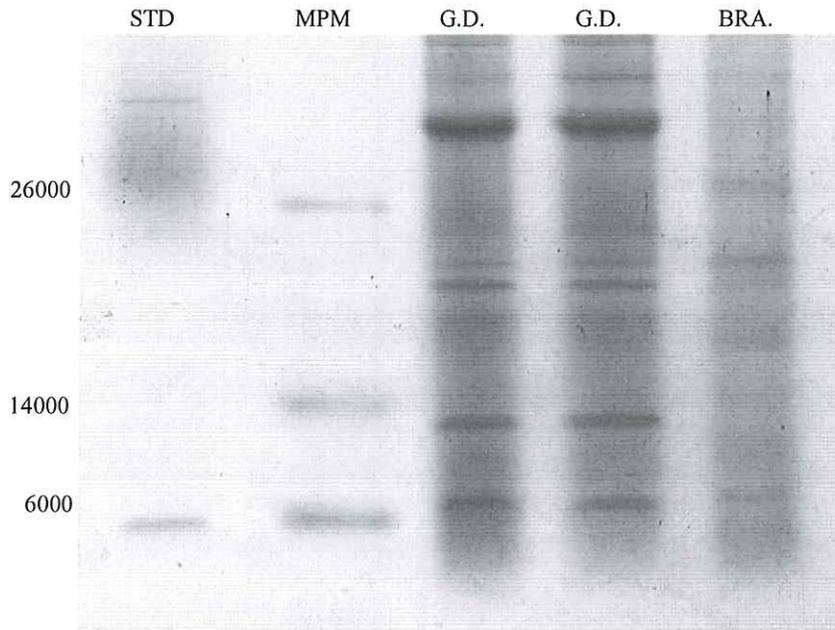


Figura 16.- Electroforesis (SDS-PAGE) de izquierda a derecha se puede observar la banda de MT de hígado de conejo (STD), marcador de peso molecular (MPM), las dos columnas siguientes son muestras de glándula digestiva (G.D.) y la última es una muestra de branquias (BRA), las tres muestras son de organismos expuestos a $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$. Los pesos moleculares del MPM están en Da.

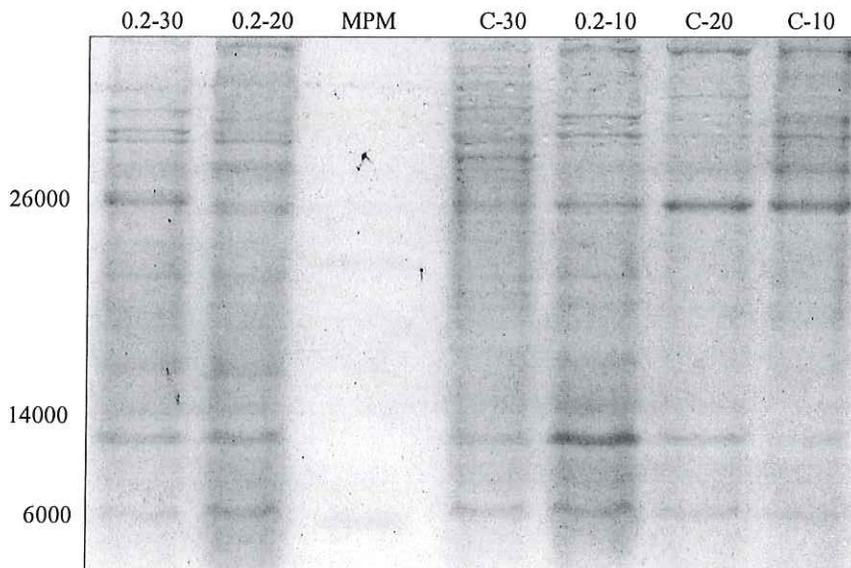


Figura 17.- Electroforesis (SDS-PAGE) de izquierda a derecha se puede observar la banda de MT de las muestras de glándula digestiva ($20 \mu\text{g}$ de proteínas totales): 0.2-30, 0.2-20, MPM, control-30, 0.2-10, control-20, control-10 (concentración-días de exposición). Los pesos moleculares están en Da.

IX. DISCUSIONES.

IX.I. Concentración letal media.

La resistencia a contaminantes varía interespecíficamente, siendo necesario obtener la concentración letal media de cada especie a utilizar como bioindicador, porque además de ser un punto de referencia, es útil para realizar comparaciones de resistencia a cierto contaminante entre especies, estas diferencias son notorias entre los resultados obtenidos de LC_{50} en este estudio para la almeja *M. Squalida* ($1.20 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$) siendo menores a los reportados para la almeja *Ruditapes decussatus* (3 mg Cd l^{-1}) que es considerada como una de las especies con alta capacidad de acumulación de Cd (Henry *et al.*, 1984). Comparando con las dosis letales medias de los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis* ($3.6- 6.2$ y $25-165 \text{ mg l}^{-1}$), se demuestra que la almeja *M. squalida* tiene baja capacidad de concentrar Cd en sus tejidos, sin embargo, el método probit pudiera ser una herramienta que este subestimando la dosis letal media de este organismo, debido a que los datos predictivos de mortalidad durante el bioensayo fueron muy altos comparado con lo obtenido.

Al final del bioensayo (día 30) el porcentaje de mortalidad para *M. squalida* fue de 0.7 y 1.3% en los tratamientos con 0.2 y 0.5 mg l^{-1} de Cd respectivamente, siendo menor a lo reportado por Geret *et al.* (2002) en *M. edulis* y *C. gigas* expuestos a 0.2 mg l^{-1} de Cd presentando 6 y 17% de mortalidad respectivamente, corroborando que el efecto de Cd es diferente tanto interespecíficamente como intraespecíficamente, esto se presenta en organismos de la misma especie que han estado expuestos a contaminantes, desarrollando cierta resistencia que los hace menos susceptibles con respecto a organismos no expuestos.

La baja mortalidad que presentó *M. squalida* durante el bioensayo sugiere que es una especie organismos cumple con características de un buen bioindicador de acuerdo a lo descrito por Rainbow (1995).

IX.II. Identificación de la MT en *M. squalida*.

La presencia de MT se observó en la fracción que corresponde al minuto 2.7 (Fig.6), a una longitud de onda de 230 nm. En esta fracción fue en donde también se registraron los mayores niveles de Cd por medio del Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA). Para los tres órganos se obtuvo la presencia de MT en la misma fracción (mismo tiempo de retención) del cromatograma. Cabe mencionar que el tiempo de retención de la proteína fue muy bajo, esto se debe a que la proteína no es muy afin a la columna utilizada. Las bajas concentraciones de MT pudieran estar influenciadas por el bajo tiempo de retención.

El uso de HPLC es un instrumento efectivo para cuantificar y purificación MT (Klauser *et al.*, 1983, Olsson y Hogstrand, 1987b, Bordin *et al.*, 1996, Wolf *et al.*, 2000) teniendo la ventaja de hacer el conteo directo de concentración de MT, a diferencia de otros métodos de cuantificación de MT basados en la determinación de metales que indirectamente estiman la concentración de MT asumiendo que la molécula esta saturada con iones metálicos, tales como EAA o el método de cuantificación de grupos tiol (Pedersen y Lundebye, 1996, Serafim *et al.*, 2002) que sobrestima la concentración, esto se presenta cuando la molécula no esta completamente saturada con metales, ya que la presencia de grupos libres de sulfuro causan alta susceptibilidad de oxidación bajo condiciones

aeróbicas, generando posibles formaciones de ligaduras de disulfuro debido a los grupos tiol libres durante la manipulación de las muestras (Dabrio *et al.*, 2002).

La señal de la proteína fue adecuada a 230 (Fig.4) coincidiendo con la longitud de onda a la cual se han cuantificado isoformas de MT con detector de UV y detección electroquímica (Bordin *et al.*, 1996). El tiempo de retención (2.7 min) fue menor (de 35 a 45 min) al reportado por Bordin *et al.* (1996) en MT de hígado de conejo y caballo. La detección de MT en hígado de conejo realizada por Alhama *et al.*(1996) mediante HPLC con columna supelcosil LC -18 fue a los 16.5 min, parecido al tiempo de retención (18-19 min) del estándar (hígado de conejo) que se utilizó para realizar la curva para MT de *M. squalida*,

las diferencias en los tiempos de retención se deben a la diferencia entre columnas, tratamiento de muestras y principalmente se debe a las variaciones de composición de las MT (Isoformas). Con los resultados de cromatografía obtenidos con detección de diodos para cuantificación de MT en *M. squalida* se recomienda cuantificar esta proteína a 230 nm complementándose con EAA para analizar contenido de Cd unido a dicha proteína.

IX.III. Niveles basales de MT.

En la glándula digestiva de los organismos control-30 se presentaron los niveles mas bajos de MT siendo estadísticamente diferente con respecto a los organismos control-10, corroborando que la síntesis de MT disminuye en la glándula digestiva cuando el organismo se encuentra en sitios no contaminados con Cd, aunque estos organismos se

tuvieron previamente en aclimatación durante una semana, los niveles de MT continuaron disminuyendo, por ello se sugiere que los niveles basales para *M. squalida* en este estudio son los que presentaron los organismos control-30 .

IX.IV. Presencia de MT respecto al tiempo.

Se observó claramente que al exponer a los organismos a cadmio, la respuesta de síntesis de metalotioneinas en branquias y glándula digestiva ocurre rápidamente al día 10, tal como se presenta en la almeja *Scapharca inaequivalvis* (Serra *et al.*,1995), indicando que cuando el organismo detecta concentraciones de Cd mas elevadas a las que generalmente esta expuesto inicia la pronta síntesis de MT para realizar su rol detoxificador, incrementando a su vez la resistencia a metales como se ha reportado en organismos invertebrados (Roseijadi, 1982), adicionalmente, Roseijadi (1992) reporta que un incremento de metales en el ambiente provoca la inducción de MT.

Con lo obtenido en el bioensayo podemos decir que después del día 10 que fue cuando se presenta la mayor concentración de MT, el organismo baja los niveles de síntesis, esto puede ser porque obtiene el equilibrio necesario de detoxificación, observando que al estar expuesto a diferentes concentraciones de Cd durante 20 y 30 días en ambas concentraciones se presenta una disminución de MT que se mantienen en equilibrio hasta el día 30, tal como se presenta en *M. edulis* que mantiene la concentración de MT estable a los 30 días de estar expuesto a Cd (Bebbiano y Langston, 1991), aunque también esta respuesta ha sido explicada por la disminución de la actividad metabólica observada mediante el decremento

de los niveles proteicos que se presentan tanto en branquias como en glándula digestiva de ostiones y moluscos (Geret *et al.*, 2002).

IX.V. MT dependiendo de la concentración de exposición.

Organismos expuestos a 0.2 mg l^{-1} Cd presentaron niveles de Cd estadísticamente iguales durante los 30 días, presumiendo que la bioacumulación en los órganos analizados no es detectable mediante el análisis de Cd, sin embargo, la inducción del metal en los organismos generan un incremento de MT de 62% en branquias y 73% en glándula digestiva a los 10 días de estar expuestos al metal con respecto a los organismos control del día 30 que son los que presentaron los niveles mas bajos de MT, sugiriendo que a las concentraciones a las cuales fueron expuestos los organismos, la inducción de MT es estimulada.

En la glándula digestiva se presentaron diferencias significativas en la síntesis de MT entre los organismos expuestos 10 días a 0.2 y 0.5 mg Cd l^{-1} indicando que existe una respuesta fisiológica cuando se incrementa la concentración del metal en el ambiente. a diferencia del nefridio en donde no se obtuvieron diferencias estadísticas, debido a que este es un órgano que acumula Cd a largo plazo.

En la almeja *M. squalida* se presentaron las mayores concentraciones de MT en la glándula digestiva de los organismos que fueron expuestos durante 10 días a 0.2 y 0.5 mg Cd l^{-1}

(22.6 ± 1.9 , 23.6 ± 0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) siendo esta concentración menor a la cuantificadas por Boutet *et al.* (2002) mediante ELISA, obteniendo 2.9 mg g^{-1} p.h. de MT en glándula digestiva de *Crassostrea gigas* a los 30 días de exposición, y 0.53 mg g^{-1} p.h. en branquias a los 12 días de exposición continuando con un decremento en la concentración. Las diferencias en la acumulación de MT en la glándula digestiva y branquias son explicada por las diferencias en el recambio del metal en los dos tejidos (Boutet *et al.*, 2002). Tanguy *et al.* (2003) también obtienen que la concentración de MT en *Ostrea edulis* es mayor en la glándula digestiva en comparación con las branquias, aunque no encontraron diferencias en la concentración de organismos control con respecto a los expuestos.

IX.VI. Síntesis de MT entre órganos.

Se obtuvieron diferencias estadísticas ($p < .05$) entre los órganos analizados de organismos expuestos, siendo la glándula digestiva la que mayor cantidad de MT sintetizó seguido del nefridio y las branquias. La mayor concentración de MT se sintetizó en organismos expuestos durante 10 días a 0.5 mg Cd l^{-1} , las diferencias entre glándula digestiva y branquias son explicadas por Boutet *et al.* (2002) indicando que en branquias la inducción de MT es un proceso que alcanza la saturación rápidamente a relativamente bajas concentraciones del metal comparado con la glándula digestiva.

Con los resultados generados en el bioensayo se sugiere que la glándula digestiva es el órgano que proporciona mayor información tanto en la acumulación de Cd como en la síntesis de MT, los monitoreos continuos de este órgano en la almeja *M. squalida* nos

pueden dar información acerca del estado de contaminación de un sitio, tal como se obtuvo en el bioensayo; cuando la concentración de Cd en el medio cambia drásticamente, el organismo sintetiza niveles altos de MT continuando con un equilibrio que depende del periodo de exposición. A diferencia de la acumulación de Cd, que se incrementa en función al periodo de exposición, analizando únicamente el Cd se carece de la significancia biológica que este metal presenta.

IX.VII. Acumulación de Cd en *M. squalida* en función al tiempo de exposición.

Aunque no se encontraron diferencias en los niveles de Cd en los organismos control durante 30 días (Tabla III), la cantidad de MT en la glándula digestiva disminuyó 59% del día 10 al 30, corroborando que cuando un organismo se encuentra en sitios menos contaminados, la síntesis de MT disminuye, esto no se puede observar con el Cd en un periodo corto de detoxificación, porque la vida media del metal es mayor que el de las MT, tal como se ha reportado para *M. edulis* la vida media del Cd y MT es de 300 y 25 días respectivamente (Bebianno y Langston, 1993), adicionalmente se ha obtenido que en branquias de ostión *Crassostrea virginica* el Cd se acumula alrededor de 35 días (Rosejadi y Klerks, 1989) y 70 días en la almeja *Macoma balthica* (Langston y Zhou, 1987).

Tal como se obtuvo en la almeja *Corbicula fluminea* (Baudrimont, 1997) la concentración de Cd en *M. squalida* se bioacumuló con respecto al tiempo de exposición siendo los organismos expuestos 30 días a 0.5 mg Cd l^{-1} los que presentaron la mayor cantidad del metal en la glándula digestiva. La relación de acumulación de Cd en función al tiempo de

exposición también se ha reportado en algunos moluscos como en *Patella vulgata*, siendo los organismos mas viejos los que contienen la mayor cantidad de Cd (Noel-Lambot, *et al.*, 1980).

IX.VIII. Acumulación de Cd en *M. squalida* en función al la concentración expuesta.

La concentración de Cd en branquias de *M. squalida* fue diferente desde el día 10 en ambas exposiciones con respecto a los organismos no expuestos, porque al ser órganos que están en contacto directo con el agua de mar se inicia la distribución del contaminante (Serra *et al.*, 1995), una vez que el organismo es expuesto a cadmio, el metal que entra a través de las branquias se presenta en la hemolinfa generando el complejo MT-Cd que es transportado a la glándula digestiva y al nefridio (Roseijadi, 1992). La toxicidad puede ocurrir cuando la cantidad de metalotioneinas en la glándula digestiva son insuficientes para absorber el cadmio, por lo tanto, la exposición y cantidad del metal es lo que hace que este sea distribuido en los diferentes tejidos,

Serra *et al.* (1995) establecen que en branquias de la almeja *Scapharca inaequivalvis* se presenta una rápida acumulación de Cd durante las primeras dos semanas seguido de una disminución, a diferencia de la glándula digestiva en donde tarda mas tiempo en almacenarse el Cd, esta acumulación fue obtenida en *M. squalida* a los 20 y 30 en glándula digestiva de organismos expuestos 0.5 mg l^{-1} Cd, siendo este sistema explicado por Bebbianno y Serafim, (1998) reportando que las branquias tienen la función de ser un reservorio importante de metales, el cual es transportado posteriormente a la glándula

digestiva después de 14 días de exposición (Bebiano *et al.*, 1994). Tal como se ha mencionado, los niveles de Cd en el nefridio se incrementan lentamente con respecto a las branquias y glándula, las diferencias de acumulación en el nefridio fueron detectables hasta los 30 días de estar expuesto a 0.5 mg l^{-1} Cd.

La mayor concentración del metal fue de $16.3 \pm 3.9 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1}$ en la glándula digestiva, siendo estos valores mayores a los acumulados en la almeja *Scapharca inaequalvis* y en la almeja asiática *Corbicula fluminea* reportan 3 y $0.26 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1}$ respectivamente (Serra *et al.* 1995 y Baudrimont *et al.*, 1997) como concentración máxima en la glándula digestiva de organismos expuestos durante 30 días. En este estudio la máxima acumulación del metal en branquias de *M. squalida* fue $1.5 \pm 0.7 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ siendo menor a lo ($4.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) obtenido en branquias de *Scapharca inaequalvis* (Serra *et al.*, 1995) y mayor a lo reportado por Boutet, *et al.* (2002) en *Crassostrea gigas* que acumuló $0.18 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Comparando con lo reportado por estos autores, se considera que la baja concentración del metal en branquias y la alta acumulación en la glándula digestiva de *M. squalida* indican que el transporte de Cd de branquias a glándula digestiva es mayor con respecto a las especies antes mencionadas.

Los altos niveles de Cd distribuidos en *M. squalida* pudieran ser explicados por las condiciones del medio ambiente en las que se desarrolla este organismo, particularmente los organismos que habitan en aguas cálidas tienen un sistema metabólico más acelerado que las especies de aguas templadas (Serafim *et al.*, 2002).

IX.IX. Acumulación de Cd entre órganos.

La concentración de Cd fue estadísticamente diferente entre los tres órganos, siendo igual a el gradiente de acumulación de MT (glándula>nefridio>branquias). Las diferencias entre órganos también son reportadas a los 21 días de exposición a Cd en glándula digestiva y branquias de *Crassostrea gigas* y *Mytilus edulis*, siendo mayor en la glándula digestiva, aunque con otros metales como el Hg la acumulación fue mayor en las branquias (Geret, *et al.*, 2002).

Lo reportado por Serra *et al.* (1995) para la almeja *Scapharca inaequivalvis*, Bebianno y Langston (1992) en *Littorina littorea*, Geret *et al.* (2002) en *M. edulis* y *Crassostrea gigas* coinciden con lo obtenido en este estudio en la almeja *M. squalida*, confirmando la importancia de la glándula digestiva como el órgano en donde se realiza la mayor síntesis de MT y almacenaje de Cd, además de ser buen indicador de exposiciones del metal a largo plazo (Boutet *et al.*, 2002), mientras que las branquias son órganos que denotan la contaminación en un periodo corto de exposición (Duquesne y Coll, 1995).

IX.X. Presencia de MT en la almeja *M. squalida* de Bahía La Paz, B.C.S.

Los organismos de San Juan de La Costa y El Quelele presentaron concentraciones de MT estadísticamente iguales siendo estos valores menores a los obtenidos en almejas recolectadas de Punta Coyote y Balandra que entre ellas son estadísticamente iguales. Aunque se esperaría que los organismos del Quelele por presentar niveles bajos de Cd en la

glándula digestiva tuviera bajas concentraciones de MT no fue así, esto puede ser atribuido a que la almeja *M. squalida* de este sitio cuenta con alto contenido de Cu el cual ha sido reportado por Serrano (2005) siendo conocido que el Cu después del Hg y Cd es el siguiente metal más afín a las MT, adicionalmente, el Zn pudiera estar interviniendo en la síntesis de estas proteínas, por ser un metal que generalmente está en las MT en una cantidad aproximada de 2-3 mol, la combinación de dos metales en este tipo de metaloproteínas es viable debido a que son proteínas que pueden unir dos metales en su estructura (Otvos, 1980).

La concentración de MT ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) en organismos de San Juan de La Costa (9.2 ± 1.2) fue estadísticamente diferente en branquias con respecto a Baladra (14.5 ± 1.6), adicionalmente los organismos de San Juan de La Costa (10.2 ± 1.2 , 6.9 ± 1.3) presentaron estas diferencias en glándula digestiva (13.9 ± 1.2) y nefrídio (14.3 ± 2.2) con organismos de Punta Coyote, estos valores se encuentran por debajo a lo obtenido en *Crassostrea gigas* colectadas en las costas de Francia, en donde se reporta que las mayores concentraciones que se obtuvieron fueron de: 1.2 ± 0.3 mg g^{-1} p.h. en glándula digestiva y 0.4 ± 0.1 mg g^{-1} p.h. en branquias (Boutet *et al.*, 2002) y menores también a lo obtenido en almejas *Ruditapes decussatus* de las costas del sureste de Tunisia en el Mar Mediterráneo, reportando 2.1 mg g^{-1} p.h. y 1.4 mg g^{-1} p.h. en sitios contaminados con Cd (Hamza Chaffai, 2003). Los valores que se reportan en los diferentes estudios no son comparables debido a la diferencia de metodología que se utiliza en cada análisis, obteniendo estos resultados con métodos

indirectos y directos, siendo estos últimos menos precisos, sugiriendo que para una mejor cuantificación de esta proteína se utilicen métodos directos.

Los altos niveles de Cd en San Juan De La Costa son atribuidos a que se encuentra la empresa minera ROFOMEX que estuvo trabajando durante un periodo aproximado de 25 años (Consejo minero, 1999), en donde se realizaban extracciones de roca fosfórica la cual esta asociada con Cd que al ser una impureza es arrojado nuevamente al mar, sin embargo, las bajas concentraciones de MT pueden deberse a que el alto contenido de Cd pudiera estar alterando el metabolismo de las almejas, tal como lo explican Boutet *et al.* (2002) al obtener valores anormalmente bajos de MT en glándula digestiva y branquias de *Crassostrea gigas* colectadas en un sitio de Francia con altas concentraciones de Cd, aunque aun hay mucho por investigar porque Boutet *et al.* (2002) demuestra que la inducción de MT con respecto al metal bioacumulado no es lineal, sugiriendo la existencia de otro mecanismo de secuestación.

Los organismos del Quelele presentaron los niveles mas bajos de MT para *M. squalida* en glándula digestiva, branquias y nefridio (6.1 ± 1.0 , 6.8 ± 1.5 y $11.6 \pm 1.8 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente), siendo mayores a los obtenidos por Roseijadi *et al.* (1992) en *Mytilus edulis* ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ p.h.). Bebbianno y Langston (1991, 1992) reportan niveles básicos para mejillones de MT entre 2 y 3 mg g^{-1} p.s. aunque las comparaciones son entre diferentes especies hay otros factores como la temperatura del agua que modifican los niveles básicos de MT, sugiriendo que la almeja *M. squalida* por estar en aguas cálidas presenta valores mas altos respecto a organismos de aguas frías, lo anterior tambien se ha reportado para

Mytilus galloprovincialis, siendo los organismos de aguas mas calientes los que acumulan mayores cantidades de Cd, además de sintetizar mayores cantidades de MT. Por otra parte Serafim *et al.* (2002) demuestran que los organismos mas grandes contienen niveles mas altos de MT, sugiriendo que cuando se utilicen las MT como indicador de contaminación, se tomen en cuenta los factores tamaño y temperatura.

IX.XI. Cd en las almejas recolectadas en Bahía La Paz, B.C.S.

La concentración de Cd en branquias no presentó diferencias significativas entre estaciones, coincidiendo con lo obtenido en branquias de *C. gigas* procedentes tanto de un sitio limpio como de un área con alto contenido de Cd, corroborando que las branquias no son órganos de almacenaje de este metal (Boisson *et al.*, 2003) a diferencia de la glándula digestiva en donde se obtuvo que los organismos del Quelele fueron diferentes estadísticamente con respecto a las almejas de las otras tres estaciones, siendo estos organismos los que presentaron los niveles de Cd mas bajos ($1.9 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) debido a que es un sitio sin aportes de agua de origen antropogénico, sin embargo, otros autores reportan que Balandra es el sitio con las concentraciones mas bajas en el tejido completo de *M. squalida* (Mendez *et al.*, 2006) tal como se obtuvo en nuestro estudio analizando el tejido completo.

En San Juan de la Costa el contenido de Cd en el nefridio fue mayor (0.25 ± 0.2) que en los organismos de Balandra que tuvieron una concentración promedio de $0.08 \mu\text{g g}^{-1}$ p.h., estas diferencias y el alto contenido de Cd en San Juan de la Costa coinciden con los resultados obtenidos en Abril del 2003 en el tejido completo de *M. squalida* (Mendez *et al.*, 2006).

La concentración de Cd promedio en branquias, glándula digestiva y nefridio de organismos recolectados de Bahía La Paz fue de: 0.2, 2.7 y 0.12 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.h. respectivamente. Aunque en este estudio únicamente se midió el cadmio de la fracción soluble, el valor obtenido en la glándula digestiva fué mayor a lo obtenido por Serrano (2005) en el tejido completo de esta misma almeja, reportando 1.14 $\mu\text{g g}^{-1}$ Cd p.h. como concentración promedio en almejas de Bahía La Paz, siendo este valor mayor a lo obtenido en nuestro estudio para el tejido completo (0.923 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.), con ello se demuestra que el contenido de Cd en la almeja *M. squalida* de Bahía La Paz ha disminuido.

El promedio de las concentraciones de Cd que se registraron en almejas de Bahía La Paz en peso seco fue de: 1.28, 17.8 y 0.79 $\mu\text{g g}^{-1}$ en branquias, glándula digestiva y nefridio respectivamente, siendo los valores de glándula mayores a los obtenidos en *Crassostrea gigas* de un sitio contaminado en el estuario Gironde de Francia reportando valores máximos de 2.86 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la fracción soluble y 2.46 $\mu\text{g g}^{-1}$ en la fracción insoluble (Mouneyrac *et al.*, 1999), una posible explicación a estos resultados son los altos niveles de Cd que se presentan en la Bahía debido al aporte natural de este elemento asociado a los bancos de fosforita.

Al comparar los valores encontrados en los diferentes órganos de los organismos muestreados en las cuatro estaciones de Bahía La Paz, B.C.S. con los obtenidos en el bioensayo, observamos que las concentraciones de Cd de los tres órganos son similares a las obtenidas en los organismos control, considerando únicamente el contenido de Cd en

almejas de Bahía La Paz se puede decir que están expuestas a concentraciones por debajo de las utilizadas en los organismos del bioensayo, sin embargo, los valores de MT contenidos en almejas de la Bahía se encuentran dentro de las concentraciones obtenidas en organismos expuestos a Cd, sugiriendo que el monitoreo de MT es una herramienta adicional para conocer el estado de contaminación de un sitio.

IX.XII. Concentraciones de Cd en el tejido completo.

El contenido de Cd en almejas completas procedentes de Bahía La Paz, B.C.S. resultó ser estadísticamente diferente entre almejas recolectadas en Punta Coyote ($1.1 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$) y Balandra siendo los organismos de la última estación los que presentaron los niveles mas bajos de Cd ($0.7 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$), coincidiendo con Serrano (2005) en el muestreo realizado en Bahía La Paz, B.C.S., reportando que las mayores concentraciones de Cd son entre en almejas de Punta Coyote y San Juan de La Costa, esto se debe a que esta es un área con alto contenido de material fosfórico procedente de los depósitos naturales ubicados al noroeste de Isla San José y sobre la costa peninsular de San Juan de La Costa, adicionalmente la formación San Gregorio contiene un elevado contenido de Cadmio y fósforo, siendo esta área uno de los depósitos de fosforita mas grandes del mundo (Mann y Ritchie, 1995, Consejo Minero, 1999).

Baudrimont *et al.* (1997) al realizar comparaciones en la acumulacion de Cd entre el tejido completo respecto a la cuantificación por órganos demuestran que la concentración es

aproximadamente 40% menor en el tejido completo, similar a lo obtenido en *M. squalida* mostrando que la bioacumulación del metal fue 50% menor en el organismo completo (sin concha) comparado con lo obtenido en cada órgano, siendo la glándula digestiva en donde se presenta la mayor bioacumulación, sugiriendo que el análisis en un órgano específico es más preciso que el realizado en el organismo completo, siendo necesario una correcta cuantificación de este metal, debido a que la almeja *M. squalida* con altos niveles de Cd puede llegar a ser tóxica para el humano, porque al consumir moluscos el porcentaje biodisponible de Cd es del 12 al 24 % del Cd total del organismo (Boisson *et al.*, 2003).

IX.XIII. Relación entre MT y Cd.

Aunque se observó un aumento en la concentración tanto de Cd como de MT durante el bioensayo, no se obtuvo una relación lineal entre la concentración de Cd y la síntesis de MT, presentándose esta no correlación en un estudio realizado por Bebianno y Serafim (1998) en la almeja *Ruditapes decussatus* expuesta durante 40 días a 0.1 mg Cd l^{-1} en el mismo bioensayo, esta correlación si se obtiene para el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, incrementando la acumulación de Cd 9 veces. Adicionalmente se reporta que la concentración MT es dos veces más en mejillones en comparación con almejas colectadas, reflejando que la acumulación de Cd y la síntesis de MT es dependiente de la especie. Esta no correlación que también se ha presentado en el calamar *Loligo vulgaris* es atribuida a otro tipo de proteínas que pudieran estar realizando el sistema de detoxificación del Cd (Bustamante *et al.*, 2002). También se ha registrado que existe correlación entre la bioacumulación de Cd y el contenido de MT en el tejido completo de almeja *Corbicula*

fluminea , no obteniendo dicha correlación cuando se realiza la cuantificación en órganos separados (Baudrimont *et al.*, 1997).

IX.XIV. Peso molecular de la MT de *M. squalida*.

La presencia de la proteína de bajo peso molecular, únicamente se obtuvo en la muestra completa, no para cada una de las fracciones con MT procedentes del HPLC debido a que lo máximo que se puede inyectar en el HPLC es de 100 μ l siendo diluida por los solventes A y B, por ello la cantidad de MT no fue detectable en PAGE-SDS.

Mediante electroforesis se obtuvo que en los tejidos de *M. squalida* se presenta una proteína de peso molecular aproximado de 6,000 Da, la cual coincide con la banda que fue detectada en el estándar de MT de hígado de conejo. El bajo peso molecular que presenta esta proteína es una de las características que distinguen a las MT, siendo registradas en algunos organismos como en la almeja *Scapharca inaequivalvis* (Serra *et al.*, 1995) de 10,000 Da. Aunque existen variaciones interespecíficas, reportadas en mejillones y almejas el peso molecular de las MT es de 7,400 Da (Viarengo *et al.*, 1981), y en moluscos como el ostión *Crassostrea gigas* y el calamar *Loligo vulgaris* colectados en las costas de Francia se presentan MT de 14,000 Da (Boutet *et al.*, 2002) y 6,500 Da (Bustamante *et al.*, 2002) respectivamente. La MT de hígado de conejo utilizada como estándar ha sido reportado con pesos moleculares entre 6,000 y 7,000 Da (Guo *et al.*, 1999), por ello se sugiere que la proteína de 6,000 Da de *M. squalida* pudiera ser una MT, sin embargo, es conveniente

realizar otros análisis, como el uso de anticuerpos específicos para MT como herramienta adicional para confirmar estos resultados.

X. CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos en este estudio se considera que la almeja *Megapitaria squalida* es una especie que de acuerdo a sus características es una buena especie bioindicadora de contaminación por Cd, siendo importante su continuo monitoreo debido a su alto consumo en la región.

El uso del HPLC-RP resulto ser un buen método para cuantificación de proteínas acomplejadas a Cd, sin embargo, es necesario corroborar con otra metodología (ELISA) para asegurarse que la proteína detectada al minuto 2.7 es una MT.

El rol de las MT fue observable, obteniendo una disminución de los niveles de MT en glándula digestiva cuando los organismos se encuentran en aguas no contaminadas, e incrementándose notablemente en branquias y glándula digestiva durante los primeros diez días de exposición a Cd.

Tanto la acumulación de Cd como la síntesis de MT fue mayor en la glándula digestiva de organismos expuestos a cadmio, adicionalmente se observó un incremento en los niveles de Cd en función al periodo de exposición, por ello se considera que este órgano proporciona la mayor información sobre el estado de contaminación de un sitio, a diferencia de las branquias y nefridio.

El análisis de Cd en la glándula digestiva sugiere que Punta Coyote, San Juan de la Costa y Balandra son los sitios con mayor contaminación de este metal. Aunque organismos de Punta Coyote y Balandra presentaron la mayor concentración de MT.

Es conveniente analizar el contenido de metales en la glándula digestiva, debido a que los resultados de Cd en el tejido completo fueron menores.

Mediante electroforesis PAGE-SDS se confirmó que en las muestras analizadas hay una proteína de bajo peso molecular (6,000 Da), sugiriendo que la presencia de una MT.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

Ahearn, H.R.H, Ahearn, G.A. y Gomme, J. (2000) Effects of cadmium on integumentary uptake of $^3\text{H-L}$ - histidine in the marine polychaete worm, *Neris succinea*. J Exp Biol 203: 2877-2885.

Ahearn, G.A., Mandal, P.K. y Mandal, A. (2004) Mechanism of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. J Comp Physiol B 174: 439-454.

Alhama, J., Romero-Ruiz, A. López-Barea, J. (2006) Metallothionein quantification in clams by reverse-phase high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. J. Chromatography A. 1107(1,2) 52-58.

Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Larroux, C., Regoli, F., Hummel, H. y Marjolina, S. (1998) Metallothioneins in arctic bivalves. Ecotoxicol Environ Saf. 41:96-102.

Baqueiro, C.E. y Stuardo J. (1977) Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria auriantica* (Sow, 1835), *Megapitaria squalida* (Sow, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) (Bivalvia: veneridae) de la Bahía de zihuatanejo e isla Ixtapa, Gro., México. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México, 4:161-208.

Baqueiro, C.E. y Aldana-Aranda, D. (2000) A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from México. Bulletin of Marine Science 66(1): 13-27.

Baudrimont, M., Metivaud, J. Maury-Brachet, R. Ribeyre, F. y Boudou, A. (1997) Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimen exposal to cadmium and inorganic mercury. Env Toxicol Chem 16(10): 2096-2105.

Bebianno, M.J. y Langston, W.J. (1991) Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Marine Biol. 108: 91-96.

Bebianno, M.J. y Langston, W.J. (1992) Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol. 103C: 79-85.

Bebianno, M.J. y Langston, W.J. (1993) Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. BioMetals 6: 239-244.

Bebianno, M.J., Serafim, M.A. y Rita, M.F. (1994) Involvement of metallothionein in cadmium accumulation and elimination in the clam *Ruditapes desacussata*. Bull Environ Contam Toxicol 53: 726-732.

Bebianno, M.J. y Serafim, M.A. (1998) Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve mollusks *Mytilus galloprovincialis* y *Ruditapes decussatus*. *The Science of the Total Environment* 214: 123-131.

Boisson, F., Goudard, F., Durand, J.P., Barbot, C., Pieri, J., Amiard, J.C., y Fowler, S.W. (2003) Comparative radiotracer study of cadmium uptake, storage, detoxification and depuration in the oyster *Crassostrea gigas*: potential adaptive mechanisms *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 254: 177-186.

Blackmore, G. y Wang, Wen-Xiong (2004) Relationships between metallothioneins and metal accumulation in the whelk *Thais clavigera*. *Mar Ecol Prog Ser.* 277: 135-145.

Bordin, G. (2000) Metallothionein. *Cell. Mol. Biol.* 46 (2): 123-128.

Bordin, G. Raposo, C. y Rodríguez, A.R. (1996) Characterization of metallothionein isoforms by reverse phase high performance liquid chromatography with on-line UV and electrochemical detection. *J. Liq. Chrom & Technol.* 19(19): 3085-3104.

Boutet, I., Tanguy, A., Auffret, M., Riso, R. y Moraga, D. (2002) Immunochemical quantification of metallothionein in marine mollusk: characterization of a metal exposure bioindicator. *Env. Toxicol. Chem.* 21(5) 1009-1014.

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

Boutet, I., Tanguy, A. Auffret, M. Riso, R. y Moraga, D. (2002) Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. *Envor. Toxicol Chem.* 21(5): 1009-1014.

Bustamante, P., Cosson, R.P., Galleen, I., Caurant, F. y Miramand, P. (2002) cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Mar Env Res.* 53: 227-241.

Casterline, J.L. y Yip, G. (1975) The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean and rat liver and kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3: 319-329.

Castro-Ortiz, J.L., Tripa-Quezada, A. y Anguas-Vélez, B. (1992) Crecimiento de la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) en Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Investigaciones Marinas CICIMAR*, 7(1): 1-7.

Consejo Minero (1999) Minera del estado de Baja California Sur. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (editor). Gobierno del Estado de B.C.S. Monografía Geologica. 107 p.

Cruz, A.R. y Villalobos, C.R. (1993). Shell length at sexual maturity and spawning cycle of mussel *Mytella guayanesis* (Bivalvia: Mytilidae) from Costa Rica. *Revista Biología Tropical*, 41(1): 89-92.

Cruz, O.R., Rojo, P.G., Godinez, O. y Nava, S. (1989) Topografía, hidrología y sedimentos de los márgenes de la laguna de La Paz, B.C.S. *Rev. Inv. Cient.* 1(3): 3-15.

Dallinger, R., Wang, y., Berger, B., Mackay, E.A. y Kaki, J.H.R. (2001) Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail, *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* 268: 4126-4133.

Dabrio, M., Rodríguez, A.R., Bordin, G., Bebianno, M.J., De Ley, M., Sestáková, I., Vask, M. y Nordberg, M. (2002). Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J. Inorganic Biochemistry* 88: 123-134.

Duquesne, S.J., Coll, J.C. (1995) Metal accumulation in the clam *Tridacna coreca* under natural and experimental conditions. *Aquat Toxicol* 32: 239-253.

Eisler, R. (1971) Cadmium Poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and Other Marine Organisms. *J.Fish.Res.Board Can.* 28(9):1225-1234.

Esclápes, M.M. (1999) Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. PDVSA, 23 p.

Geret, F., Jouan, Turpin, V., Bebianno, M. y Cosson, R. (2002) Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusk: the oyster (*Crassostrea gigas*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 15: 61-66.

Guo, X, Man, H.C., Guvremont, R., y Siu K.W.M. (1999). Analysis of metallothioneins by means of capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry with sheathless interfacing. *Rapid communications in mass spectrometry* 13: 500-507.

Hamza-Chaffai, A., Pellerin, J. y Amiard, J.C. (2003) Health assessment of marine bivalve *Ruditapes decussates* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Envir Intern* 28:609-617.

Hausback, B. (1984). Pacific section S.E.P. Cenozoic volcanic and tectonic evolution of Baja California Sur, Mexico. *Geology of the Baja California peninsula*, 219-236.

Henry, M., Huang, W., Cornet, C., Belluau, M. y Durbec, J.P. (1984) Accidental contamination by cadmium of the mollusk *Ruditapes decussates*: Bioaccumulation and toxicity (LD 50, 96H). *OCEANOL ACTA* 7: 329-335.

Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P. y Vasak., M. (2001) Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 55: 133-145.

Irwin, R.J. (1997) Environmental contaminants encyclopedia cadmium entry. National park services. Colorado State University. 88 p.

Johansson, C., Cain, D.J. y Luoma, S.N. (1986) Variability in the fractionation of Cu, Ag and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Marine Ecology*. 28: 87-89.

Kägi, J.H. y Schäffer, A. (1989) Biochemistry os metallothioneins. En: *Perspectivas in biochemistry I*. Editor: Neurath H. Am Soc Chem. Washington D.C. 46-52.

Keen, A.M. (1971) Sea shells of tropical West America. Marine molluscs from Baja California to Perú. California, Stanford University Press, Stanford, 1025 p.

Klaassen, C.D., Liu, J. y Choudhuri, S. (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 267-294.

Klauser, S., Kagi, J.H.R. y Wilson, K. (1983) Characterization of isoprotein patterns in tissue extracts and isolated simples of metallothioneins by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Biochem J.* 209: 71-80.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 677-680.

Langston, W.J. y Zhou (1987a) Cadmium accumulation, distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like protein are envolved. *Marine Environ. Res.* 21: 225-237.

Leland, H.V. y Kuwabara, J.S. (1985) Trace metals. En: Rosejadi, G. (1992) *Metallothioneins in metal regulation and toxicity in acuatic animals*. *Aquatic Toxicology*. 22: 81-114.

Malaysian Food Regulation (1985) Malaysian law on food and drugs. Malysian Law Publishers. 20 p.

Mann, S.S. y Ritchie, G.S.P. (1995) Forms of cadmium in sandy soils alter amendment with soils of higher fixing capacity. *Env. Poll.* 87: 23-29.

Margoshes, M. y Valee, B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813-4814.

Matthew, J., Ringwood, A.H., Schey, K., Warr, G.W. y Chapman, R.W. (2004) Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.* 271: 1702-1712.

Méndez, L., Salas-Flores, L.M., Arreola-Lizarraga, A., Alvarez-Castañeda, S.T. y Acosta, B. (2002) Heavy metals in clams from Guaymas Bay, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68: 217-223.

Méndez, L., Palacios, E., Acosta, B., Monsalvo-Spencer, P. y Álvarez-Castañeda, T. (2006). Heavy metals in the clam *Megapitaria squalida* collected from wild-impacted sites in Baja California, México. Biological trace element research. 110: 1-11.

Mouneyrac, C., Amiard, J.C. y Amiard-Triquet, C. (1998) Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oyster *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. Marine Ecology Progress Series 162: 125-135.

Mouneyrac, C., Berthet, B.A. y Amiard, J.C. (1999). Cd distribution in the tissues of oystress (*Crassostrea gigas*) exposed chronically *in situ*. Water, Air, and Soil Pollution 112: 187-196.

Muñoz-Barbosa, A. (1997) Variabilidad espacial y temporal de metales pesados en la costa noroccidental de Baja California mediante el uso de *Mytilus californianus* como bioindicador. Tesis de Maestría, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 106 p.

Nelson, D.A., Miller, J.E. y Calabrese, A. (1988) Effect of Heavy Metals on Bay Scallops, Surf Clams, and Blue Mussels in Acute and Long-Term Exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17(5):595-600.

Nöel-Lambot, F. (1976) Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis* existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins. Experiencia 32: 324-326.

Nöel-Lambot, F., Bouquegneau, J.M., Frankenne, F. y Distèche, A. (1980) Cadmium, zinc and copper accumulation in limpets (*Patella vulgata*) from Bristol Channel with special referente to metallothionein. Mar Ecol Prog Ser 2: 81-89.

Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de medio ambiente recursos naturales y pesca. D.O.F. 10 p.

Norma oficial mexicana NOM-031-SSA1-1993, bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. Secretaria de salud. D.O.F.14 p.

Nordberg, G. F. y Nordberg, M. (1988) Biological Monitoring of Toxic Metals Eds., Plenum Press, New York, 151 p.

Olafson, R. W., y Thompson, J.A.J. (1974) Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28: 83-86.

Olafson, R. W., Kearns, A. y Sim, R.G. (1979). Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab *Squilla serrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B: 417-424.

Olguín-Espinoza, G. (1989), Metales traza en moluscos del Valle de Mexicali y Alto Golfo de California. Tesis de Licenciatura, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 61 p.

Olsson, P.E., Aux., C. y Förlin, L. (1987) Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol Biochem* 3: 39-47.

Olsson, P.E. y Hogstrand, C. (1987b) Improved separation of perch liver metallothionein by fast protein liquid chromatography. *J. Chromat.* 402: 293-299.

Otvos, J.D. y Armitage, I.M. (1980) Structure of the metal cluster in rabbit liver metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (12): 7094-7098.

Palmiter, R.D. (1994) Regulation of metallothionein genes by heavy metal appears to be mediated by a zinc sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor MTF-1. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 1219-1223.

Pavicic, J. y Jarvenpää, T. (1974) Cadmium Toxicity in Adults and Early Larval Stages of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Proc. Comparative Studies of Food and Environmental Contamination*, Int. Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 188 p.

Pedersen, S. N. y Lundebye, A.K. (1996) Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Mar Env Res.* 42: 241-246.

Phillips, D.J.H. (1983) Trace metals of toxicological significance to man in Hong Kong seafood. *Environ. Pollut. Ser.* 17: 27-45.

Rainbow, S.P. (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Poll. Bull.* 31: 183-192.

Rivero, L.E. (1999) Comparación de la concentración de Cd entre el Cd entre el tejido blando y la concha de *Mytilus californianus* en una zona de surgencias. Tesis de Maestría, CICESE, Ecología Marina, 81 p.

Romeo, M. y Gnassia-Branelli, M. (1995) Metal distribution in different tissues and in clam subcellular fraction of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, Koper or zinc. *Comp Biochem Physiol* 111C: 457-463.

- Romero-Vargas, I.P.M. (1995) Metales pesados y su fracción química en sedimentos de la Bahía Todos Santos, Baja California, México. Tesis de Maestría, UABC, Facultad de Ciencias Marinas, 86 p.
- Ropes, J.W. (1968) Reproductive cycle in the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. *Biology Bulletin*, 135(2): 349-365.
- Roesijadi, G. 1980. Influence of copper on the clam *Protothaca staminea*: effects on gills and occurrence of copper-binding proteins. *Biol. Bull.*, 158: 233-247.
- Roesijadi, G. 1982. Uptake and incorporation of mercury into mercury-binding proteins of gills of *Mytilus edulis* as a function of time. *Mar. Biol.*, 66: 151-157.
- Roseijadi, G., Young, J.S., Crecelius, E.A., Thomas, L.E. (1985) Distribution of trace metals in the hidrothermal vent clam y *Calpytogenia magnifica*. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 6: 311-324
- Roseijadi, G. (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity un aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.
- Roseijadi, G.(1996) Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Bioch. Physiol.* 113C: 117-123.
- Roseijadi, G. y Klerks, P.L. (1989) Kinetic análisis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exp. Zool.* 25: 1-12.
- SEPESCA (1994) Atlas pesquero de México. Pesquerías relevantes. INP. 125 p.
- Serafim, M.A. y Bebianno, M.J. (2001) Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Env. Toxicol. Chem.* 20(3): 544-522.
- Serafim, M.A., Company, R.A., Bebianno, M.J. y Langston, W.J. (2002) Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Env. Res.* 54: 361-365
- Serra, R., Carpenè, E., Marcantonio, C. y Isani, G. (1995). Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in the bivalve *Scapharca inaequivalvis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 165-174.
- Serrano, V.J. (2005) Evaluación del riesgo por metales pesados al consumir almeja *Megapitaria squalida* capturada en Bahía La Paz, B.C.S., México. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de La Paz, B.C.S., 92 p.

Singh, C.J., Vélez, J.A. y Fajardo, M.C. (1991) Estudio poblacional de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Soweby, 1835) en Punta Coyote, Bahía de La Paz, B.C.S., México. Ciencia Pesquera, Instituto Nacional de la Pesca. México, 8: 7-22.

Tanguy, A. Boutet, I., Riso, R., Boudry, P., Auffret, M y Moraga, D. (2003) Metallothionein genes in the European flat oyster *Ostrea edulis*: a potencial ecological tool for environmental monitoring. Mar Ecol Prog Ser 257: 87-97.

USFDA (Food and Drug Administration of the United States). (2003) National shellfish sanitation program. Guide for the control of Molluscan Shellfish.

Vetillard, A. y Bailhache, T. (2004) Cadmium: An endocrine disrupted that affects gene expresión in the liver and brain juvenile rainbow trout. Biology of reproduction 72: 119-126.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Zanicchi, G. y Orunesu M. (1981) Síntesis of Cu-binding proteins in different tissues of mussels exposed to the metal. Mar Poll Bull. 12: 347-350.

Villalejo M.F., García, M.G., Ochoa, B.R.I. y García, G.A. (1991) Ciclo reproductivo de *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en Bahía Concepción, Baja California Sur, México. Boletín científico INPA 4: 1-10.

Villaseñor-Casales, A. (1979) Distribución vertical de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, durante la primavera de 1976. Calif Coop Ocean Fish Invest Rep 20: 146-149.

World Health Organization (1992) International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 134, Geneva. 450 p.

Wolf C., Rösick, U. y Bräter, P. (2000) Quantification of the metal distribution in metallothioneins of the human liver by HPLC couple with ICP-AES. Fresenius J Anal Chem. 368: 832-843.

Yamagata, N., y Shigematsu I. (1970) Cadmium pollution in perspective. Bull Inst. Publ. Health, 19: 1-27.

XII. ANEXOS.

Concentración (media±error std.) de MT sintetizadas ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) a diferentes concentraciones de exposición a Cd en 10, 20 y 30 días en tres órganos de *Megapitaria squalida*.

Tratamiento	C-10	C-20	C-30	0.2-10	0.2-20	0.2-30	0.5-10	0.5-20	0.5-30
Branquia	12.084 ^{ABC} ±3.007	12.375 ^A ±0	6.809 ^B ±1.465	18.074 ^{CD} ±2.562	12.354 ^{ACD} ±0.652	10.225 ^{ABD} ±2.359	12.452 ^{ABD} ±6.132	9.644 ^{ABD} ±2.683	11.988 ^{ABD} ±3.891
Glándula	14.789 ^a	14.068 ^a	6.133 ^c	22.630 ^b	15.524 ^a	13.802 ^a	23.61 ^b	13.154 ^a	16.612 ^{ab}
Digestiva	±2.387	±3.254	±1.005	±1.955	±2.048	±2.978	±0.819	±3.448	±6.150
Nefridio	13.864 ¹ ±0.098	9.748 ²³ ±1.646	11.642 ¹²³ ±1.795	12.99 ¹²³ ±2.023	12.098 ¹²³ ±0.950	11.790 ¹²³ ±1.875	11.178 ³ ±0.581	12.579 ¹²³ ±2.709	12.290 ¹²³ ±1.579

C= control, 0.2 y 0.5 = 0.2, 0.5 mg l⁻¹ Cd a los cuales fueron expuestas durante 10, 20 y 30 días. Las letras y números diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) únicamente entre tratamientos en cada órgano.

Concentración (media±error std.) de Cadmio ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo) en diferentes órganos de almejas (n=3) expuestas a diferentes concentraciones de Cd durante 10, 20 y 30 días.

Tratamiento	C-10	C-20	C-30	0.2-10	0.2-20	0.2-30	0.5-10	0.5-20	0.5-30
Branquia	0.192 ^{BC} ±0.043	0.148 ^C ±0.002	0.121 ^B ±0.017	0.814 ^A ±0.236	1.535 ^{AD} ±0.700	1.038 ^A ±0.332	1.679 ^{AD} ±0.226	2.549 ^{AD} ±1.104	2.818 ^D ±0.911
Glándula	2.084 ^a	3.5 ^b	2.554 ^{ab}	5.434 ^{abc}	10.828 ^{cd}	6.553 ^{bce}	7.362 ^{bce}	14.08 ^d	16.327 ^{de}
Digestiva	±0.231	±0.540	±0.838	±1.765	±2.817	±2.591	±2.051	±0.499	±3.954
Nefridio	1.213 ¹⁴ ±0.406	0.350 ²⁴ ±0.178	0.161 ² ±0.110	0.821 ¹⁴ ±0.190	0.948 ¹⁴ ±0.268	1.915 ¹³ ±0.650	0.765 ¹² ±0.445	3.266 ¹³ ±1.284	3.308 ³ ±0.701

C= control, 0.2 y 0.5 = 0.2, 0.5 mg l⁻¹ Cd a los cuales fueron expuestas durante 10, 20 y 30 días. Las letras y números diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) únicamente entre tratamientos en cada órgano.

Concentración (media±error std.) de MT sintetizadas ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) en tres órganos de *Megapitaria squalida* colectadas en cuatro estaciones de Bahía La Paz, B.C.S.

Estaciones	1	2	3	4
Branquia	13.756 ^{AB} ±2.113	9.222 ^A ±1.163	11.950 ^{AB} ±1.825	14.047 ^B ±1.567
Glándula Digestiva	13.998 ^a ±1.152	10.230 ^b ±1.272	11.932 ^{ab} ±1.944	13.898 ^{ab} ±1.944
Nefridio	14.336 ¹ ±2.244	6.904 ² ±1.340	5.090 ² ±0.808	12.854 ¹ ±1.249

1: Punta Coyote, 2: San Juan de La Costa, 3: Quelele, 4:Balandra. Letras y números diferentes en una misma fila, indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$).

Concentración (media±error std.) de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ p.h.) en tres órganos de *Megapitaria squalida* colectadas en cuatro estaciones de Bahía La Paz, B.C.S. mostrando las diferencias estadísticas por estación entre órganos únicamente, no entre estaciones.

Estaciones	1	2	3	4
Branquia	0.185 ^A ±0.016	0.232 ^A ±0.055	0.185 ^A ±0.013	0.180 ^A ±0.011
Glándula digestiva	2.873 ^a ±0.245	2.951 ^a ±0.329	1.995 ^b ±0.214	2.980 ^a ±0.259
Nefridio	0.235 ¹² ±0.119	0.163 ¹ ±0.059	0.062 ¹² ±0.029	0.024 ² ±0.016

1: Punta Coyote, 2: San Juan de La Costa, 3: Quelele, 4:Balandra. Letras y números diferentes en una misma fila, indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$).