



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO DE BIOMARCADORES DE
EXPOSICION AL PLAGUICIDA ORGANOCOLORADO
LINDANO (γ HCH) EN EL OSTION DEL PACIFICO
(*Crassostrea gigas*, THUNBERG 1795).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Gerardo Alfonso Anguiano Vega

La Paz, B.C.S. Junio del 2008

El universo (que otros llaman Biblioteca) se compone de un número indefinido y talvez infinito de galerías hexagonales... La distribución de las galerías es invariable. Veinte anaqueles, a cinco largos anaqueles por lado, cubren todos los lados menos dos.

A cada uno de los muros de cada hexágono corresponden cinco anaqueles; cada anaquel encierra treinta y dos libros de formato uniforme, cada libro es de cuatrocientas diez páginas; cada página de cuarenta renglones, cada renglón, de unas ochenta letras de color negro...

Un bibliotecario pensador observó que todos los libros, por diversos que sean, constan de elementos iguales: el espacio, el punto, la coma, las ventidós letras del alfabeto. También agregó un hecho que todos los viajeros han confirmado. *No hay, en la vasta Biblioteca, dos libros idénticos.* De esas premisas incontrovertibles dedujo que la biblioteca es total y que sus anaqueles registran todas las posibles combinaciones de los ventitantos símbolos ortográficos (número aunque vastísimo no infinito) o sea todo lo que es dable expresar: en todos los idiomas. Todo: la historia minuciosa del porvenir, las autobiografías de los arcángeles, el catálogo fiel de la Biblioteca, miles y miles de catálogos falsos...

Otros inversamente, creyeron que lo primordial era eliminar las obras inútiles. ... pero quienes deploran los "tesoros" que su frenesí destruyó, negligén dos hechos. Uno: la Biblioteca es tan enorme que toda reducción de origen humano resulta infinitesimal. Otro: cada ejemplar es único irremplazable, pero (como la Biblioteca es total) hay siempre varios centenares de miles de facsímiles imperfectos: de obras que no difieren sino por una letra o por una coma... sospecho que la especie humana- la única- está por extinguirse y que la Biblioteca perdurará: iluminada, solitaria, infinita, perfectamente inmóvil, armada de volúmenes preciosos, inútil, incorruptible, secreta...

La Biblioteca de Babel.
Jorge Luis Borges, 1941.

DEDICATORIA.

Se gira el cerrojo y se abre el portón de acceso al salón de los hexágonos periódicos; para comenzar y continuar el peregrinar por las galerías nunca antes visitadas.

A Laura, Ana y Jimena.

Esta empresa fue cotidianamente elaborada por varias decenas de personas que sin percatarse: se involucraron, enmendaron y facilitaron la tarea. Con la misma intensidad que esta obra intenta a portar en el conocimiento y el desarrollo especializado, en cada párrafo se encierra el esfuerzo, esmero y dedicación para su buen término, como tributo de gratitud a todos ellos coparticipes, colaboradores, cooperadores, inquisidores, jueces, verdugos, musas y revulsivos que a la par del autor obtenemos el logro conjunto de éstas páginas impresas.

Se dedica las siguientes líneas a la mujer y los hijos, a los padres y hermanos, a los maestros y guías, a los compañeros y amigos, a las autoridades y directores, a las escuelas e instituciones, a los grupos y compañías que aportaron su valiosa porción en la inminente culminación del proyecto, meta de motivación académica, personal y familiar.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. En el laboratorio de Reproducción de Organismos Acuáticos y Toxicogenómica a cargo de la Dra. Celia Vázquez Boucard. Depto. Manejo Ambiental y Conservación.

Parte del trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Toxicogenómica a cargo del Dr. Emilio Rojas del Castillo, Depto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, D.F. México. Y en el laboratorio de Genética Molecular de Moluscos Bivalvos a cargo del Dr. Darío Moraga. Instituto Universitario Europeo de la Mar, Universidad de Bretaña Occidental, Brest. Francia.

Agradezco el apoyo y dirección de la Dra. Celia Vázquez Boucard y la participación de cada uno de los miembros de Comité Sinodal. Dr. Emilio Rojas del Castillo, Dra. Alejandra García Gasca, Dr. Pedro Cruz Hernández y Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

Agradezco al Dr. Emilio Rojas por permitirme familiarizarme con las técnicas de evaluación para toxicidad celular y genotoxicidad en su laboratorio y por todos los consejos y sugerencias sobre el desarrollo y enfoque del trabajo. De igual manera agradezco al Dr. Darío Moraga y a su grupo de trabajo, principalmente a la Dra. Isabelle Boutet y Dra. Elise David por apoyarme en la elaboración de las genotecas de expresión diferencial y por las facilidades otorgadas para la secuenciación de las clonas obtenidas.

Agradezco al personal administrativo y técnico del CIBNOR que participó en el desarrollo del proyecto. En especial al M en C. Armando Monge encargado del laboratorio Ecofisiología de Organismos Acuáticos por la instalación de la cámara para el desarrollo del bioensayo. A todo el personal del Depto. de Posgrado a cargo de la Dra. Thelma Castellanos, que amablemente me atendieron en todas mis solicitudes.

Agradezco a Phillippe Danigo, a la empresa ostrícola “Sol Azul” y al Comité de Sanidad Acuícola de B.C.S., por facilitar los organismos utilizados en el proyecto.

Este trabajo fue financiado en parte por las aportaciones de las siguientes entidades:

CONACYT Proyecto No. 38827-B

Beca CONACYT No. 158430

Dirección de Estudios de Posgrado. CIBNOR, S.C:

RESUMEN.

En la actualidad, el uso intensivo de compuestos agroindustriales genera un grave problema mundial por contaminación de aire, suelo y agua. Los sistemas biológicos más vulnerables a la contaminación por este tipo de contaminantes son los sistemas costeros. Ante tal situación se han celebrado una serie de convenciones en las cuales se propone erradicar y eliminar un conjunto de productos altamente contaminantes y persistentes en el medio natural, dichos contaminantes son conocidos como compuestos orgánicos persistentes (COPs). En dicha lista se incluyen 17 productos donde 12 de éstos son plaguicidas; en este trabajo presentamos la caracterización de uno de estos plaguicidas el lindano o gama-hexacloro ciclohexano (γ HCH).

Se realizaron bioensayos de exposición en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* con distintas concentraciones del tóxico y con periodos de exposición diversos. El efecto tóxico del γ HCH fue evaluado usando diferentes biomarcadores de efecto o exposición. Se observaron efectos significativos desde las menores concentraciones utilizadas y fueron relacionadas con el nivel de organización biológica. El orden de sensibilidad de los bioindicadores de mayor a menor fue el siguiente:

Disminución de la actividad de alimentación > inhibición de actividad enzimática por AChE > daño en la molécula de DNA > viabilidad celular > efecto letal.

En lo que respecta al orden de sensibilidad de mayor a menor de los niveles de organización biológica se reporta como:

Efecto en la actividad fisiológica > alteraciones funcionales y estructurales de moléculas > toxicidad celular > mortalidad de los organismos.

Adicionalmente se evaluó el efecto de una exposición crónica subletal de γ HCH en la expresión de genes en tejido de la glándula digestiva. Se obtuvieron más de 1200 secuencias de fragmentos génicos diferencialmente expresados (etiquetas de secuencias expresadas ó EST) por exposición a γ HCH. Análisis bioinformáticos de estas EST mostraron un alto porcentaje de secuencias sin similitud a proteínas o genes registrados en GenBank (41.6%). En las genotecas de genes inducidos se reconoció un incremento en el número de genes ribosomales y factores de transcripción con porcentajes superiores al 26%. Se reconocieron más de 160 genes putativos con alta similitud a las EST de genes inducidos o inhibidos. Dentro de esta lista de genes se encuentran genes relacionados con la respuesta a estrés ambiental y estrés oxidante (HSP70, SOD, ferritina, SHG, óxido nítrico sintasa), genes relacionados con metabolismo de lípidos y otras macromoléculas (delta-9-desaturasa, proteína Myc, proteasas), genes relacionados con transporte de macromoléculas o iones (dineína,

transportador de taurina, canales iónicos) y genes involucrados en el ciclo celular o apoptosis como factores de necrosis tumoral (proteína QM, proteína Ran).

Se evaluó la cinética de expresión de cuatro EST correspondientes a la SOD, ferritina GF2, proteína QM y proteína SHG. Obteniendo respuestas distintas en cada uno de los EST evaluados. La SOD mostró una respuesta intensa y temprana, posteriormente disminuyó su expresión. La ferritina incrementó su expresión de una forma retardada, sólo después de los 15 y 30 días. Las proteínas QM y SHG mostraron incrementos en la expresión mantenidos durante todo el periodo de exposición. La proteína SHG fue la que menor nivel de expresión presentó previo a la exposición de γ HCH y la que mostró las mayores diferencias de los niveles de expresión entre los organismos expuestos y los organismos control.

Estos resultados aportan importante información sobre las características tóxicas del γ HCH en especies de molusco bivalvos como *C. gigas*; la respuesta biológica que esta especie es capaz de presentar ante eventos de exposición a contaminantes químicos y una serie de genes interesantes para emplearse como posibles biomarcadores de exposición a plaguicidas organoclorados en especies de moluscos bivalvos.

Palabras Clave:

Toxicología

Crassostrea gigas

Lindano

Dra. Celia Vázquez Boucard
Director de Tesis

ABSTRACT.

Nowadays, the employment of agrochemical compounds produces a very dangerous world problem caused by air, ground, and water pollution. Coastal systems are the most vulnerable to pollution by agrochemical compounds. For this reason, several conventions were celebrated with the aim of regulating and eliminating a group of highly toxic and persistent chemical compounds in the environment. Such compounds are known as persistent organic pollutants (POPs). The list includes 17 chemicals where 12 of these are pesticides.

In this work, we present the toxic characterization of one of these pesticides, the organochlorinated pesticide lindane (γ HCH). Exposure bioassays were performed in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with several concentrations of pesticide and with diverse time periods. The toxic effect of γ HCH was evaluated using different biomarkers of effect or exposure. Significant effects were observed at the lowest concentrations of γ HCH, and were related with the biologic organizational level of each biomarker tested.

Sensitivity of the biomarkers from the highest to the lowest was:

Decrease of feeding activity > inhibition of enzymatic activity of AChE >
Breaks in DNA molecule > Cell viability > Lethal effect.

Sensitivity of the biological organizational level from the highest to the lowest was:

Physiological activity response > Alteration on function or structure of biomolecules > Cell toxicity > Dead of organisms.

Additionally, the effect of a chronic and sub lethal exposure to γ HCH in the gene expression in digestive gland tissue was evaluated. More than 1200 sequences of EST expressed differentially by a γ HCH were obtained. The bioinformatics analysis of EST showed a high percentage of sequences without hit or similarity to genes or proteins registered in GenBank database (41.6%). In the gene libraries of genes induced, we recognized an increment in the number of ribosomal genes and transcription factors with percentages up of 26%, and more than 160 putative genes with high similarity to EST of induced or inhibited genes.

In this group of genes, we observed genes related to environmental stress response and oxidative stress (HSP70, SOD, ferritin, SHG, nitric oxide synthase); genes of lipid metabolism and metabolism of other macromolecules (delta-9-desaturase, Myc protein, proteases), genes related with the transport of ions and macromolecules (dynein, taurine transporter, ionic channels), and genes involved in cellular cycle or necrosis tumoral factors (QM protein, Ran protein).

We evaluated the kinetic gene expression of 4 of these EST with similarity to SOD, ferritin GF2, QM protein and SHG protein, and obtained several responses of these genes to γ HCH exposure. The EST similar to SOD showed an early intense response, and this response was reduced to prolonged exposures. Ferritin increased the expression more slowly only after 15 and 30 days. The QM and SHG proteins showed an increment in the expression values in all the periods evaluated, from the beginning to the end of the bioassay. The SHG protein showed the lowest value of expression before exposure, and the highest differences between expression values of control and the exposed organisms

These results provide very important information about the toxic characteristics of γ HCH in bivalve mollusk species, like *C.gigas*; the biological response that this specie develops against chemical pollutant exposure; and a series of interesting genes to be employed as biomarkers of exposure to organochlorine pesticides in bivalves species.

Key words:

Toxicology

Crassostrea gigas

Lindane

CONTENIDO.

1. INTRODUCCION.

1.1. Necesidad del uso de plaguicidas y sus repercusiones.....	1
1.2. Riesgos de exposición a plaguicidas en la población.....	2
1.3. Daño por liberación de plaguicidas al ambiente.....	4

2. ANTECEDENTES.

2.1. Denominación de algunos plaguicidas como contaminantes orgánicos persistentes (COPs).....	7
2.2. Clasificación de los plaguicidas.....	8
2.2.1. Plaguicidas organoclorados: Características químicas, tóxicas y efectos al ambiente.....	9
2.3. Lindano: Historia, obtención y características químicas.....	12
2.3.1. Uso agrícola, farmacéutico e industrial del lindano.....	15
2.3.2. Degradación y biodegradación del lindano en el ambiente.....	15
2.3.3. Efecto de lindano al ser humano, a la fauna y a las poblaciones silvestres.....	17
2.3.4. Presencia del lindano y sus isómeros en México y el mundo.....	20
2.4. Especies indicadoras de contaminación: Descripción, selección y ventajas de su uso.....	22
2.4.1. Moluscos bivalvos y gasterópodos en estudios toxicológicos.....	24
2.4.2. Modelo biológico de estudio: Ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg 1795).....	25
2.4.2.1. Información taxonómica y estructural de la especie.....	25
2.4.2.2. Anatomía, fisiología y metabolismo de <i>C. gigas</i>	27
2.4.2.3. Sistemas y procesos con posible afección por contaminación química.....	31
2.4.2.4. Trabajos de toxicología ambiental en <i>C. gigas</i>	35
2.4.2.5. Justificación de uso de <i>C. gigas</i> como modelo biológico de contaminación ambiental.....	36
2.5. Biomarcadores de contaminación.....	37
2.5.1. Clasificación y uso de biomarcadores en ciencias ambientales.....	40
2.6. Toxicogenómica y sus potencialidad en ecotoxicología y toxicología ambiental.....	43
3. HIPOTESIS.....	47

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.....	48
4.2. Objetivos específicos.....	48

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Pureza y calidad del material químico.....	50
5.1.2. Obtención y preparación del plaguicida para los bioensayos de exposición.....	50
5.2. Obtención, mantenimiento y aclimatación de los organismos en el laboratorio.....	51
5.3. Bioensayo de exposición a concentración letal.....	51
5.3.1. Cálculo de mortalidad y concentración letal media (CL ₅₀).....	52

5.4. Bioensayo de exposición y efecto adverso.....	52
5.4.1. Prueba de citotoxicidad en hemocitos.....	53
5.4.2. Prueba de genotoxicidad en hemocitos.....	54
5.4.3. Prueba de efecto en filtración de alimento.....	55
5.4.4. Prueba de actividad enzimática de la AChE.....	56
5.5. Bioensayo de exposición crónica subletal.....	57
5.5.1. Preparación de las muestras para la elaboración de las genotecas de expresión diferencial.....	58
5.5.2. Análisis de las etiquetas de secuencias expresadas (EST).....	61
5.5.3. Preparación de las muestras para la evaluación de la cinética de expresión génica.....	61
5.5.4. Análisis semicuantitativo de la cinética de expresión génica.....	62
5.6. Análisis estadísticos.....	64
6. RESULTADOS.	
6.1. Bioensayo de exposición a concentración letal de γ HCH.....	66
6.2. Efecto citotóxico del lindano en hemocitos de <i>C. gigas</i>	67
6.3. Efecto genotóxico del lindano en hemocitos de <i>C. gigas</i>	69
6.4. Efecto de lindano en la actividad AChE en branquias de <i>C. gigas</i>	73
6.5. Efecto de lindano en la actividad de alimentación en <i>C. gigas</i>	74
6.6. Efecto de la exposición crónica subletal de lindano en la expresión de genes de la glándula digestiva de <i>C. gigas</i>	77
6.7 Evaluación de genes diferencialmente expresados por la exposición a lindano.....	87
7. DISCUSIÓN.	
7.1. Sensibilidad del ostión <i>C. gigas</i> a la exposición de lindano	94
7.2. Efectos citotóxicos y genotóxicos del lindano en hemocitos de <i>C. gigas</i>	100
7.3. Biomarcadores de exposición o efecto de lindano en <i>C. gigas</i>	106
7.4. Efecto en la expresión génica de la glándula digestiva de <i>C. gigas</i> por exposición crónica subletal a lindano.....	108
8. CONCLUSIONES	118
9. PERSPECTIVAS	122
10. LITERATURA CITADA	124
11. APÉNDICES	158

(A) Anguiano, G., *et al.* 2007. Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to lindane (γ -HCH) exposure under experimental conditions. *ET&C*. 26(10): 2192-2197.

(B) Anguiano, G., *et al.* 2008. Acetylcholinesterase activity in the gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a feasible biomarker of exposure to Oxamyl, Carbofuran, Dichlorvos, and Lindane. *Environmental Toxicology*. (En revision).

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura química del lindano (γ HCH).....	12
Figura 2. Clasificación taxonómica del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i>	26
Figura 3. Anatomía general del ostión <i>Crassostrea</i> sp.....	28
Figura 4. Esquema de las clases de biomarcadores en el proceso de asimilación desde la exposición hasta el surgimiento de la enfermedad.....	42
Figura 5. Proceso de supresión por hibridación sustractiva.....	60
Figura 6. Curva dosis-respuesta de la mortalidad acumulada de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a diferentes concentraciones de γ HCH durante 12 días.....	67
Figura 7. Ajuste de la mortalidad por el método Probit para calcular la concentración letal media (CL ₅₀) de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a diferentes concentraciones de γ HCH durante 12 días.....	68
Figura 8. Efecto citotóxico del γ HCH en hemocitos de <i>Crassostrea gigas</i>	69
Figura 9. Efecto tóxico del γ HCH por rompimiento del DNA en hemocitos de <i>Crassostrea gigas</i>	70
Figura 10. Correlación de la concentración de γ HCH y daño al DNA en hemocitos de <i>Crassostrea gigas</i>	71
Figura 11. Frecuencia de hemocitos por nivel de daño al DNA de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a diferentes concentraciones de γ HCH.....	72
Figura 12. Inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en branquia de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a γ HCH.....	73
Figura 13. Efecto del γ HCH en la actividad de filtración de alimento.....	76
Figura 14. Porcentaje de las secuencias obtenidas de las genotecas de glándula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH durante 15 días.....	79
Figura 15. Porcentaje de las secuencias obtenidas de las genotecas de glándula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> expuesto a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH durante 30 días.....	80
Figura 16. Expresión de genes inducidos o inhibidos por exposición a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH.....	89
Figura 17. Expresión de genes inducidos o inhibidos por exposición a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH.....	90
Figura 18. Expresión del gen inducido por exposición a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH.....	91
Figura 19. Cinética de expresión de genes presentes en las genotecas de glándula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> de organismos expuestos a 0.2 mg L ⁻¹ de γ HCH.....	92

Figura 20. Sensibilidad de biomarcadores a la exposición por 12 días a γ HCH..... 107

LISTA DE TABLAS

TABLA I. Propiedades fisico-químicas del lindano.....	14
TABLA II. Secuencias de los <i>primers</i> diseñados para la cinética de expresión.....	63
TABLA III. Mortalidad diaria y acumulada de organismos <i>Crassostrea gigas</i> expuestos a diversas concentraciones de γ HCH.....	66
TABLA IV. Efecto de exposición a γ HCH en organismos <i>Crassostrea gigas</i> evaluado a diferentes niveles de organización biológica.....	74
TABLA V. Resumen general de secuencias obtenidas por las genotecas de glándula digestiva de <i>Crassostrea gigas</i> en organismos expuestos a 0.2 mg L^{-1} de γ HCH.....	78
TABLA VI. Genes putativos inducidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L^{-1} durante 15 días.....	82
TABLA VII. Genes putativos inhibidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L^{-1} durante 15 días.....	84
TABLA VIII. Genes putativos inducidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L^{-1} durante 30 días.....	85
TABLA IX. Genes putativos inhibidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L^{-1} durante 30 días.....	87

ABREVIATURAS.

°C	grados centígrados
%	porcentaje
αHCH	isómero alfa del hexacloro ciclohexano
βHCH	isómero beta del hexacloro ciclohexano
γHCH	isómero gama del hexacloro ciclohexano
μg	microgramos
μL	microlitros
μM	micromolar
40s	subunidad menor del ribosoma de eucarionte
60s	subunidad mayor del ribosoma de eucarionte
AChE	acetil colinesterasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
<i>Anabaena sp.</i>	organismos del Género <i>Anabaena</i>
BrEt	bromuro de etidio
CAS	servicio de resúmenes químicos
cc	centímetros cúbicos
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CL ₅₀	concentración letal media
<i>Crassostrea sp.</i>	organismos del Género <i>Crassostrea</i>
<i>C. gigas</i>	<i>Crassostrea gigas</i>
<i>C. virginica</i>	<i>Crassostrea virginica</i>
cm	centímetros
COP	contaminante orgánico persistente
DDT	dicloro difenil tricloroetano
DL ₅₀	dosis letal media
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DS	desviación estándar
E	valor de similitud entre dos secuencias génicas
EDTA	ácido etilendiamina triacético
EST	etiqueta de secuencia expresada
FAO	Organización para la agricultura y alimentación
FDA	diacetato de fluoresceína
FDA-BrEt	tinción dual diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio
g	gramos
<i>g</i>	gravidades
GABA	ácido gama-aminobutírico
GPx	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
GST	glutación S-transferasa
h	horas
HCH	hexacloro ciclohexano
HPA	hidrocarburos poliaromáticos

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HSP70	proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
<i>I. galbana</i>	<i>Isochrysis galbana</i>
INE	Instituto Nacional de Ecología de México
K _{ow}	coeficiente de partición en octanol/agua
K _{oc}	coeficiente de absorción en carbono orgánico
L	litro
log	logaritmo base 10
M	molar
mA	miliamperes
MAP kinasa	cascada de transducción de señales inducidas por proteínas activadas por mitógenos
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
Myc	proteína nuclear myc
MXR	proteína de respuesta multixenobiótica
m/v	proporción de masa/volumen
<i>M. galloprovincialis</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
n	número de datos por grupo experimental
nm	nanometros
NRC	Concilio Nacional de Investigación de los Estados Unidos de América
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
org	organismo
p	valor de confianza estadística por probabilidad
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCB	bifenilos policlorados
pH	potencial de H ⁺ , logaritmo negativo de la concentración de protones
<i>Pleurotus sp.</i>	organismos del Género <i>Pleurotus</i>
POPRC	Comité de investigación de contaminantes orgánicos persistentes
p/v	proporción de peso/volumen
<i>Pseudomonas sp.</i>	organismos del Género <i>Pseudomonas</i>
QM	proteína de necrosis tumoral QM
r	coeficiente de correlación lineal
r ²	coeficiente de determinación
Ran	proteína Ran del ciclo celular
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
RSA I	enzima digestiva de DNA tipo RSA I

s	segundos
S. A. de C. V.	Sociedad Anónima de Capital Variable
SCGE	electroforesis en gel de células unitarias
SHG	proteína de estrés oxidante SHG
SOD	superóxido dismutasa
<i>Sphingomonas sp.</i>	organismos del Género <i>Sphingomonas</i>
SSH	supresión por hibridación sustractivas
TBT	tribultiltín
UA	unidades arbitrarias
UFC	unidad formadora de colonia
v/v	proporción de volumen/volumen

1. INTRODUCCION.

1.1. Necesidad del uso de plaguicidas y sus repercusiones.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU), a través de sus organismos especializados, calcula que para el año 2050 el total de la población en el mundo será entre 7.1 y 10.6 mil millones de personas (ONU, 2005). Este acelerado crecimiento en la población mundial trae consigo la necesidad de satisfacer sus requerimientos básicos. Ante tal situación un desafío a resolver es el incrementar la producción de alimentos de origen vegetal tanto para consumo humano como para el suministro de insumos alimenticios para la industria pecuaria.

Considerando la imposibilidad de incrementar la extensión de tierras cultivables a nivel mundial, ya que este aumento sería a costa de la deforestación de zonas ecológicas de vital importancia, aunado a los problemas de erosión, desertificación de zonas agrícolas y el cambio de uso de suelo debido al constante crecimiento urbano. Desde 1950 se ha promovido el desarrollo de tecnologías de cultivo que permitan incrementar el rendimiento de las cosechas. Estas tecnologías de producción intensiva requieren el uso de compuestos químicos complementarios (fertilizantes y plaguicidas) que minimizan los efectos negativos de escasez de nutrientes y la merma por efecto de factores biológicos indeseables (bacterias, hongos e insectos, entre otros) (Carvalho, 2006). Sin embargo el uso intensivo de estos compuestos agroquímicos genera efectos colaterales que perjudican las condiciones del ambiente y el estado de salud de las poblaciones silvestres y

humanas (Alavanja *et al.*, 2004; Colborn *et al.*; 1993; Depledge y Galloway, 2005; Heeren *et al.*, 2003; Fry, 1995).

El enfoque en la investigación científica en agricultura se dirige hacia la obtención de variedades de plantas biotecnológicamente modificadas con características de interés: alto rendimiento de la cosecha, resistencia a patógenos, sequía o salinidad (Khush, 2002; Hayashi *et al.*, 1997); así como a la implementación de tecnologías de cultivo menos perjudiciales al ambiente, basadas en el empleo de productos agroquímicos de menor persistencia y nuevos métodos de control biológico de plagas (Lewis *et al.*, 1997), el empleo de estas tecnologías no es suficiente para cubrir la demanda de consumo mundial.

A la fecha el uso de productos químicos como herbicidas, insecticidas y fungicidas se ha incrementado sustancialmente a nivel mundial con cerca de 6 millones de toneladas producidas en el 2005; reconociendo que el empleo de estos químicos es el principal medio para la obtención de volúmenes de alimento con los rendimientos aceptables para abastecer las necesidades del mercado internacional (Carvalho, 2006).

1.2. Riesgos de exposición a plaguicidas en la población.

El riesgo de exposición a plaguicidas en la población se incrementa en países pobres o en vías de desarrollo, tanto por exposición laboral como por consumo

incidental de alimentos o líquidos contaminados. En estos países el uso de plaguicidas es frecuente y escasamente controlado. Los plaguicidas son ampliamente utilizados por la industria agrícola para control de plagas nocivas o en campañas de control sanitario de vectores transmisores de enfermedades como dengue, paludismo, entre otras. El alto riesgo de exposición se debe a diversas causas, entre las que destacan: (1) El empleo de plaguicidas discontinuados o prohibidos en países desarrollados por su alta toxicidad y persistencia en el ambiente, ya que estos productos son de menor precio al haber caducado sus patentes o por presentar métodos de fabricación de menor complejidad. (2) El hecho de que la mayoría de estos países se encuentren en climas tropicales incide en la cantidad de plaguicidas y frecuencia de aplicación en las plantaciones. (3) La escasa infraestructura de almacenamiento y deficiencia en los procedimientos de aplicación y manejo de tóxicos. (4) Mínimo o nulo control de las autoridades correspondientes en la importación, registro, comercialización, empleo y destino final de los desechos contaminados. (5) Deficiente regulación legal y monitoreo de contenido de residuos de plaguicidas en agua, alimentos o liberados al ambiente y (6) el bajo nivel educativo de la población y el desconocimiento de la peligrosidad de uso y almacenamiento de estos productos lo cual incrementa la posibilidad de exposición e intoxicación (Goldman y Tran, 2002; Ecobichon, 2001).

1.3. Daño por liberación de plaguicidas al ambiente.

El uso extensivo de plaguicidas por la industria agrícola genera una elevada cantidad de residuos que se incorporan directamente en los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos (Henriques *et al.*, 1997). En dichas comunidades estos compuestos tóxicos no solo impactan en las especies patógenas, sino que inciden en la población de otras especies, como la fauna de invertebrados, peces, aves o mamíferos presentes en la zona (Charlier y Plomteux, 2002). Los plaguicidas generan mortalidad en los organismos por exposición directa al tóxico o indirectamente por consumo de alimentos contaminados (Mañosa y Guitart, 2001). Adicionalmente estos compuestos pueden alterar funciones o procesos biológicos de primordial importancia para las poblaciones naturales, tales como el proceso reproductivo o del desarrollo, e inducir disfunción hormonal, neurológica o metabólica (Colborn *et al.*, 1993; Fry, 1995; Soengas *et al.*, 1997).

Varias especies de invertebrados terrestres son fuertemente perjudicadas por exposición a plaguicidas, principalmente artrópodos, anélidos y gasterópodos (Lock *et al.*, 2002; Dallinger *et al.*, 2004). Algunas especies acuáticas de crustáceos, moluscos y peces muestran alta sensibilidad a contaminantes químicos como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas (Broeg *et al.*, 2005; Buckler *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2006). Esta situación convierte a las comunidades dulceacuícolas y marinas en ambientes de alta fragilidad por contaminación química (Castillo *et al.*, 1997; Hodgkinson y Jackson, 2005). Debido

a la importancia económica y ecológica que poseen las zonas costeras, se han desarrollado un alto número de proyectos de investigación y de evaluación de salud ambiental por monitoreo para comunidades marinas con potencial afección. Dentro de estos ambientes las comunidades de mayor impacto por contaminación química son los manglares, zonas de pastos marinos y comunidades arrecifales (Peters *et al.*, 1997).

Por la información descrita anteriormente, se reconoce que los agroquímicos y compuestos tóxicos de control de plagas son insumos imprescindibles para la producción alimentaria en los volúmenes requeridos para satisfacer las demandas de la población. Sin embargo, estas sustancias tóxicas conllevan riesgos de peligrosidad por contaminación al ambiente y en la salud humana. Por ello, existe la imperiosa necesidad de regular y monitorear las condiciones de uso, manejo y liberación de estos productos al ambiente mediante el desarrollo de tecnologías sensibles y confiables que determinen la presencia y exposición de tóxicos en comunidades silvestres y humanas, y que aseguren el uso correcto de estos compuestos y los mínimos niveles de contaminación o efecto en las comunidades naturales.

Con el presente trabajo pretendemos contribuir en la resolución de esta problemática en varios sentidos: (1) Obteniendo información de los efectos tóxicos de un plaguicida modelo con amplia distribución mundial, lindano (γ HCH) en una

especie marina cosmopolita de importancia ecológica, comercial y comúnmente utilizada como bioindicadora de alteración ambiental. (2) Adaptando una serie de biomarcadores de exposición o efecto por contaminantes en células de organismos marinos, concretamente en moluscos bivalvos. (3) Describiendo el efecto en la expresión de genes por exposición crónica a γ HCH, reconociendo los posibles mecanismos de respuesta del ostión al estrés químico y los procesos que se ven alterados debido a la exposición al tóxico. (4) Evaluando la posibilidad de empleo de algunos de los genes alterados en su expresión como nuevos biomarcadores de alta especificidad y sensibilidad a la presencia de plaguicidas organoclorados y al γ HCH.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Denominación de algunos plaguicidas como contaminantes orgánicos persistentes (COPs).

Ante los riesgos ambientales que conllevan la producción, manejo y eliminación de desechos de productos industriales tóxicos, entre ellos los plaguicidas, la ONU convocó y coordinó una serie de convenciones internacionales con la intención de regular, eliminar o disminuir el uso de los compuestos tóxicos más perjudiciales a nivel mundial. Es así que se elaboró una lista de los compuestos con mayor toxicidad, dispersión en el ambiente, persistencia y bioacumulación, dichos compuestos químicos son denominados: contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Uno de los convenios más importantes en materia de eliminación de COPs, es el conocido como “Convención de Estocolmo”, dicho convenio establece una lista de los doce COPs más perjudiciales, las acciones necesarias para la eliminación de estos productos y los criterios para incluir otros compuestos tóxicos dentro del convenio (Fernández *et al.*, 2005).

De los doce COPs incluidos en la Convención de Estocolmo, nueve de ellos corresponden a plaguicidas organoclorados (DDT, aldrin, dieldrin, endrín, mirex, toxafeno, hexaclorobenceno, clordano y heptacloro), el resto corresponden a compuestos industriales utilizados para diversos fines o productos secundarios de la combustión (bifenilos policlorados, furanos y dioxinas). Actualmente esta lista se ha incrementado, siendo diecisiete los compuestos incluidos en este convenio

Entre los nuevos COPs se incluyen los plaguicidas lindano y clordecona; los retardantes de flama pentabromo difenil eter y hexabromo difenilo y el surfactante y antiadherente perfluoro octosulfonato (Fernández *et al.*,2005)..

2.2. Clasificación de los plaguicidas.

Los plaguicidas se pueden clasificar empleando distintos criterios: industrialmente se clasifican por el uso reconocido del producto, según el tipo de plaga hacia el cual va dirigido, es decir existen herbicidas, fungicidas, insecticidas, entre otros. Otra clasificación sumamente importante, que ha sido impulsada a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y auspiciada por la ONU, es la clasificación por el grado de toxicidad o peligrosidad de los plaguicidas para la salud humana o ambiental (WHO, 2005). En esta clasificación se reconocen cuatro categorías de toxicidad basadas en la dosis letal media (DL_{50}) del ingrediente activo o la mezcla de ellos, que va desde extremadamente peligroso hasta aparentemente inocuo para el hombre. Dicha clasificación debe ser tomada en cuenta en la producción industrial, siendo obligatorio etiquetar el producto con el nivel de toxicidad mediante un código de colores (WHO, 2005). Una tercera clasificación ampliamente utilizada en el ambiente académico y médico se basa en la estructura química de los plaguicidas, reconociendo familias o grupos de compuestos que presentan características químicas y estructurales compartidas. Así se consideran varios grupos de tóxicos entre los que destacan: los plaguicidas

organoclorados o hidrocarburoclorinados, los organofosforados, los carbamatos y las piretrinas, entre otros (Salem y Olajos, 1988).

2.2.1. Plaguicidas organoclorados: Características químicas, tóxicas y efectos al ambiente.

Los plaguicidas organoclorados fueron los primeros compuestos tóxicos orgánicos sintetizados y utilizados industrialmente desde 1940. Estos son una agrupación heterogénea de compuestos que presentan moléculas aromáticas halogenadas, ciclodienos, cicloparafinas o terpenos clorinados (Al-Saleh, 1994). De ellos destacan el dicloro difenil tricloroetano (DDT), primer plaguicida orgánico utilizado extensivamente, el hexacloro ciclohexano (HCH) y su isómero gama-HCH o lindano (γ HCH) y el grupo de plaguicidas conocidos como ciclodienos, los cuales se constituyen de dos anillos hexaméricos o pentaméricos de carbono policlorados, dentro de estos se destacan el aldrin, el dieldrin y el clordano (Salem y Olajos, 1988).

Adicionalmente a su estructura química, los plaguicidas organoclorados comparten características fisicoquímicas que les confieren gran importancia como contaminantes ambientales. Éstos son compuestos orgánicos con anillos aromáticos de alta hidrofobicidad y liposolubles, dicho rasgo les permite acumularse en los tejidos grasos de organismos expuestos. El enlace cloro-

carbono es muy estable, por lo que se requiere una elevada cantidad de energía para su degradación por vía fotolítica o enzimática y propicia una alta persistencia en el ambiente y en los organismos expuestos (Al-Saleh, 1994). Finalmente la alta toxicidad que muestran los plaguicidas organoclorados en especies de peces e invertebrados marinos y terrestres los colocan como tóxicos de alto riesgo ambiental (Geyer *et al.*, 1997; Bellas *et al.*, 2005a).

El efecto tóxico agudo de los plaguicidas organoclorados incide sobre el funcionamiento del sistema nervioso en general. El grado de toxicidad está relacionado con la concentración del plaguicida en el tejido, este efecto es revertido cuando la concentración del plaguicida disminuye. En mamíferos los niveles tóxicos de plaguicidas organoclorados en tejido nervioso producen ansiedad, temblor, hiperexcitabilidad, convulsiones y pueden ocasionar la muerte del individuo (Al-Saleh, 1994). Adicionalmente, bajas dosis de exposición por periodos subcrónicos o crónicos reportan efecto en la incidencia cáncer de diferentes tejidos (páncreas, hígado, riñón, testículos y leucemia, entre otros). Se reconoce la acumulación de plaguicidas organoclorados en tejidos de pacientes con problemas de Parkinson, Alzheimer, demencia y otros trastornos nerviosos (Alavanja y Mc Gregor, 2004; Dich *et al.*, 1997). Los plaguicidas organoclorados también son considerados como xenoestrógenos o alteradores de la función endocrina, al mostrar efectos sobre órganos y tejidos involucrados en procesos hormonalmente controlados como los procesos de maduración gonádica y

expresión de proteínas involucradas en eventos reproductivos (Charlier y Plomteux, 2002; Brown *et al.*, 2004; Cheek *et al.*, 2001).

De los efectos inducidos por plaguicidas organoclorados a nivel ecológico, la transferencia y magnificación de residuos de plaguicidas en la cadena trófica es un fenómeno reiteradamente descrito y considerado como el principal riesgo para el ambiente. Al mostrar los plaguicidas una baja biodegradación y alto almacenamiento en tejido, se genera un fenómeno denominado como bioacumulación. Esta acumulación además de afectar a los organismos expuestos a dichos plaguicidas incide en las especies consumidoras de éstos, provocando que dichos predadores ingieran y bioacumulen cantidades elevadas de plaguicidas con riesgo para su salud o que interfieran con procesos esenciales para subsistencia de la especie; como son el proceso reproductivo o el desarrollo embrionario (Borga *et al.*, 2004), siendo este efecto conocido como biomagnificación. Otro fenómeno de alto riesgo en la salud ambiental corresponde a la presencia y deposición de residuos contaminantes en las regiones polares. Este fenómeno es propiciado por el transporte de los contaminantes, principalmente COPs y metales pesados, por corrientes de vientos, condensándose en las zonas mas frías del planeta. Por las extremas condiciones ambientales, la fauna y los grupos humanos residentes del ártico muestran ciertos rasgos biológicos como alto contenido de tejido graso y dietas con elevado porcentaje en alimento de fuente animal, que las hacen potencialmente vulnerables a los efectos de exposición, acumulación y

biomagnificación de residuos tóxicos y con alto riesgo a la salud (Tenenbaum, 1998).

2.3. Lindano: Historia, obtención y características químicas.

El hexacloro ciclohexano (HCH) fue sintetizado químicamente en 1825 por Michael Faraday, su estructura química muestra un anillo hexamérico de carbono con seis átomos de cloro y presenta ocho estereoisómeros. Hasta el año de 1912 se consiguió aislar los isómeros alfa, beta, gama y sigma a partir de la mezcla técnica de HCH por Teunis van der Linden (fig. 1). El γ HCH fue descrito y comercializado como un potente insecticida hasta el año de 1941 en Francia; este compuesto fue denominado lindano (INE, 2004).

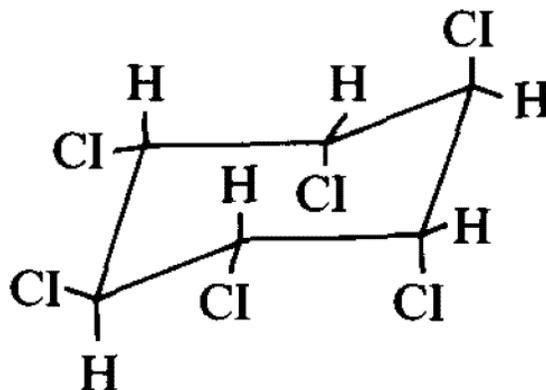


Figura 1. Estructura química del lindano (γ HCH). Tomado de Saleh *et al.* (1982).

El lindano fue el plaguicida organoclorado mayormente utilizado en Francia y otros países industrializados entre 1940 y 1960, al igual que algunos otros plaguicidas

organoclorados de su generación como el DDT. Se estima que desde 1950 y hasta el año 2000 se utilizaron alrededor de 450 mil toneladas de lindano en la producción agrícola mundial y sumada con otros usos médicos e industriales la cifra se incrementa a las 600 000 toneladas (Vijgen, 2006).

El proceso de síntesis del lindano no ha variado mucho del descrito por Faraday. Mediante la fotoclorinación del benceno, haciendo reaccionar al benceno con moléculas de cloro en presencia de luz ultravioleta, se produce un polvo blanco conteniendo cinco isómeros del HCH. Esta mezcla de HCH se conoce industrialmente con HCH técnico, el cual posee aproximadamente un 15% de γ HCH. El lindano puede ser purificado por cristalización fraccionada con metanol obteniendo γ HCH con un 99% de pureza (POPRC, 2005; Sang *et al.*, 1999). El resto de los isómeros no tiene una aplicación industrial importante por lo que son considerados como desechos industriales de potencial toxicidad. Si se calcula que se han producido alrededor de 600 000 toneladas de lindano y considerando que solo el 15% del HCH técnico corresponde a γ HCH, existen aproximadamente 4800 millones de toneladas de isómeros de HCH que permanecen almacenadas o depositadas en los terrenos aledaños a los sitios de producción y embarque (Vijgen, 2006).

Tabla I. Propiedades físico-químicas del lindano. Tomado de Sang *et al.* (1999).

Nombre común	Lindano
Nombre químico	1,2,3,4,5,6 hexacloro ciclohexano, isomero γ
Fórmula química	C₆H₆Cl₆
Registro CAS No.	58-89-9
Peso molecular	290.83
Punto de fusión	112.5 °C
Punto de ebullición	323. 4 °C
Solubilidad en agua (25°C)	7.52 mg/L
Presión de vapor (25°C)	5.3±1.4 x 10⁻³ Pa
Coefficientes de partición:	
Log K_{ow}	3.3, 3.61
Log K_{oc}	3.0, 3.57
Factor de bioacumulación:	
Grasa humana	19±9
Organismos marinos	2.5±0.4

El γ HCH es un polvo blanco cristalino, relativamente estable al calor, aire y ácidos fuertes. Por sus características físico-químicas (tabla I), el lindano conserva los rasgos de los plaguicidas organoclorados: es altamente persistente, presenta alta volatilización y diseminación en el ambiente y posee un elevado factor de bioacumulación en tejidos lipídicos (INE, 2004).

2.3.1. Uso agrícola, farmacéutico e industrial del lindano.

El lindano es un plaguicida de amplio espectro, cuyo principal uso está dirigido al control de insectos. En la industria agrícola y forestal, se han desarrollado tecnologías para tratamiento de semillas destinadas a la siembra y consumo; así como diversas legumbres y árboles (Sang *et al.*, 1999). En México las variedades de semillas de siembra permitidas para ser tratadas con lindano o mezcla técnica de HCH son: avena, cebada, frijol, maíz, sorgo y trigo (INE, 2004). El uso veterinario de lindano está dirigido al ganado bovino y porcino para controlar problemas de ectoparásitos como: larvas de moscas, ácaros de la sarna, piojos, pulgas y garrapatas. También es utilizado en otras especies de animales domésticos como perros y gatos. En los programas de control sanitario el lindano es empleado para control de alacranes y como tratamiento contra piojos y sarna (Avalos y Ramírez, 2003). Aún cuando el uso del lindano es amplio, las principales formas de liberación al ambiente son debidas al uso agrícola o en los procesos de fabricación, formulación, envasado y transporte del producto (Vijgen, 2006; Avalos y Ramirez, 2003).

2.3.2. Degradación y biodegradación del lindano en el ambiente.

El γ HCH puede ser degradado por fotólisis o hidrólisis; la velocidad de fotodegradación esta en función de la intensidad luminosa recibida y la

temperatura ambiental. Existe también una tasa de isomerización del γ HCH producida por la luz solar que contribuye a eliminar la concentración del γ HCH liberado al ambiente. Los principales factores involucrados en la degradación de γ HCH en suelo son: la temperatura, humedad, alcalinidad, intensidad luminosa y contenido de materia orgánica, entre otros. En sedimento terrestre, la vida media del γ HCH se registra entre 6 semanas y 2 años, dependiendo de la cantidad y frecuencia de aplicación del plaguicida (Phillips *et al.*, 2005). Sin embargo, los isómeros de mayor persistencia como el β HCH puede permanecer en el suelo hasta por 15 años (Lichtenstein *et al.*, 1971). En sistemas acuosos la hidrólisis y fotólisis del γ HCH se registra con mayor velocidad que en suelo. Bajo condiciones alcalinas (pH 9.3), el tiempo de vida media de γ HCH es de 92 horas (Saleh *et al.*, 1982).

El lindano también es degradado por efecto de actividad bacteriana (Mohn y Tiedje, 1992). En la literatura científica se han descrito algunas especies bacterianas capaces de utilizar al HCH como única fuente de carbono. Estas especies corresponden a bacterias obtenidas de muestras de suelos agrícolas tratados reiteradamente con γ HCH ó HCH técnico. Los principales géneros bacterianos capaces de mineralizar por completo al HCH son: *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. (Phillips *et al.*, 2005). Otras especies de bacterias y hongos tienen posibilidad de degradar al lindano como: *Anabaena* sp., *Nostoc*

elliposporum, *Escherichia coli*, *Pleurotus* sp., entre otras (Francis *et al.*, 1975; Phillips *et al.*, 2005).

La biodegradación bacteriana puede llevarse a cabo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, sin embargo la mineralización completa de la molécula de γ HCH a sido reportada solo en condiciones aeróbicas. En particular el proceso de biodegradación ha sido minuciosamente descrito para *Sphigomonas pausimobilis* UT26. Se han descrito unas decenas de genes, enzimas y proteínas transportadoras involucrados en el procesos de declorinación del lindano, su transporte y mineralización total al incorporarlo al ciclo de Krebs (Nagata *et al.*, 2007).

2.3.3. Efecto de lindano al ser humano, a la fauna y a las poblaciones silvestres.

El lindano produce graves efectos en la salud humana y de organismos silvestres expuestos, así como en sus poblaciones naturales. Existe amplia información de los efectos del γ HCH en células humanas y de vertebrados, principalmente rata y ratón. En células sanguíneas de humano, el lindano induce incremento en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa, glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), entre otras; también induce peroxidación lipídica (Banerjee *et al.*, 1999). En células tumorales

de tejido mamario y próstatico, el lindano induce un incremento significativo de micronúcleos (Kalantzi *et al.*, 2004), siendo estos un indicativo de efecto genotóxico en estos tejidos.

El efecto tóxico del lindano también ha sido evaluado en tejido nervioso y muscular. El γ HCH actúa sobre la actividad de canales de sodio y potasio; en cerebro de ratón reduce la actividad de los canales de sodio sensibles a glicina y al ácido gama-aminobutírico (GABA), se reconoce efecto genotóxico por rompimiento de la hebra de DNA en células de epitelio nasal expuestas γ HCH e incremento de actividad fosfatidil inositol sintasa (Vale *et al.*, 2003; Pool-Zobel *et al.*, 1993; Parries y Hokin-Neaverson, 1985). En cerebro de rata inhibe la expresión de genes de la familia de las calmodulinas y se incrementa la actividad citocromo P450 (Barrón *et al.*, 1995; Parmar *et al.*, 2003). En tejido muscular cardíaco de rata el γ HCH incrementa la actividad de enzimas antioxidantes SOD, catalasa, inhibe la concentración del glutatión reducido (GSH) e incrementa la peroxidación lipídica. Adicionalmente decrece la actividad miométrial del útero de rata y se inhibe la comunicación por las uniones de comunicación (gap junctions) (Ananya *et al.*, 2005; Loch-Carusio *et al.*, 2003). En tejido cardíaco de rana se reporta un efecto de retraso en el bloqueo de la actividad de los canales de potasio (Sauviat *et al.*, 2002). Diversos trabajos en peces reportan efectos de exposición a γ HCH. En cerebro de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), se incrementa la

concentración de cortisol y se presentan cambios en la actividad metabólica de serotonina, GABA y carbohidratos (Aldegunde *et al.*, 1999; Soengas *et al.*, 1997).

Los invertebrados terrestres, dulceacuícolas y marinos han sido objeto de estudio y evaluación ecotoxicológica por sus características biológicas y sensibilidad a compuestos tóxicos o a eventos de estrés ambiental (Hodkinson y Jackson, 2005; Sarkar *et al.*, 2006). Efectos tóxicos del γ HCH se han reportado en diversas especies de invertebrados terrestres como: anélidos, artrópodos y crustáceos (Lock *et al.*, 2002). El γ HCH produce mortalidad e incremento en la concentración de proteínas de estrés como la *heat shock protein 70* (HSP70) en isópodos (Kölher *et al.*, 1999). Se ha descrito el proceso de asimilación y la toxicocinética del lindano en isópodos terrestres (Loureiro *et al.*, 2002).

La exposición a γ HCH en invertebrados dulceacuícolas y marinos induce efectos tóxicos diversos. En especies marinas de moluscos bivalvos se ha reportado incremento en la actividad de enzimas de respuesta a estrés oxidativo como la catalasa e inhibición de la actividad enzimática de la acetil colinesterasa (AChE), (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998; Khessiba *et al.*, 2005), exposición a γ HCH durante 96 h produce alteración en la fecundidad y cambios en la cantidad de huevos ovopositados en gasterópodos (Eisler, 1970). En crustáceos se reportan efectos de mortalidad en la microfauna del zooplacton, inhibición de AChE, incremento en la concentración de estradiol y descenso de la concentración de testosterona, así

como alteración en el proceso de regulación osmótica y en el proceso reproductivo (Blockwell *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2004; Cuppen *et al.*, 2002; Galindo-Reyes *et al.*, 2000).

2.3.4. Presencia del lindano y sus isómeros en México y el mundo.

A nivel mundial existen numerosos reportes de contaminación ambiental por plaguicidas en ecosistemas terrestres, dulceacuícolas y marinos. Donde el γ HCH y sus isómeros α HCH y β HCH son identificados en sedimentos, agua o tejidos orgánicos de diversas especies. Desde 1970 a la fecha se han reportado residuos del HCH en países americanos, europeos, africanos y asiáticos como: Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Colombia, Francia, España, Albania, Ghana, India, China, entre otros, por lo que se puede considerar al lindano y sus isómeros como contaminantes orgánicos de dispersión mundial, de alta persistencia y riesgo a la salud ambiental (Mañosa y Guitart, 2001; Ueno *et al.*, 2004; Rajendrana *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002; Otchere, 2005; Koci *et al.*, 2006; Donald *et al.*, 2005, Berny *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 1997; Henriques *et al.*, 1997).

En México se ha reportado la presencia de lindano y sus isómeros en las costas norte y sur del Golfo de México, en lagunas tropicales del Pacífico sur, en el Golfo de California (Gold-Bouchot *et al.*, 1995; Botello *et al.*, 2000; Galindo-Reyes *et al.*, 1999; Rakocinski *et al.*, 1997) y en Estados costeros del noroeste de México

como: Sonora, Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur (Osuna-Flores y Riva, 2002, Burgos-Hernández *et al.*, 2005; Vazquez-Boucard, com pers). Adicionalmente se reporta la presencia de γ HCH en muestras sanguíneas de aves silvestres de Baja California Sur (Rivera, 2007). Se ha detectado la presencia de γ HCH en análisis de sangre y leche materna de personas en el Estado de Veracruz, así como en leche de consumo humano y productos lácteos por arriba de los límites recomendados por la FAO (Waliszewski *et al.*, 1999; Waliszewski *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 2003).

Los datos anteriormente mencionados colocan al lindano (γ HCH) como un plaguicida de alto riesgo a la salud humana y ambiental. Sustentan la importancia de desarrollar proyectos de investigación toxicológica que permitan desarrollar herramientas de detección de HCH en el ambiente; y refuerzan la necesidad de establecer programas de monitoreo ambiental de sitios naturales potencialmente expuestos a este tipo de contaminantes, siendo estas medidas tópicos de alta prioridad para el adecuado manejo de zonas agrícolas, preservación de sitios costeros y en la promoción de una industria agrícola mexicana ecológicamente responsable.

2.4. Especies indicadoras de contaminación: Descripción, selección y ventajas de su uso.

Frecuentemente, en estudios de contaminación de sitios naturales se reporta la presencia directa de moléculas tóxicas o sus productos de degradación en diversas matrices: aire, agua, suelo o tejidos orgánicos (Chrysikou *et al.*, 2007; Kallenborn, *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2007; Páez-Osuna *et al.*, 2002). Estos resultados son altamente confiables en el sentido que informan sobre la concentración y nombre del compuesto contenido en la muestra. Sin embargo tienen la limitante de ser análisis específicos para el momento, sitio y tipo de tóxico por analizar, ya que son incapaces de identificar compuestos no considerados en el estudio y los efectos tóxicos que puedan generar éstos en los organismos.

En otro tipo de estudios se ha tratado de abordar el problema evaluando los efectos subletales que pueden ocasionar contaminantes ambientales en organismos potencialmente expuestos a ellos (Coeurdassier *et al.*, 2001; Baudrimont *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2004; Duquesne *et al.*, 2004; Irwin *et al.*, 2001). Estos trabajos tienen la ventaja de presentar los resultados del daño propiciado por compuestos tóxicos en los organismos y poblaciones de sitios contaminados, aun cuando se desconozca específicamente el tipo de tóxico responsable de la alteración.

Las especies seleccionadas para evaluar los efectos de contaminación son consideradas como indicadores indirectas de presencia de compuestos tóxicos y se les denomina como especies bioindicadoras o centinelas de contaminación (Tanabe y Subramanian, 2003; O'Brien *et al.*, 1993). Dichas especies son elegidas en base a diversas características de interés, por ejemplo, las especies que muestren mayor sensibilidad a determinado tipo de contaminante; la factibilidad de muestreo o condiciones especiales de su biología; la importancia ecológica o comercial de la especie, entre otras (Hodkinson *et al.*, 2005; Le Blanc y Bain, 1997).

Las especies centinelas son modelos biológicos de gran importancia en toxicología ambiental y en ecotoxicología. Por ello, es sumamente necesario obtener información biológica amplia y detallada de procesos fisiológicos, metabólicos y ontogénicos en estas especies que faciliten la identificación y evaluación de posibles rasgos o funciones biológicas a utilizar como marcadores de alteración ambiental. Adicionalmente es de gran utilidad la caracterización de los niveles de actividad o condición natural de estos marcadores en las especies centinela y la correlación existente entre dichos marcadores y la presencia del contaminante en los organismos (Tanabe y Subramanian, 2003; Rittschof y McClellan-Green, 2005).

2.4.1. Moluscos bivalvos y gasterópodos en estudios toxicológicos.

Los moluscos pertenecen a un grupo taxonómico de gran importancia por el rol desempeñado en los ecosistemas donde se presentan. Adicionalmente ciertas especies tiene un importante valor económico al ser utilizados como alimento o como fuente de otros productos no comestibles (Rana e Immink, 2001). En estudios toxicológicos, diversas especies de moluscos, principalmente bivalvos y gasterópodos, son frecuentemente utilizadas como modelos de experimentación y análisis. Entre las principales ventajas que muestran estas especies resaltan la amplia distribución en la mayoría de los ambientes acuáticos, alta conservación y homología de sus procesos biológicos y metabólicos con los de vertebrados, algunos rasgos de su biología que favorecen la evaluación de bioacumulación y respuesta a compuestos tóxicos, como ser organismos bentónicos, filtradores, con vida sésil o sedentaria en su fase adulta, entre otros (Rittschof y McClellan-Green, 2005). Recientemente se han hecho importantes esfuerzos en la caracterización y descripción de secuencias génicas y proteicas de moluscos bivalvos con importancia ecológica o económica, con lo que se ha incrementando el conocimiento molecular de estas especies y la posibilidad de emplearse como bioindicadoras de contaminación ambiental (Cunningham *et al.*, 2006; McKillen *et al.*, 2005; Tanguy, en prensa).

2.4.2. Modelo biológico de estudio: Ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795).

Ostión japonés u ostión del Pacífico es el nombre común utilizado para la especie de molusco bivalvo *Crassostrea gigas*. Esta es una especie originaria de Japón que fue introducida a diferentes regiones del mundo. Gracias a su gran capacidad de adaptación y al amplio rango de tolerancia a factores bióticos y abióticos, actualmente es considerada una especie cosmopolita de gran importancia comercial. *C. gigas* fue introducida en México a principios de los años setenta y su cultivo se encuentra altamente desarrollado en los Estados de Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur (Barbosa, 2004).

2.4.2.1. Información taxonómica y estructural de *C. gigas*.

El *Phylum Mollusca* es muy amplio y de gran diversidad, se han descrito más de 50 000 especies, de ellas cerca de 30 000 son especies marinas. Se reconocen seis Clases principales: *Gasterópoda*, *Bivalvia*, *Cephalopoda*, *Polyplacophora*, *Monoplacophora* y *Schaphopoda*. Los moluscos se caracterizan por ser animales de cuerpo blando aunque algunos grupos muestran estructuras sólidas conocidas como conchas o valvas que les confieren protección al ambiente (Gosling, 2003).

La Clase *Bivalvia* es el taxón con mayores modificaciones biológicas en moluscos.

Dentro de esta Clase se reconocen tres Subclases: *Protobranchia*,

Lamellibranchia y *Anomalodesmata*. Los ostiones, mejillones, almejas, ostras y escalopas se ubican dentro del *Superorden Filibranchia (Pteriomorphia)*, *Subclase Lamellibranchia* (Brusca y Brusca, 2003). La clasificación completa del ostión del Pacífico se observa en la figura 2.

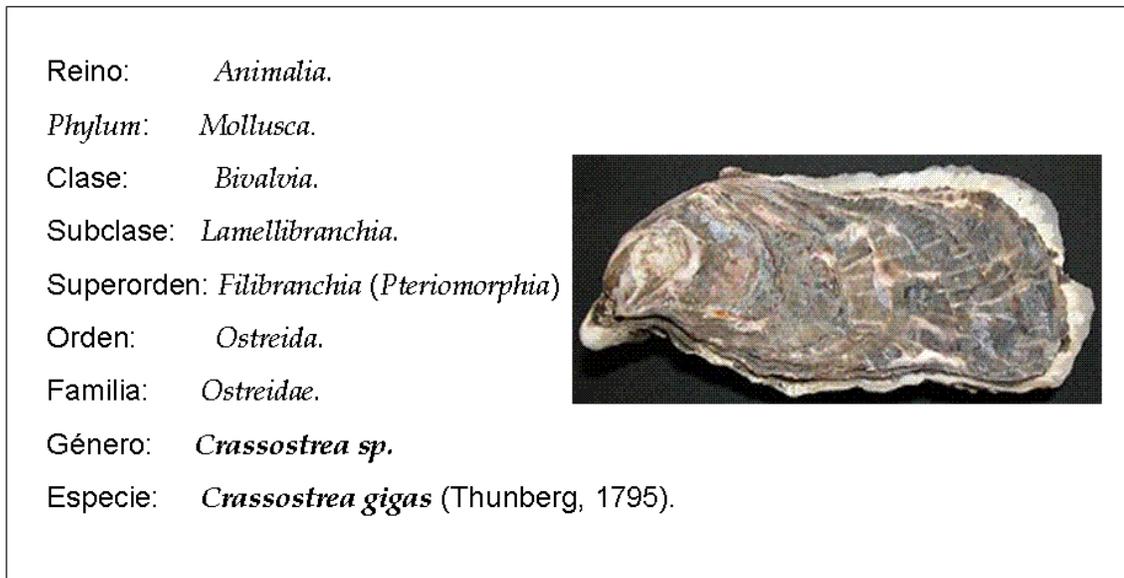


Figura 2. Clasificación taxonómica del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. (Brusca y Brusca, 2003).

Los bivalvos lamelibranquios presentan una estructura planar, con dos lóbulos de manto que secretan un par de valvas y recubren completamente los órganos del sistema respiratorio, digestivo, reproductivo y excretor, y un par de músculos abductores que controlan la apertura y cierre de las valvas.

Los moluscos bivalvos han desarrollado un eficiente sistema de filtración de alimento, que involucra un sistema de flujo de agua que le permite la captura

selectiva de material suspendido por estructuras branquiales especializadas y la deposición del alimento en la boca del animal (Gosling, 2003).

2.4.2.2. Anatomía, fisiología y metabolismo de *C. gigas*.

Las principales estructuras biológicas de los moluscos bivalvos son las valvas, el tejido del manto, el pie, las estructuras branquiales, órganos del sistema digestivo, excretor y estructuras gonádicas (fig. 3).

Las valvas en los ostreídos (ostras y ostiones) son asimétricas, en especial para el Género *Crassostrea sp.* La valva derecha tiene forma plana y delgada mientras que la valva izquierda es más cóncava y alargada. El color exterior puede variar de tono entre amarillo o crema hasta colores marrón violáceos, en el interior las valvas presentan coloraciones blanco aperladas.

En el ostión el manto se conforma de dos lóbulos delgados que recubren todos los órganos del mismo. El manto es una estructura delgada y translúcida que puede estar pigmentada en sus márgenes. En general el manto está constituido por tres capas interpuestas conformadas por tejido conectivo, estructuras nerviosas y receptores además de tejido muscular. En el Género *Crassostrea sp.* como en otros ostiones, la capa más externa del manto muestra principalmente una función secretora y formadora de las valvas. La capa intermedia está profusamente integrada de terminaciones nerviosas, con quimiorreceptores y estructuras

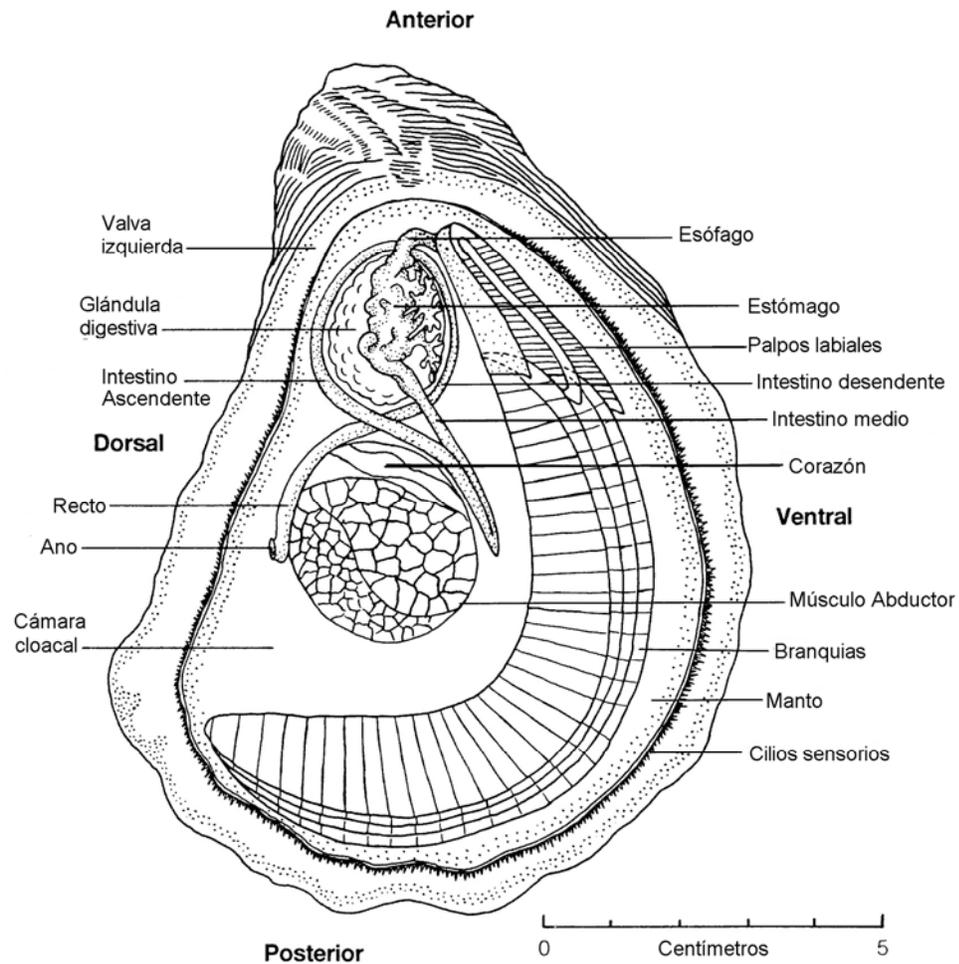


Figura 3. Anatomía general del ostión *Crassostrea sp.* Valva izquierda del ostión. Tomado de Eble y Scro (1996).

especializadas de pequeños cilios táctiles, teniendo un papel importante en la selección de presas y dirigiéndolas al sistema branquial. La capa interna del manto esta conformada principalmente por tejido muscular y regula el flujo de entrada y salida de agua en la cavidad del manto. El manto puede bioacumular metales tóxicos y otros compuestos xenobióticos pero en menor proporción que otros órganos como riñón o glándula digestiva (Gosling, 2003).

El pie de los moluscos está estrechamente relacionado con el hábitat de la especie. Las especies infaunales de moluscos bivalvos han adaptado el pie para introducirse en sitios intersticiales del fondo fangoso o arenosos. En otras especies de bivalvos que presentan adhesión a objetos estáticos, como los ostiones esta estructura se reduce o elimina en su fase adulta, durante la metamorfosis (Trueman y Clarke, 1983; Gosling, 2003).

Las branquias son estructuras que contienen alto contenido de colágeno. En los moluscos lamelibranquios las branquias presentan una estructura curva a lo largo de la concha para obtener el máximo de superficie de exposición. Los filamentos branquiales muestran forma de W y están profusamente irrigados por vasos hemolinfáticos. Estos filamentos poseen estructuras especializadas de cilios y filamentos importantes para la función alimenticia. En el sistema branquial se desarrolla principalmente la función de intercambio de gases, pero adicionalmente las branquias tienen la función del filtrado del alimento y su deposición en la boca del animal. Las branquias son capaces de acumular compuestos y metales tóxicos; estos compuestos pueden causar lesiones en el tejido branquial e inducir la síntesis de proteínas relacionadas con el transporte de metales o en la eliminación de radicales libres (Gosling, 2003).

En el sistema digestivo de los moluscos bivalvos posee varias estructuras anatómicas, siendo una de las más importantes la glándula digestiva.

Anatómicamente se conecta al estómago; físicamente la glándula recubre en su totalidad al estómago y se conecta posteriormente al tubo digestivo. La glándula digestiva del Género *Crassostrea sp.* posee tres tipos celulares: el primer tipo de células digestivas están provistas de microvellosidades, en ellas se lleva a cabo la absorción de las partículas, la asimilación celular de los nutrimentos y su transporte al torrente hemolinfático. Un segundo tipo de células secretoras de forma piramidal, con un sistema de síntesis proteica bien desarrollado por la abundancia de organelos como el aparato de Golgi y el sistema de retículos endoplásmicos, produce y libera enzimas digestivas de azúcares y proteasas que actúan a nivel extracelular. Existe un tercer tipo de células flageladas y columnares pero sin el desarrollo de organelos como en los tipos anteriores, la función de estas células en el proceso digestivo no se ha dilucidado aún (Gosling, 2003).

La glándula digestiva está involucrada también en el almacenamiento de azúcares y lípidos. Estas reservas energéticas son movilizadas durante los procesos de gametogénesis o utilizadas en los eventos de estrés ambiental (Gosling, 2003).

Por la función endocitótica de la glándula digestiva, ésta estructura es el principal sitio de acumulación de compuestos y metales tóxicos. Diversas enzimas involucradas en procesos de biotransformación de contaminantes orgánicos han sido detectadas en la glándula digestiva de numerosas especies de bivalvos.

El sistema reproductivo de los bivalvos es relativamente simple. Las gónadas son pareadas y recubren la glándula digestiva. En la gran mayoría de las especies la fertilización es externa y los gametos son expelidos por el organismo al medio. En *C. gigas* las gónadas poseen un grosor de 6 a 8 mm y pueden comprender hasta un tercio del peso total del organismo (Gosling, 2003).

2.4.2.3. Sistemas y procesos con posibles afección por contaminación química.

Entre los procesos fisiológicos y celulares que son principalmente afectados por compuestos xenobióticos se encuentran: la transmisión de impulsos nerviosos, el ciclo celular, el proceso digestivo, el reproductivo y excretor así como el sistema de respuesta inmunitaria.

Los compuestos con propiedades neurotóxicas inducen alteraciones en los procesos de comunicación neuronal, por ejemplo, la inhibición de la actividad de la AChE por plaguicidas organofosforados y carbamatos o la alteración de la actividad de canales iónicos en membranas neuronales por plaguicidas organoclorados como el γ HCH (Bocquene *et al.*, 1997; Hamza-Chaffai *et al.*, 1998; Vale *et al.*, 2003).

Otro proceso que puede sufrir alteraciones por efecto de exposición a xenobióticos es el ciclo celular, éste puede ser afectado a causa de lesiones o daño molecular a la hebra de DNA. Este tipo de alteraciones induce un bloqueo de las fase del ciclo, hasta que dichas lesiones sean reparadas, si éstas no pueden ser corregidas, entonces la célula será eliminada por apoptosis. En caso de no ser eliminada, esta célula será duplicada pudiendo generar problemas de mutagénesis, clastogénesis, teratogénesis o carcinogénesis. Los compuestos que inducen este tipo de efectos son denominados genotóxicos. Algunos ejemplos de estos compuestos genotóxicos son: el benzopireno, la atrazina y algunos plaguicidas organoclorados (Siu *et al.*, 2004; Bouilly *et al.*, 2003; Rocher *et al.*, 2006).

En el proceso respiratorio, la presencia de xenobióticos pueden modificar la tasa de respiración y generar alteraciones celulares en el tejido a causa de peroxidación de membranas y la oxidación de macromoléculas por acción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Bellas *et al.*, 2005b; Vlahogianni *et al.*, 2007).

El proceso digestivo de moluscos bivalvos ha descrito alteraciones por estrés oxidante y acumulación de sustancias orgánicas tóxicas liposolubles en los tejidos con alto contenido de lípidos. Estos compuestos inducen respuestas celulares a ROS y enzimas de biotransformación y eliminación de moléculas hidrófobas como el sistema monoxigenasa (citocromo P450, reducción de glutatión). De igual

manera se induce la síntesis de proteínas quelantes de metales como las metalotioneinas (Gamble *et al.*, 1995; Solé *et al.*, 1994; Bebianno *et al.*, 2000).

En moluscos bivalvos, los principales órganos excretores son las glándulas pericárdicas y los riñones. El riñón tiene un papel importante en la eliminación de hidrocarburos y metales tóxicos que son almacenados en lisosomas y eventualmente eliminados por la orina. La acumulación de estos metales en los tejidos renales han reportado incremento en la presencia de daño renal (Soto *et al.*, 1996).

El efecto de compuestos tóxicos al proceso reproductivo es el mayormente documentado por la magnitud del daño que puede ocasionar en las poblaciones silvestres (Sumpter y Jobling 1995; Ankley *et al.*, 1998; Donohoe *et al.*, 1999; Tamamoto *et al.*, 2001), ya que incide directamente sobre la capacidad de las especies para preservarse en el tiempo. Este tipo de compuestos son clasificados como xenoestrógenos o endocrino-alterantes como el tribultin (TBT), plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés), los cuales tienen la capacidad de inducir esterilidad, feminización de machos o masculinización de hembras, además de causar decremento en la tasa de fecundidad y la disminución en la producción de gametos viables, entre otras alteraciones (Alzieu, 1998; Fry, 1995, Chu *et al.*, 2003).

La sensibilidad del sistema inmunitario ante xenobióticos diversos como PBC, hidrocarburos poliaromáticos (HPA) o plaguicidas ha sido estudiada en diversos organismos (Betoulle *et al.*, 2000; Russo y Madec, 2007; Ilback y Friman, 2007; Cabassi, 2007).

La mayoría de los trabajos en inmunotoxicología ambiental se han realizado en peces y algunos invertebrados marinos como moluscos y crustáceos (Zelikoff *et al.*, 2000; Bayne *et al.*, 1996). Se conocen efectos citotóxicos de células del sistema inmunitario de peces, causando un incremento en la concentración de calcio intracelular (Betoulle *et al.*, 2000). En específico para moluscos bivalvos se ha relacionado el incremento en la actividad inmunitaria de hemocitos con la presencia de xenobióticos en tejido (Oliver *et al.*, 2001). La exposición en laboratorio de ostiones *Ostrea edulis* a metales tóxicos como cadmio y cobre provoca un decremento en la actividad de fagocitosis y otros procesos subcelulares en hemocitos (Auffret *et al.*, 2002). A nivel transcripcional, se han realizado estudios de expresión de genes donde se reconocen proteínas relacionadas al sistema inmunitario que son estimuladas o inhibidas por exposición a diversos herbicidas y otros contaminantes en laboratorio (Tanguy *et al.*, 2005; Boutet *et al.*, 2004).

2.4.2.4. Trabajos de toxicología ambiental en *C. gigas*.

Diversos estudios se han desarrollado en el tema de toxicología ambiental usando como modelo la especie de *C. gigas*. Se conocen estudios en los diferentes estadios de vida de la especie, desde efecto en células sexuales (esperma y ovocitos) y estadios larvarios hasta la fase juvenil o adulta (Geffard *et al.*, 2000; His y Seaman, 1993; Moraga *et al.*, 2000).

De los principales reportes realizados por exposición a xenobióticos en *C. gigas* destacan: (1) el efecto de plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre la actividad AChE, así como la caracterización molecular y enzimática de esta proteína (Bocquene *et al.*, 1997); (2) la respuesta al estrés oxidante en la glándula digestiva por efecto a diversos COPs (Orbea *et al.*, 2002; Solé *et al.*, 1994); (3) el efecto genotóxico de aneuploidia por exposición cadmio y atrazina (Bouilly *et al.*, 2003; Bouilly *et al.*, 2006) y (4) la agregación de hemocitos por efecto de xenobióticos (Auffret *et al.*, 1997).

A nivel molecular se han descrito un alto número de proteínas y genes relacionados con la respuesta de *C. gigas* a compuestos xenobióticos como la metalotioneína, proteína de estrés térmico (HSP70), proteína de respuesta multixenobiótica (MXR), peroxirredoxina 6, fosfoglucomutasa (Tanguy *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2003; Minier *et al.*, 2002; Tanguy *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007), entre algunas otras.

Se han desarrollado una serie de genotecas de expresión que fueron obtenidas por exposición a diferentes xenobióticos con un vasto número de fragmentos de etiquetas de secuencias expresadas (EST, por sus siglas en inglés) que permiten tener una gama de posibles proteínas sensibles a eventos de exposición a contaminantes y factores de estrés ambiental (Moraga y Tanguy, 2000; Boutet *et al.*, 2004; David *et al.*, 2005; Tanguy *et al.*, en prensa).

2.4.2.5. Justificación de uso de *C. gigas* como modelo biológico de contaminación ambiental.

Por lo mencionado en los apartados anteriores, el ostión del Pacífico *C. gigas* ha confirmado ser un buen modelo biológico para emplearse como especie indicadora de alteración por contaminantes ambientales. El ostión del Pacífico es una especie que cuenta con información sobre la secuencia de varios genes y proteínas, así como la posible función de estas moléculas; dicha información se encuentra organizada en bancos informáticos y puede ser consultada y relacionada con el efecto de estrés ambiental.

Considerando que el desarrollo de biomarcadores de exposición o toxicidad a diversos xenobióticos y factores de estrés ambiental es un tema de investigación de amplio interés por la comunidad científica internacional, el análisis y evaluación de biomarcadores de efecto o exposición al γ HCH así como los genes que

modifican su expresión por la exposición crónica al plaguicida identificados en este trabajo pueden ser aplicados a programas de monitoreo ambiental a mediano y corto plazo. Adicionalmente, estos trabajos aportan información útil para resolver y prevenir eventos perjudiciales para la industria ostrícola, tales como la aparición de mortalidades masivas, el surgimiento de enfermedades, la disminución del estado de salud o retraso en la tasa de crecimiento de los organismos.

2.5. Biomarcadores de contaminación.

El término biomarcador fue reconocido por el Comité en Marcadores Biológicos adscrito al Concilio Nacional de Investigación de los Estados Unidos de América (NRC, por sus siglas en inglés); y es definido como “Indicador de evento o efecto en una muestra o sistema biológico por exposición a un compuesto químico xenobiótico” (Schlenk, 1999). Los biomarcadores fueron inicialmente utilizados en toxicología humana para detectar y medir la exposición de un individuo a xenobióticos. Las ventajas de su uso radica en que la obtención de la muestra no es invasiva para el tejido o fluido biológico del paciente, muestra alta precisión de evaluación, es capaz de indicar la dosis efectiva a un órgano específico y en ocasiones indicar posible susceptibilidad individual (Forbes *et al.*, 2006).

El fundamento del uso de biomarcadores de contaminación en ecotoxicología se describe como la posibilidad de emplear indicadores tempranos de alteración por exposición a contaminantes, que tengan relación directa o generen efectos

adversos en la poblaciones o comunidades ecológicas estudiadas (Vasseur y Cossu-Leguille, 2003).

El éxito en la búsqueda de estos biomarcadores ha sido parcial y controvertido, pues si bien existe cierto número de biomarcadores, principalmente enzimáticos, utilizados regularmente para reconocer la presencia de compuestos tóxicos como plaguicidas, productos de hidrocarburos o metales tóxicos, estos tienen respuestas ambiguas o poco claras, que complican su interpretación o reducen su valía como indicadores de alteración en ambientes naturales (Forbes *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2006; Lagadic *et al.*, 1994). Pocos casos se tienen documentados de biomarcadores altamente específicos a compuestos xenobióticos que tengan efectos directos a nivel poblacional. El más destacado se refiere al efecto del TBT en la inducción de formación de rasgos genitales masculinos en hembras de caracoles gasterópodos denominado como *imposex*. Este compuesto fue empleado principalmente como pintura antiadherente de fauna marina en los cascos de barcos, actualmente esta prohibido o restringido en varios países (Alzieu, 1998). El fenómeno *imposex* ha sido evaluado y descrito a nivel ecológico en diversos países, principalmente europeos, reconociendo un efecto directo en las comunidades de gasterópodos, al incidir en la esterilidad de las hembras, la disminución de individuos o la extinción local de algunas especies de caracoles (Barreiro *et al.*, 2004; Oberdörster y McClellan-Green, 2002).

Las principales ventajas que los biomarcadores de contaminación presentan (Sarkar, *et al.*, 2006):

- a) Se puede reconocer la interacción del tóxico con los organismos y medir el efecto de la exposición a niveles subletales.
- b) Pueden detectar la presencia de contaminantes conocidos y desconocidos.
- c) La detección temprana y subletal de efectos de exposición permite tomar las acciones pertinentes para remediar o prevenir desastres ecológicos.
- d) Permiten una evaluación espacial y temporal de contaminantes biodisponibles.
- e) Son capaces de indicar la peligrosidad o riesgo ambiental que muestra un compuesto contaminante.
- f) Funcionan para tóxicos emparentados químicamente, como plaguicidas organoclorados, organofosforados, metales tóxicos, hidrocarburos poliaromáticos y otros.
- g) Ayudan a establecer las rutas de exposición a diferentes niveles tróficos y priorizar esquemas de monitoreo y estrategias de remediación.
- h) Permiten integrar interacciones toxicológicas que conllevan a la expresión de un efecto acumulativo en diversos niveles de organización biológica.
- i) Actúan como indicadores de corto plazo de procesos ecológicos de mediano o largo plazo.

El desarrollo de nuevos biomarcadores que tengan implicación en procesos ecológicos relevantes es un tema de actualidad. Debido al potencial que tiene el establecimiento de biomarcadores eficientes para el uso en toxicología ambiental y ecotoxicología; donde se trabaja intensamente con las metodologías y técnicas de vanguardia.

Sin embargo la aplicación de biomarcadores de contaminación en ciencias ambientales requiere de adaptaciones importantes para considerarse como herramientas eficientes en evaluación de riesgo ecológico o presencia de xenobióticos, debido al enfoque con que deben ser desarrollados este tipo de estudios.

2.5.1. Clasificación y uso de biomarcadores en ciencias ambientales.

Un biomarcador es considerado como una modificación a una molécula biológica que puede ser cuantificada. Los biomarcadores de contaminación se pueden clasificar en biomarcadores de exposición, biomarcadores de toxicidad o efecto adverso y biomarcadores de susceptibilidad (Schlenk, 1999).

Los biomarcadores de exposición son definidos como el resultado o respuesta biológica ante la presencia de un xenobiótico; este tipo de biomarcadores considera tanto a los metabolitos generados a partir del tóxico asimilado, como a las moléculas inducidas por la presencia del mismo. Algunos de los biomarcadores

de exposición más estudiados son la inducción de citocromo P450A1 por compuestos aromáticos planares, como los PCB o HPA; y la inducción de la molécula de vitelogenina en sangre o hígado por la exposición a xenoestrógenos (Schlenk, 1999). Estos biomarcadores son eventos ocurridos al inicio de la exposición o en concentraciones bajas cercanas a la dosis mínima de efecto biológico (fig. 4).

Los biomarcadores de efecto son indicadores que pueden ser evaluados a diferentes niveles de organización biológica, desde el nivel molecular o subcelular hasta indicadores ecológicos en la comunidad o la población. El uso de biomarcadores de efecto se basa en la premisa de que previo al efecto ecológico o poblacional existen respuestas celulares en los tejidos para corregir éste. Cuando los sistemas de reparación o detoxificación son alterados o saturados se generan daños celulares e histológicos en los tejidos que causan problemas en la salud individual. Esto origina alteraciones en el proceso reproductivo, del desarrollo o del crecimiento y en determinados casos conducen a la muerte de los individuos.

Esta mortalidad impacta directamente sobre indicadores de la población y la comunidad (Schlenk, 1999). Entre los biomarcadores de efecto biológico destacan la evaluación de la actividad de la AChE, el daño oxidante en diferentes biomoléculas como lípidos, DNA o proteínas y la concentración de metalotioneína en tejido renal o hepático (Sarkar *et al.*, 2006).

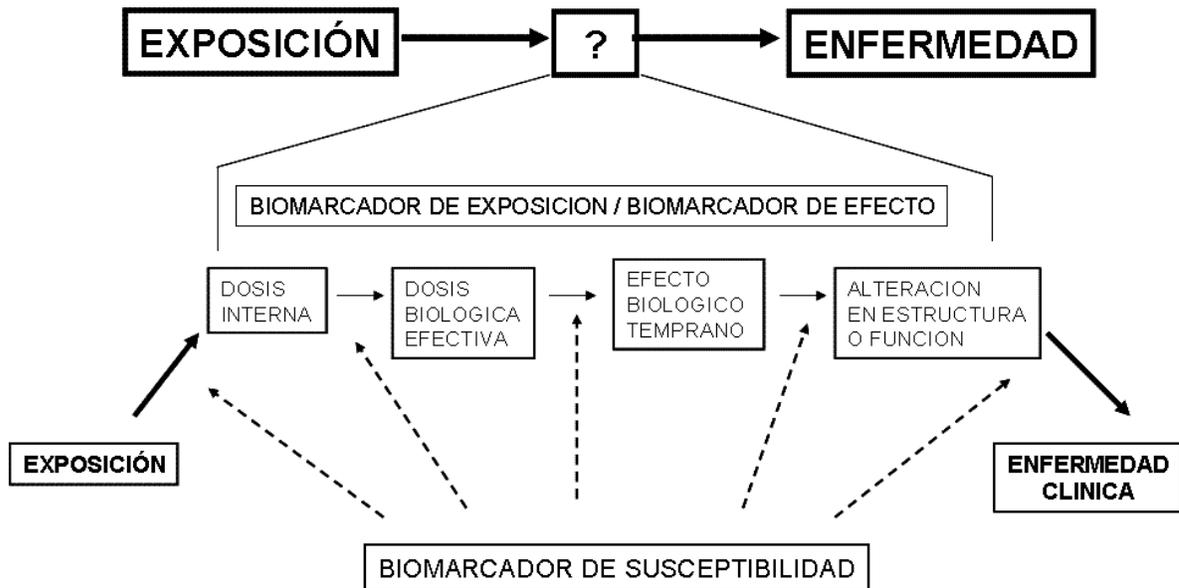


Figura 4. Esquema de las clases de biomarcadores en el proceso de asimilación desde la exposición hasta el surgimiento de la enfermedad. Tomado de Schlenk (1999).

Finalmente los biomarcadores de susceptibilidad son los indicadores menos conocidos en el área de toxicología ambiental, ya que la mayoría de la información conocida sobre estos biomarcadores se ha generado en humanos. Los biomarcadores de susceptibilidad son definidos como indicadores de procesos causantes de la variabilidad observada durante la evaluación de individuos expuestos a un contaminante determinado. Las variaciones de susceptibilidad de los individuos en una población expuesta a xenobióticos, esta relacionada con las variantes en las secuencia de los genes implicados en la predisposición a enfermedades específicas, como por ejemplo: genes del citocromo P450, genes de reparación del DNA, o daño celular, donde el polimorfismo génico, de proteínas

involucradas en el metabolismo de xenobióticos o de reparación de daño y las diferencias de procesamiento de tóxicos en especies o poblaciones por exposición crónica pueden mostrar información importante sobre estos biomarcadores (Schlenk, 1999; Thier *et al.*, 2003).

2.6. Toxicogenómica y su potencialidad en ecotoxicología y toxicología ambiental.

En años recientes se han realizado significativos avances en el conocimiento de la biología molecular de diversos organismos, principalmente en el ser humano y mamíferos, pero también en otras especies de animales, plantas y microorganismos. Estos trabajos han producido una enorme cantidad de secuencias de genes y proteínas que son depositadas en bases de datos especializadas de acceso mundial. Dicha información ha requerido de programas, sistemas de análisis y de clasificación computarizada, por lo que este grupo de herramientas informáticas ha tomado enorme importancia en las ciencias biológicas y a la fecha se han generado numerosos estudios en el tema, conformándose como una novedosa rama del conocimiento conocida como bioinformática (Lomax, 2005). La bioinformática permite realizar diversos análisis de alta complejidad utilizando las secuencias reportadas en las bases de información para diversos fines.

Adicionalmente a la cantidad de información disponible y a los potentes programas desarrollados para su análisis, ha surgido un sistema tecnológico para la evaluación de la actividad génica con alta precisión. Dicho sistema es conocido como microarreglos de DNA. Los microarreglos son pequeñas matrices de miles de genes que permiten evaluar la actividad o expresión de un grupo de genes de un tejido específico o de un grupo de células sometidas a un evento determinado (Ramírez *et al.*, 2003). Los microarreglos contienen decenas de miles de fragmentos de secuencias en un espacio cercano a un centímetro cuadrado. Con esta tecnología es posible realizar análisis de expresión de miles de genes al mismo tiempo, lo que permite la evaluación de una respuesta génica coordinada o el descubrimiento de relaciones entre un conjunto de genes (Vrana *et al.*, 2003).

Con la disponibilidad de estas poderosas herramientas y junto con otras tecnologías como el análisis proteómico, se han fortalecido tópicos de investigación básica como la genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica o integrómica. Estas nuevas áreas del conocimiento intentan reconocer y caracterizar la actividad coordinada de un conjunto de macromoléculas, como genes y proteínas, enzimas, etc.

Diversas ramas de la biología se han beneficiado con estos avances tecnológicos, en especial la toxicología ha incorporado la bioinformática y el sistema de microarreglos a una nueva rama denominada como toxicogenómica (Pennie *et al.*, 2000). La toxicogenómica es considerada como el estudio de la actividad de

genes en relación a su transcripción, traducción y regulación de un tipo celular en respuesta a la exposición a un xenobiótico (Aardemaa y MacGregor, 2002). La toxicogenómica intenta evaluar y reconocer la actividad génica en conjunto para identificar las relaciones de coordinación en un grupo de genes que responden ante un factor de estrés (Maggioli *et al.*, 2006).

Bajo este enfoque es posible identificar relaciones directas e indirectas entre genes involucrados en el daño generado por un tóxico, trazar sistemas metabólicos de procesamiento de xenobióticos o reconocer nuevos mecanismos de respuesta a estrés. Es posible identificar y desarrollar nuevos y más sensibles biomarcadores moleculares de exposición, de efecto adverso o de susceptibilidad en diversos organismos, además de realizar evaluaciones de toxicocinética comparativa entre especies distintas (Pennie *et al.*, 2000; Aardemaa y MacGregor, 2002).

La toxicogenómica puede aportar importante información para emplearse en toxicología ambiental, para ello se requiere tener conocimiento previo en genómica y proteómica relacionada a genes involucrados en eventos de estrés ambiental. Por ello se han realizado esfuerzos en la caracterización u obtención de secuencias génicas provenientes de especies marinas y terrestre con interés ecotoxicológico (Iguchi *et al.*, 2006). En el caso de moluscos bivalvos destacan los trabajos de diseño de microarreglos para dos especies de ostión *Crassostrea virginica* y *C. gigas* (Jenny *et al.*, 2007), las genotecas de expresión obtenidas a

partir de exposiciones a xenobióticos y factores ambientales de estrés en diversos órganos del ostión *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2004; David *et al.*, 2005; Tanguy *et al.*, en prensa; Cunningham *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2005), así como la conformación de un consorcio internacional de investigación para obtener la secuencia completa del genoma de *C. gigas* y *C. virginica* (Cunningham *et al.*, 2006).

3. HIPOTESIS.

La hipótesis trazada en este proyecto considera que:

La exposición del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* al plaguicida γ HCH generará efectos a diferentes niveles de organización biológica relacionados con la concentración y el tiempo de exposición de los organismos al toxico. Estas respuestas podrán ser analizadas de manera integral como biomarcadores de exposición y efecto relativos a éste y otros compuestos clorados en moluscos bivalvos.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Desarrollo y evaluación de biomarcadores de exposición y efecto a γ HCH en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, para emplearse como herramientas de evaluación ante eventos de contaminación ambiental por plaguicidas.

4.2. Objetivos específicos.

- Caracterización de efecto tóxico letal del γ HCH en organismos de *C. gigas* a diferentes dosis en exposición subcrónica.
- Evaluación del efecto tóxico en células de hemolinfa de *C. gigas* por exposición a γ HCH.
- Análisis genotóxico por daño en la molécula de DNA de células de hemolinfa de *C. gigas* por exposición a γ HCH.
- Desarrollo y análisis de una genoteca de expresión de la glándula digestiva de *C. gigas* por exposición crónica de γ HCH a concentración subletal.

- Identificación de genes de *C. gigas* con potencial para ser empleados como biomarcadores de exposición a γ HCH.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Pureza y calidad del material químico.

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron de pureza grado analítico, obtenidos de las compañías enlistadas a continuación: Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. E.E.U.U.; Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA. E.E.U.U.; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI., E.E.U.U.; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ., E.E.U.U.; Calbiochem-Novabiochem, Lauffelfingen, Suiza; Ambion, Austin, TX. E.E.U.U.; Promega, Madison, WI., E.E.U.U.; Eurobion, Le Ulise, Francia; Clontech, Palo Alto, CA. E.E.U.U.; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA. E.E.U.U.

5.1.1. Obtención y preparación del plaguicida γ HCH para los bioensayos de exposición.

El lindano (CAS No. 58-89-9) utilizado en este trabajo fue adquirido a la empresa Aldrich (No. Cat. 233390) 1,2,3,4,5,6- Hexacloro ciclohexano, isomero γ con 97% de pureza. El γ HCH fue pesado en balanza analítica y se preparó una solución concentrada a 25 mg mL^{-1} de γ HCH en acetona grado HPLC. Esta solución fue empleada en todos los bioensayos experimentales de exposición, aplicando la cantidad necesaria para obtener la concentración γ HCH determinada para cada grupo experimental.

5.2. Obtención, mantenimiento y aclimatación de los organismos en el laboratorio.

Los ostiones utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la granja ostrícola “Sol Azul. S. A. de C.V.”, Laguna San Ignacio, Baja California Sur, México. Se emplearon 250 ostiones adultos de *Crassostrea gigas* con un peso de 100 ± 15 g. Los organismos fueron aclimatados en lotes de 15 animales, durante 15 días. Se mantuvieron en contenedores plásticos de 60 L con agua marina filtrada (filtro de arena, filtro de partículas 0.5 micrómetros y filtro de carbón activado) a $22\pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de 37 ± 2 partes por millar, pH 8.0 ± 0.9 y aireación continua. Los ostiones fueron alimentados diariamente con microalgas de *Isochrysis galbana* a concentraciones de 60×10^4 células mL^{-1} org⁻¹, se realizó recambio total de agua diariamente.

5.3. Bioensayo de exposición a concentración letal.

El bioensayo de exposición a concentración letal fue estático, con aireación constante, recambio total, alimentación y exposición cada 24 horas; durante 12 días. En recipientes plásticos con 12 L de agua marina filtrada se colocaron cuatro ostiones por recipiente. Los organismos se distribuyeron en 7 grupos experimentales con 8 ostiones cada uno: cinco de los cuales fueron expuestos a γHCH en concentraciones de 0.3, 0.7, 1.0, 5.0 y 10.0 mg L^{-1} ; otro grupo fue expuesto a acetona a 0.4 mL L^{-1} y uno más se mantuvo solo con alimentación y

recambio. Diariamente se realizó recambio total de agua, posteriormente se alimentaron con *I. galbana* 60×10^4 células mL^{-1} org⁻¹. La exposición al tóxico se aplicó 20 min después de la alimentación.

Al concluir el bioensayo se tomaron muestras de hemolinfa de tres organismos sobrevivientes en los grupos donde fue posible. La muestra de hemolinfa fue obtenida del músculo abductor usando una jeringa hipodérmica de 3 cc y depositada a 4°C para su análisis inmediato y preparación de laminillas.

5.3.1. Cálculo de mortalidad y concentración letal media (CL₅₀).

Durante el bioensayo de exposición a concentración letal se registró la mortalidad de los organismos a las 4, 8, 12 y 24 horas iniciales y cada 24 horas a partir del segundo día de exposición. Al terminar el periodo del bioensayo (12 días), se calculó la mortalidad acumulada en cada grupo; esta tabla fue utilizada para construir una curva de dosis-respuesta a la exposición de γHCH . El cálculo de la CL₅₀ fue realizado empleando el método de ajuste Probit (Bliss, 1935).

5.4. Bioensayo de exposición y efecto adverso.

Los ostiones utilizados para este bioensayo fueron manejados bajo las mismas condiciones de mantenimiento y experimentación del bioensayo de exposición a concentración letal. Se utilizaron 8 grupos experimentales con 8 individuos cada

uno; seis de los cuales fueron expuestos a γ HCH durante 12 días en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.7 mg L⁻¹. Dos grupos control fueron utilizados: uno expuesto a 0.4 mL L⁻¹ de acetona y otro manejado únicamente con recambio y alimentación diaria. Al término del bioensayo se tomaron muestras de hemolinfa y tejido branquial de seis organismos vivos. La hemolinfa fue mantenida a 4°C para su inmediato análisis y preparación de laminillas. Las branquias fueron congeladas a -70°C hasta su análisis.

5.4.1. Prueba de citotoxicidad en hemocitos.

Las muestras de hemolinfa fueron analizadas inmediatamente después de la extracción de los hemocitos. Se emplearon las pruebas de tinción por azul tripano (Phillips y Terryberry, 1957) y de la tinción dual con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA-BrEt) (Gray y Morris, 1987). Las muestras fueron diluidas en solución salina 3% estéril y azul tripano 0.08% (1:1 v/v). La concentración celular y el porcentaje de mortalidad fueron cuantificados por microscopía óptica (200X), empleando una cámara de Neubauer. La viabilidad celular fue cuantificada por tinción dual. La hemolinfa fue diluida en solución salina al 3% estéril con 3 μ g mL⁻¹ de FDA y 8 μ g mL⁻¹ de BrEt (1:1 v/v). El porcentaje de viabilidad celular fue calculado observando 100 hemocitos de cada muestra por microscopía de fluorescencia (200X), en un sistema Nikon Optiphot-2 Episcopic-Fluorescence attachment EF-D (Nikon, Melville, NY.,

E.E.U.U.), con un filtro de excitación de 450 a 490 nm y un filtro de emisión de 510 nm (Nikon, VA520).

5.4.2. Prueba de genotoxicidad en hemocitos.

Los efectos genotóxicos fueron evaluados en hemocitos por electroforesis en gel de células unitarias (SCGE, por sus siglas en inglés). La preparación de las laminillas y electroforesis se realizó con la metodología descrita por Rojas *et al.*, (1999) con modificaciones específicas para células de bivalvos marinos (Carrisoza, 2006). Cada muestra fue preparada por triplicado o cuadruplicado en laminillas para microscopía; las laminillas fueron cubiertas por tres capas de agarosa (0.5% p/v), la capa intermedia contenía los hemocitos en cantidad de 1×10^4 a 2×10^4 células por laminilla. Estas fueron inmersas en una solución de lisis altamente concentrada en sales (NaCl, 2.5 M; EDTA disódico 100 mM; Trizma base, 1mM; DMSO, 10%; Tritón 100X, 1%) y mantenidas a 4°C por una hora. Posteriormente se realizó una electroforesis horizontal a 4°C, con amortiguador alcalino (NaOH, 300 mM; EDTA disódico, 1mM; pH ≥ 13). Las laminillas fueron inmersas en el amortiguador durante 5 min y se aplicó una corriente eléctrica (0.7 V cm^{-1} , 300 mA) por 10 min, finalmente las laminillas fueron neutralizadas con amortiguador (Trizma base 0.4 M; pH 7.5) y deshidratadas con etanol absoluto. Las laminillas fueron teñidas con una solución de BrEt ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) y analizadas por microscopía de fluorescencia (400X) con un filtro de excitación 510 to 560 nm y emisión 580 nm (Nikon, G2A).

Las células fueron evaluadas visualmente y agrupadas en cinco categorías según el nivel de daño en la hebra de DNA, tomando en cuenta la cantidad de DNA presente en el núcleo y la proporción de DNA fragmentado en la cola del cometa. A cada una de las 100 células evaluadas por laminilla se le asignó una categoría entre 0 y 4; donde el valor 0 corresponde a células sin daño, el nivel 1 a células con daño menor al 25%, nivel 2 menor de 50%, nivel 3 menor al 75% y el nivel 4 corresponde a células con daño superior al 75%. El valor total de daño en una laminilla fue determinado por unidades arbitrarias (UA), donde cada una de las células es sumada con su valor correspondiente a la categoría de daño, siendo 400 el valor de daño máximo para una laminilla y 0 el mínimo (Collins, 2004). Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados con las UA para cada organismo y tratamiento.

5.4.3. Prueba de efecto en filtración de alimento.

El efecto fisiológico por exposición a γ HCH fue evaluado por la tasa de filtración de alimento (McLusky, 1973) modificado. En el primer y el décimo primer día de exposición en el bioensayo de exposición y efecto tóxico se tomaron muestras de 50 mL de agua a las 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a la aplicación del γ HCH. Las muestras fueron preservadas adicionando 200 μ L de lugol (KI, 2%; I₂, 1%) y mantenidas a 4°C. La concentración de microalgas fue cuantificada por microscopía óptica a (200X) en cámara de Neubauer por triplicado. La cantidad de microalgas filtradas se obtuvo restando la concentración de microalgas de

cada tiempo a la concentración inicial. La tasa de filtración de cada grupo fue calculada como la pendiente de la curva obtenida por regresión lineal de las 4 horas iniciales de filtrado.

5.4.4. Prueba de actividad enzimática de la AChE.

Se realizó la prueba de análisis de la actividad de la AChE en espectrofotometría por el método de Ellman (Ellman, 1961) en microplaca. Las muestras de branquia fueron homogeneizadas individualmente con una solución de extracción (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 0.1 M; Tritón 100x, 0.1%; pH 8.0) en proporción de 1:4 (m/v). La homogenización se realizó en tres ocasiones por 10 s en baño de hielo. El homogenado obtenido fue centrifugado 10000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y utilizado para determinar el contenido de proteínas totales por el método de Bradford adaptado a microplaca (Bocquene *et al.*, 1997), usando una solución de Coomassie Plus-200 Protein Assay Reagent and serum Albumin Standard (Bio-Rad). Las mediciones fueron realizadas con filtro de 412 nm en un equipo lector de placas Multiscan MK3 (Labsystems, Oy, Helsinki, Finlandia). El Cálculo de la actividad AChE fue realizada mediante el método descrito por Padilla (1995).

5.5. Bioensayo de exposición crónica subletal.

El bioensayo de exposición crónica fue estático, con aireación constante, recambio total, alimentación y exposición cada 24 horas; durante 30 días. En recipientes plásticos con 60 L de agua marina filtrada se colocaron 15 ostiones por recipiente. Los organismos se distribuyeron en dos grupos experimentales: uno de ellos fue expuesto a γ HCH en concentraciones de 0.2 mg L^{-1} ; otro grupo se mantuvo solo con alimentación y recambio. Diariamente se realizó recambio total de agua, posteriormente se alimentaron con *I. galbana* 60×10^4 células mL^{-1} org^{-1} . La exposición al tóxico se aplicó 20 min después de la alimentación.

Cinco organismos del grupo de exposición y del control fueron disecados; se les tomó una muestra de glándula digestiva en el momento previo a la exposición inicial y a los días 7, 15, 21 y 30. Las muestras de glándula digestiva fueron seccionadas, colocadas en solución de RNAlater (Ambion) en proporción 1:6 (m/v) y preservadas a -20°C . En los días 15 y 30 de exposición se tomaron ocho organismos adicionales de cada grupo. Estos ostiones fueron disecados y se les extrajo la glándula digestiva. Inmediatamente después de la extracción las glándulas digestivas completas fueron seccionadas y almacenadas por grupo en 12 mL de RNAlater y preservadas a -70°C hasta su uso.

5.5.1. Preparación de las muestras para la elaboración de las genotecas de expresión diferencial.

Las muestras de glándula digestiva colectadas en grupo de ocho organismos provenientes del bioensayo exposición crónica subletal a 15 y 30 días fueron utilizadas para construir cuatro genotecas de expresión independientes: dos de ellas con los genes inducidos por la exposición a γ HCH durante 15 ó 30 días y las otras dos con los genes inhibidos por la exposición a γ HCH durante 15 ó 30 días. Las muestras de glándula digestiva conservadas en solución de RNAlater y fueron congeladas con nitrógeno líquido, pulverizadas y colocadas en un tubo de plástico de 50 mL. Las glándulas fueron inmersas en RNAable (Eurobion) en proporción 1:10 (v/v) y se les extrajo el RNA total siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las muestras de RNA total se resuspendieron en agua, fueron cuantificadas y evaluada la pureza por espectrofotometría 260/280 nm. Se calculó la concentración de RNA total considerando 40 μ g de RNA por cada unidad de absorbencia a 260 nm.

A partir de 600 μ g de RNA total se purificó el RNA mensajero por el sistema de purificación PolyATtract mRNA (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Al RNA mensajero purificado se le agregó isopropanol absoluto (1:1 v/v), acetato de amonio 3 M (1:0.1 v/v) y se almacenó a -20°C .

Aproximadamente 0.6 mL de RNA mensajero fue centrifugado a 15 000 *g* por 30 min a 4°C, se agregaron 0.5 mL de etanol 70% al precipitado y se centrifugó a 18000 *g* por 5 min a 4°C. El precipitado fue recuperado, evaporado el etanol y resuspendido en 0.01 mL de agua en hielo.

Las genotecas de expresión génica diferencial fueron elaboradas por la técnica de supresión por hibridación sustractiva (SSH, por sus siglas en inglés), utilizando el kit comercial BD PCR-select cDNA Subtraction kit (Clontech). Se utilizaron 2 mg de RNA mensajero de cada una de las muestras control y experimentales. La síntesis de DNA complementario (cDNA) de doble hebra, la digestión enzimática con *Rsa I*, la ligación a oligonucleótidos adaptadores, la hibridación de las muestras y la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fueron realizadas bajo las especificaciones del fabricante.

La construcción de genotecas de expresión SSH, utiliza dos grupos de cDNA (grupo de exposición y grupo control), donde la genoteca de genes inducidos tiene como control el grupo no expuesto y la genoteca de genes inhibidos utiliza como control al grupo expuesto (fig.5).

Los productos de amplificación de PCR diferencialmente expresados fueron ligados al vector pGEM-T (Promega) y clonados en bacterias de *Escherichia coli*.

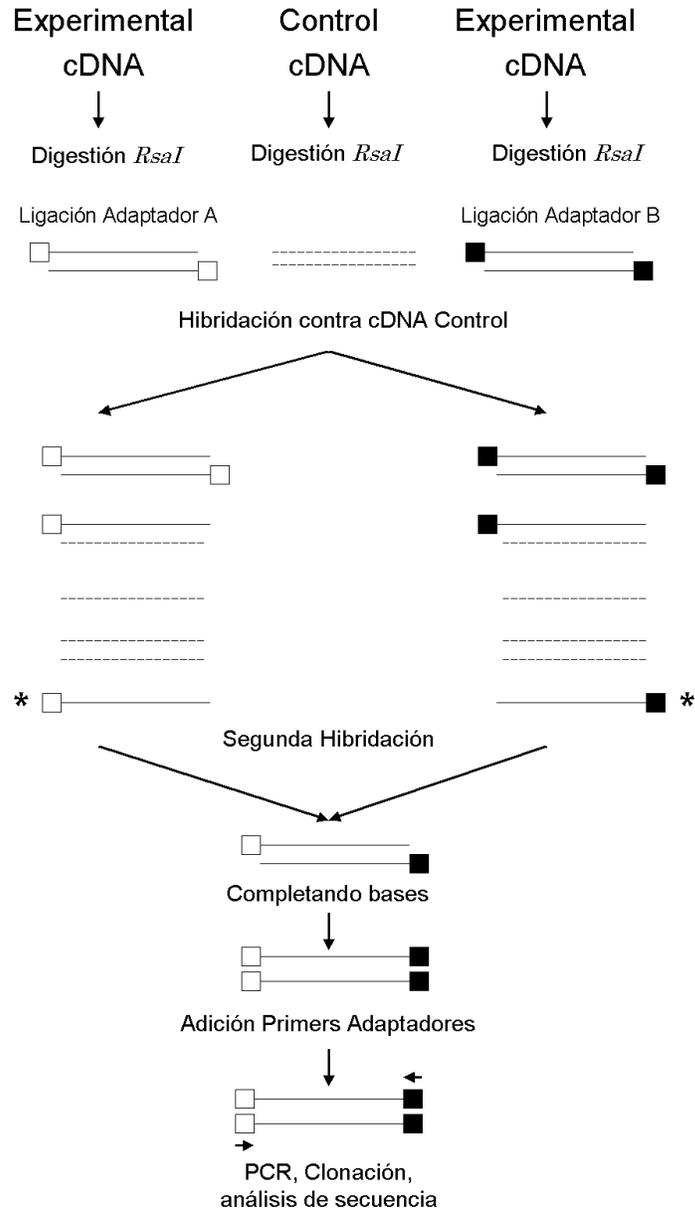


Figura 5. Proceso de supresión por hibridación sustractiva. El cDNA de ambos grupos es digerido con *Rsa I*; el grupo experimental es dividido en dos porciones y cada una es ligada a un oligonucleótido adaptador (A: cuadrado blanco y B: cuadrado negro). Se realiza una hibridación inicial con las porciones A y B, por separado, con exceso de cDNA control, obteniendo diferentes posibilidades de hibridación: los fragmentos que no han hibridado con segmentos de grupo control (denotados con asteriscos) son alineados con su contraparte en una segunda hibridación de las dos porciones A y B; los segmentos de interés son completados con su secuencia correspondiente y amplificados por PCR. Tomado de Cekan (2004).

Para cada genoteca fueron seleccionadas 384 UFC de color blanco y se crecieron en medio líquido Luria-Bertani con 0.1 g L^{-1} de ampicilina. Las colonias fueron aplicadas a microplacas de secuenciación de 384 pozos y enviadas a secuenciar a Centro Nacional de Secuenciación “Genoscope” (Evry, Francia).

5.5.2. Análisis de las etiquetas de secuencias expresadas (EST).

Las secuencias génicas obtenidas fueron ubicadas por las secuencias de los adaptadores y sometidas a búsqueda de proteínas con alta similitud registradas en la base de datos de GenBank mediante el programa BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

5.5.3. Preparación de las muestras para la evaluación de la cinética de expresión génica.

Las muestras de glándula digestiva de los cinco organismos del grupo expuesto y del control a los 0, 7, 15, 21 y 30 días fueron destinadas para la extracción de RNA total. Las muestras fueron procesadas individualmente bajo el mismo procedimiento anteriormente mencionado. El RNA total fue cuantificado y analizada su pureza por espectrofotometría 260/280 nm.

A 2 μg de RNA total se les agregó 2 U de DNasa I (Invitrogen) para eliminar posibles residuos de DNA genómico. Se tomaron 0.7 μg de RNA total libre de DNA y se utilizaron para sintetizar cDNA usando el sistema First-Strand Synthesis, SuperScript III (Invitrogen), con *primers* oligo dT. El proceso fue realizado bajo las indicaciones del fabricante. El volumen total del cDNA fue diluido en agua en proporción. 1:3 (v/v) y almacenado a -20°C hasta su uso.

5.5.4. Análisis semicuantitativo de la cinética de expresión génica.

El análisis de la cinética de expresión se realizó mediante la amplificación de cDNA por PCR. Para ello se desarrollaron una serie de *primers* específicos de los genes a evaluar: superóxido dismutasa (SOD), ferritina GF2, proteína QM y SHG. El gen de actina fue utilizado como control de expresión interno (tabla II). Las secuencias utilizadas para la síntesis de los *primers* corresponden a los EST obtenidos de las genotecas generadas en este proyecto que mostraron alta similitud a los genes registrados en GenBank.

La amplificación se realizó con 1 μL de cDNA de cada organismo, los *primers* específicos del gen a 0.5 μM y la enzima comercial Taq JumpStart Ready Mix (Sigma). La reacción de amplificación se realizó bajo las especificaciones del fabricante utilizando el siguiente programa de corrida. Un paso inicial de 94°C por 4 min; 32 ciclos con tres pasos cada ciclo: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 30 s; al terminar el ciclo se realizó un paso final a 72°C por 7 min. En el

TABLA II. Secuencias de los *primers* diseñados para la cinética de expresión.

Nombre del gen	Secuencias del primer
Actina	5'ACGAGGCCAGAGCAAGAGA
	5'GTTGGCCTTGGGGTTGAGTG
Superóxido Dismutasa	5'AATGCTACCAGGACTTTCGATTGG
	5'TGATCATCTAGTGGGCATGAAAGC
Ferritina GF2	5'GCTGCAAGACATCAAGAAACCTGA
	5'ATTCCGACTCGATGAAATCACACA
Proteína QM	5'GAAGCACCAGGCATCAGTGATAGA
	5'ACGGTAACTCCGTCTGGGATCAG
SHG	5'TCTCCGATATCCTCCACCAAACCTC
	5'TGTTGGATGGTTTACTGTGGGTTG

caso del gen de la proteína QM se realizó el paso de repetición con 31 ciclos para evitar la saturación de la intensidad de banda.

Al término de la amplificación, 10 μ L del producto fueron corridos en electroforesis con gel de agarosa 1% y amortiguador TBE (Trizma base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.5 M, pH 8.0). El gel fue teñido con una solución de BrEt (0.02 g L⁻¹) por 2 min y digitalizado bajo luz ultravioleta en un equipo fotodocumentador de geles UVP Bio Doc System (UVP, Upland, CA., E.E.U.U.).

Las imágenes digitalizadas fueron analizadas por el programa computarizado ImageJ 1.38x del National Institutes of Health, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

La expresión relativa del gen fue considerada como el valor numérico de la densidad óptica (DO) de la banda del gen en cuestión, dividida por la DO de la banda del gen de actina para cada una de las muestras y calculada con la fórmula:

$$(1) \quad \text{Expresión relativa gen} = (\text{DO gen} / \text{DO actina})$$

Los promedios de la expresión relativa y sus desviaciones estándar fueron calculados para cada gen y tiempo de exposición.

5.6. Análisis estadísticos.

Para la evaluación de los efectos de citotoxicidad, genotoxicidad por UA y actividad de la AChE se realizaron análisis exploratorios de normalidad por la prueba de Saphiro-Wilk W y heterocedasticidad por la prueba de Levéne para los valores del porcentaje de viabilidad celular, daño al DNA por UA y pendiente de la actividad enzimática, respectivamente.

Posteriormente se realizó un análisis de comparación de varianzas (ANOVA) de una vía por la prueba de Tukey para cada uno de los efectos evaluados, considerando el nivel de significancia de $p < 0.05$. Estos análisis fueron realizados con el programa estadístico (Statistica, StatSoft. Tulsa, TX. E.E.U.U.).

Adicionalmente al efecto genotóxico por UA se realizó una correlación entre la concentración del γ HCH y el daño al DNA (UA) por la prueba de Pearson (Statistica, StatSoft) y un análisis de la frecuencia de células en todas las categorías de daño por la prueba de χ^2 cuadrada para tablas de contingencia (Zar, 1999). El análisis de efecto en la tasa de filtración de alimento fue realizado mediante la comparación de pendientes por la prueba de t de student (Zar, 1999).

Los análisis de la cinética de expresión génica fueron elaborados por análisis de exploración de normalidad por la prueba de Saphiro-Wilk W y por análisis de comparación de varianzas (ANOVA) de una vía por la prueba de Tukey, para cada tiempo de exposición. El nivel de significancia estadística fue de $p < 0.05$ (Statistica, StatSoft).

6. RESULTADOS.

6.1. Bioensayo de exposición a concentración letal del lindano.

El bioensayo de concentración letal mostró mortalidades en las diferentes concentraciones utilizadas. La menor concentración que registró mortalidad fue 0.3 mg L⁻¹ (12.5%) y la mayor concentración utilizada (10 mg L⁻¹) mostró un 87.5% de mortalidad después de 12 días de exposición (tabla III).

Los valores de mortalidad acumulada obtenidos en las diversas concentraciones de γ HCH fueron utilizados para construir la curva dosis-respuesta (fig. 6). La curva presenta comportamiento característico de un bioensayo de exposición letal ($r=0.9654$). Una segunda gráfica fue realizada utilizando el método de ajuste de mortalidad de Probit (fig. 7). Por este método se calculó la CL₅₀ del γ HCH en organismos adultos del ostión *Crassostrea gigas* expuestos por 12 días. El valor de CL₅₀ calculado fue de 2.21 mg L⁻¹ ($r=0.9648$).

Tabla III. Mortalidad diaria y acumulada de organismos *Crassostrea gigas* expuestos a diversas concentraciones de γ HCH.

γ HCH (mg L ⁻¹)	No. Org.	Mortalidad por día												Total	Mortalidad Acumulada (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
0.0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.3	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	12.5
0.7	8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	25
1.0	8	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	25
5.0	8	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	5	5	62.5
10.0	8	0	0	1	1	1	1	1	0	0	2	0	0	7	7	87.5

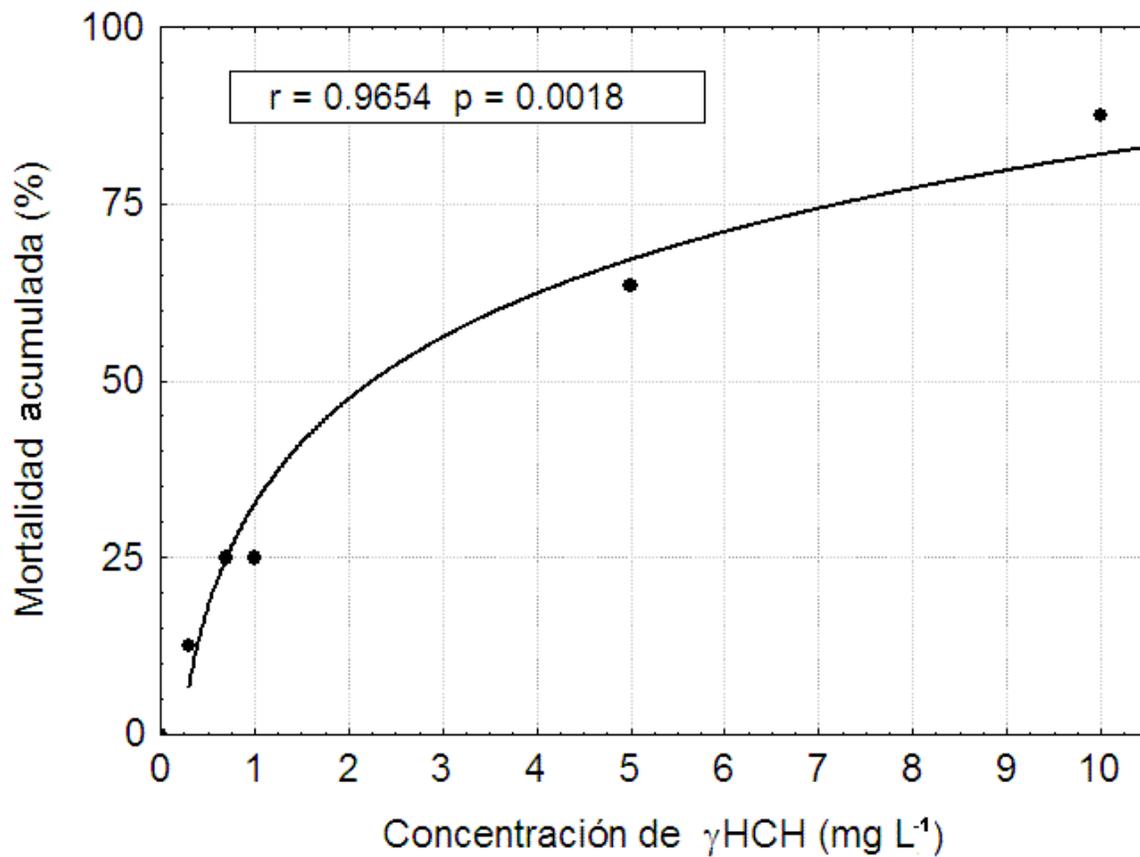


Figura 6. Curva dosis-respuesta de la mortalidad acumulada de *Crassostrea gigas* expuesto a diferentes concentraciones de γ HCH durante 12 días.

6.2. Efecto citotóxico del lindano en hemocitos de *C. gigas*.

Los porcentajes de viabilidad celular en hemocitos de ostiones expuestos a γ HCH se mantuvieron por arriba del 85% en el grupo control y en los organismos expuestos hasta los 0.5 mg L^{-1} (fig. 8).

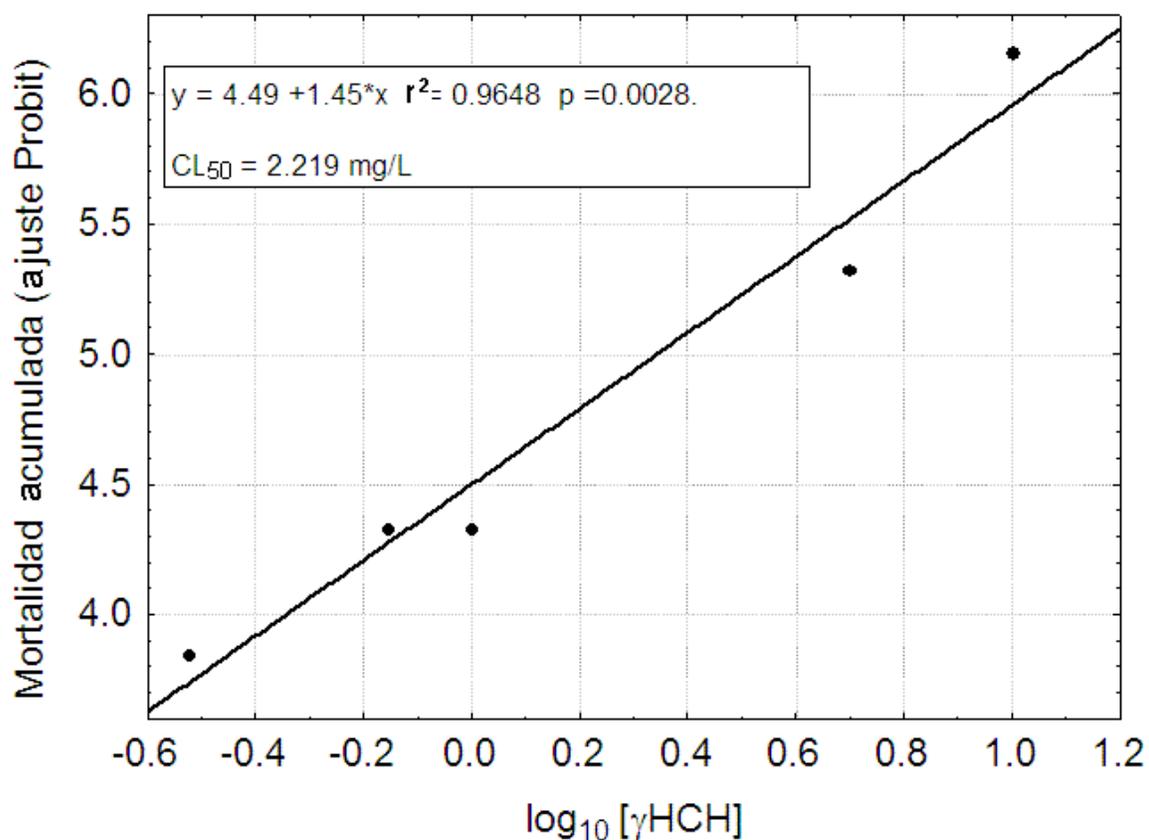


Figura 7. Ajuste de la mortalidad por el método Probit para calcular la concentración letal media (CL_{50}) de *Crassostrea gigas* expuesto a γ HCH durante 12 días.

Los valores de viabilidad en la concentración de 0.7 mg L^{-1} registraron porcentajes de 86 y 81%, en las pruebas de tinción con azul tripano y tinción dual con FDA-BrEt respectivamente (fig. 8). Los porcentajes de viabilidad celular en las concentraciones de 1.0 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} fueron menores al 70%, (62.3 y 65.3% para 1.0 mg L^{-1} y 67 y 64% para 5.0 mg L^{-1}). Las diferencias de viabilidad de estos grupos respecto al grupo control fueron estadísticamente significativas con $p < 0.05$ (tabla IV).

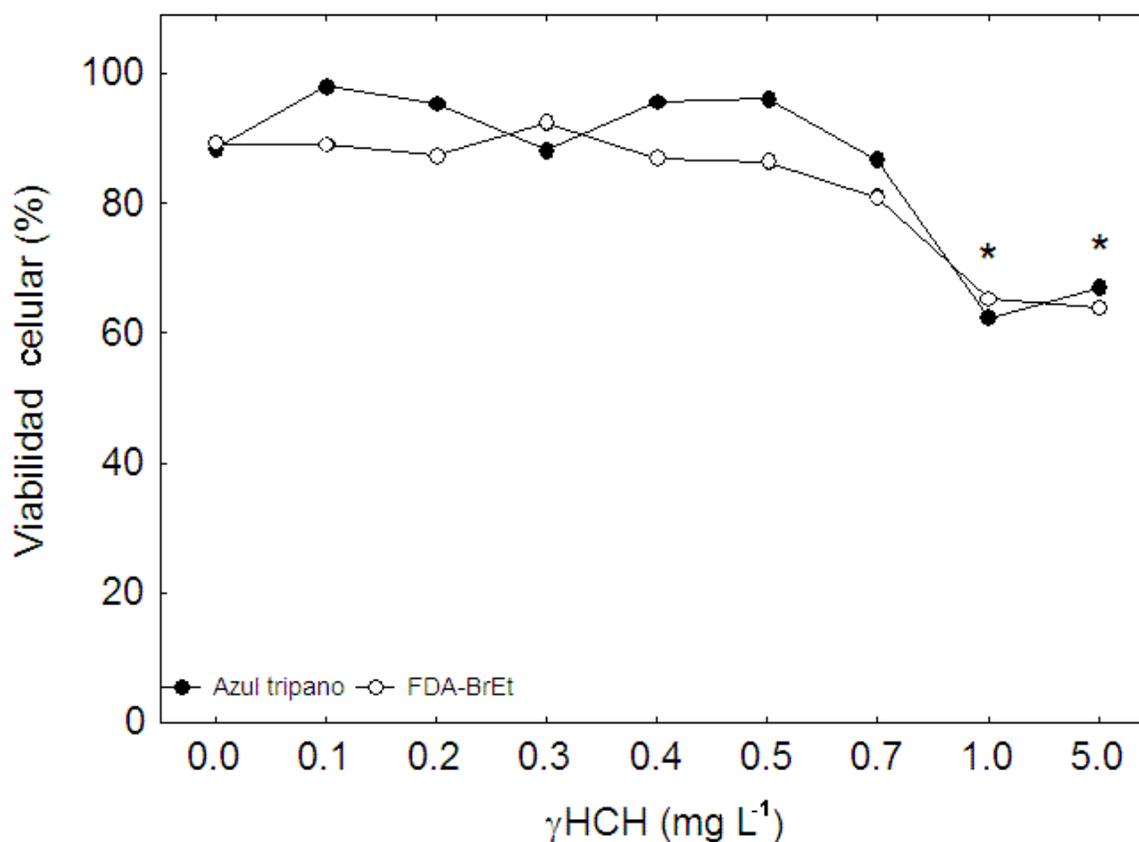


Figura 8. Efecto citotóxico del γ HCH en hemocitos de *Crassostrea gigas*. (FDA-BrEt) Diacetato de fluoresceína-bromuro de etidio; (* diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$).

6.3. Efecto genotóxico del lindano en hemocitos de *C. gigas*.

El efecto genotóxico del γ HCH fue evaluado por el daño en la hebra de DNA de hemocitos usando la técnica de SCGE, los valores fueron comparados por UA (fig. 9). Las UA registradas entre los organismos del grupo control y el grupo expuesto al solvente (acetona 0.4 mL L⁻¹) no mostraron diferencias estadísticas significativas.

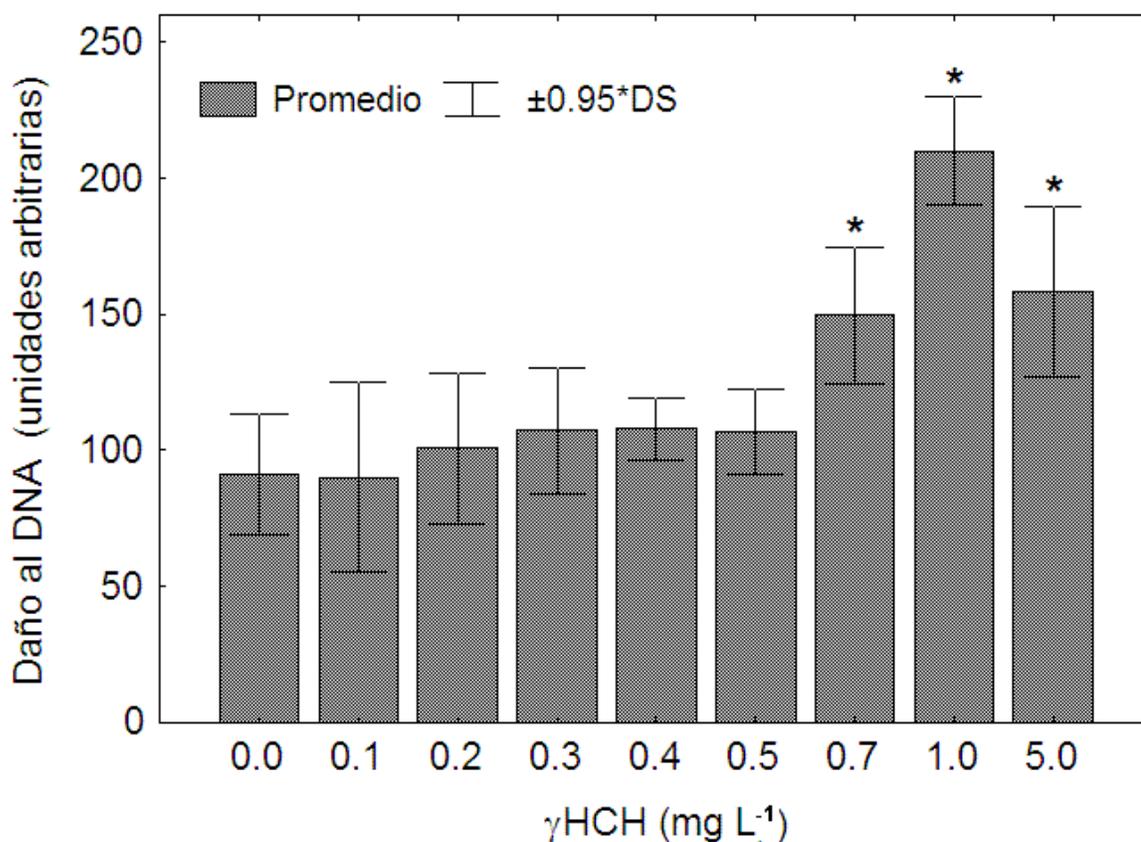


Figura 9. Efecto tóxico del γ HCH por rompimiento del DNA en hemocitos de *Crassostrea gigas*. DS (desviación estándar); (* diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$).

Los hemocitos de ostiones que fueron expuestos a concentraciones menores a 0.7 mg L⁻¹ y los del grupo control presentan valores muy cercanos a 100 UA. Los valores de los grupos 0.7, 1.0 y 5.0 mg L⁻¹ mostraron diferencias significativas comparados con el grupo control con valores de 149.5, 210.1 y 158.1 UA respectivamente (tabla IV).

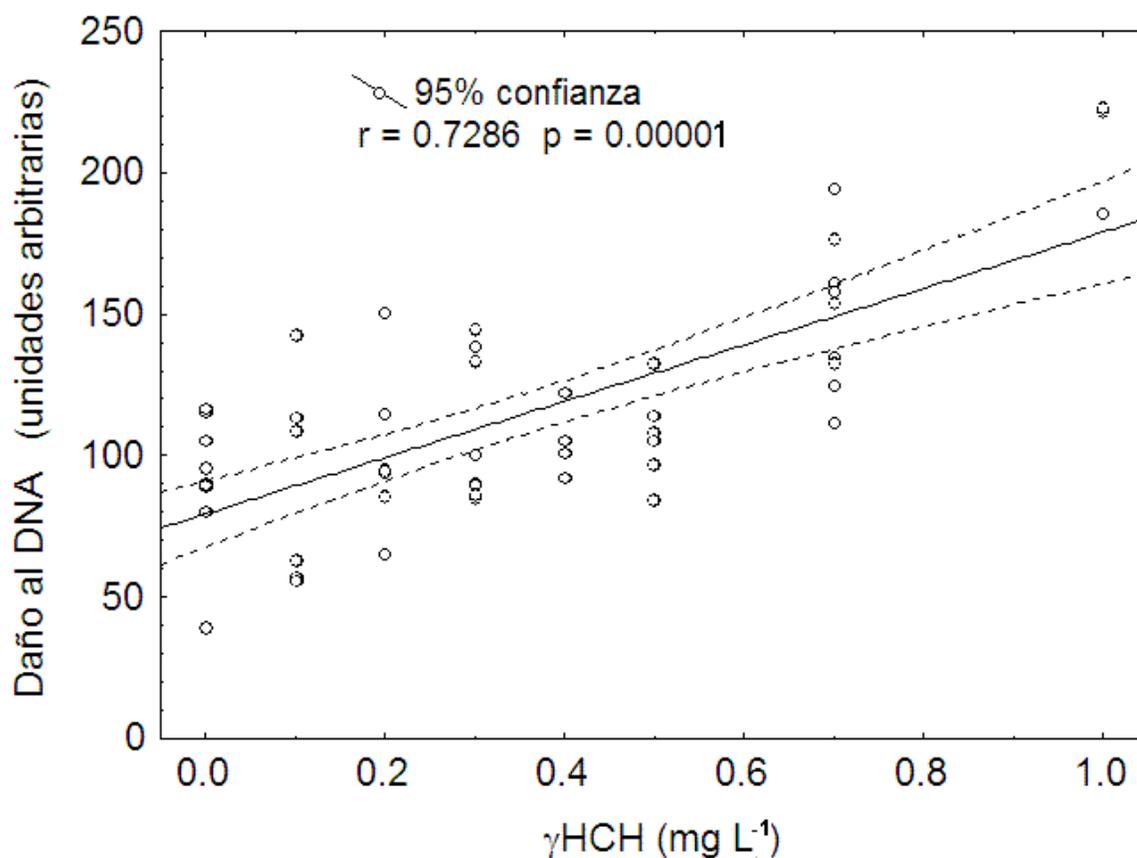


Figura 10. Correlación de la concentración de γ HCH y daño al DNA en hemocitos de *Crassostrea gigas*. O Promedio de UA por organismo.

Los valores de UA de hemocitos de los organismos expuestos a γ HCH fueron utilizados en la evaluación de correlación entre la exposición por 12 días de γ HCH a las diferentes concentraciones y el efecto en el daño a hebra de DNA (fig. 10). La correlación obtenida muestra efecto positivo de la concentración del plaguicida en el daño al DNA de hemocitos de organismos expuestos $p < 0.05$ ($r = 0.7286$).

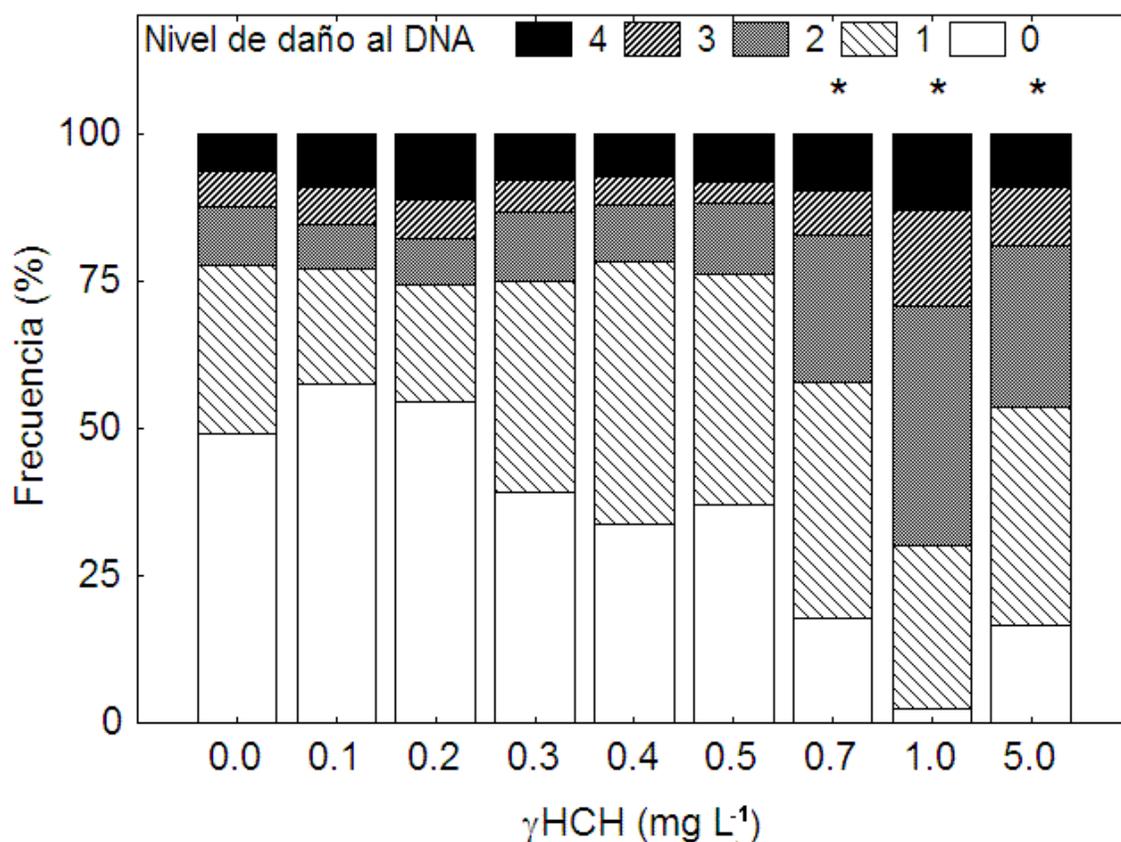


Figura 11. Frequência de hemócitos por nível de dano ao DNA de *Crassostrea gigas* exposto a diferentes concentrações de γ HCH. (* Diferença estatisticamente significativa $p < 0.05$).

Finalmente o efeito genotóxico do γ HCH em hemócitos de ostiön foi avaliado como a frequência de células distribuídas por categoria de dano ao DNA (fig. 11). Os percentajes de frequência no grupo controle e nos organismos expostos a concentrações menores a 0.7 mg L⁻¹ não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Os percentajes de frequência de hemócitos de organismos expostos a 0.7, 1.0 e 5.0 mg L⁻¹ mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle pela prova de *Xi* quadrada para tabelas de contingência com $p < 0.05$.

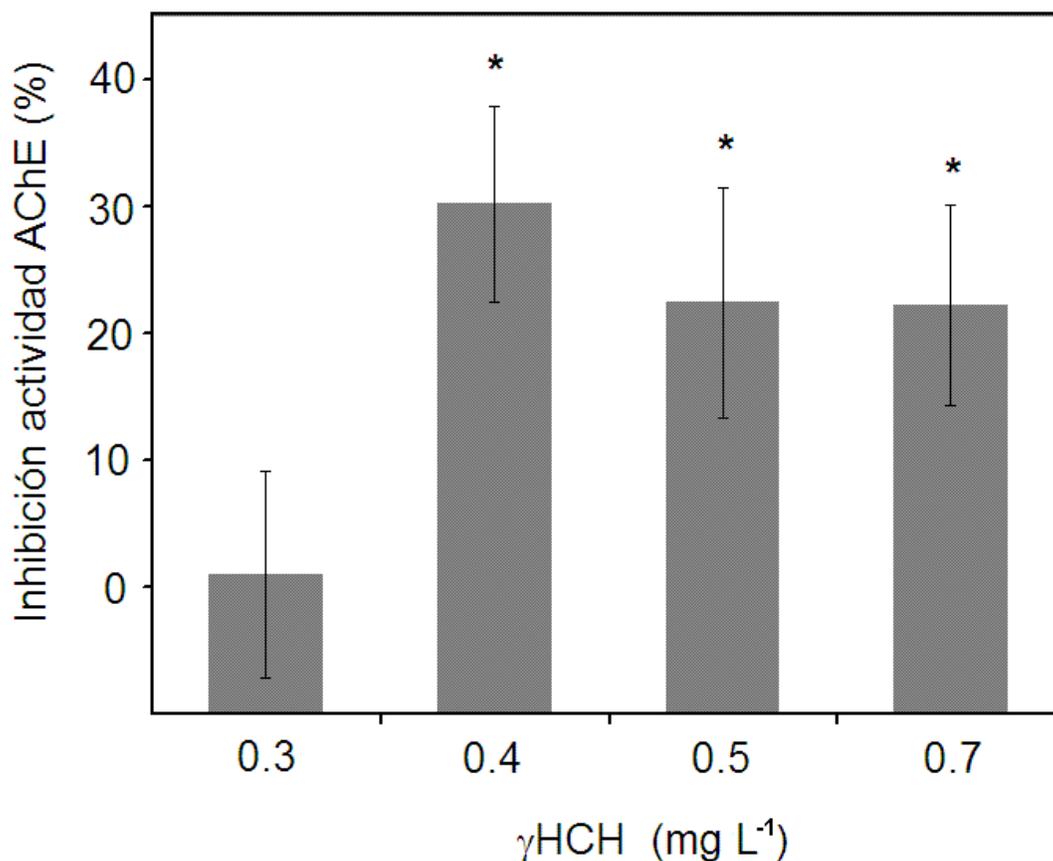


Figura 12. Inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en branquia de *Crassostrea gigas* expuesto a γ HCH. (*diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$).

6.4. Efecto de lindano en la actividad AChE en branquias de *C. gigas*.

Tejido de branquias de *C. gigas* fue utilizado para evaluar el efecto tóxico por exposición a diferentes concentraciones de γ HCH (fig. 12). Los niveles de actividad enzimática en las diferentes concentraciones de exposición fueron expresadas como porcentaje de inhibición de la actividad AChE de organismos control no expuestos a γ HCH.

La menor concentración evaluada (0.3 mg L⁻¹) presentó un 0.94% de inhibición. Las concentraciones restantes de 0.4, 0.5 y 0.7 mg L⁻¹ presentaron inhibiciones significativas y superiores al 22% (tabla IV). El mayor porcentaje de inhibición de la actividad AChE se registró en los organismos expuestos a 0.4 mg L⁻¹ con 30.1%. Para las concentraciones de 0.5 y 0.7 mg L⁻¹ la inhibición se vio reducida a 22.3 y 22.2%.

Tabla IV. Efecto de exposición a γ HCH en organismos *Crassostrea gigas* evaluado a diferentes niveles de organización biológica.

γ HCH (mg L ⁻¹)	Mortalidad acumulada (%)	Viabilidad celular		Daño al DNA (UA)	Inhibición Act. AChE (%)	Tasa de Filtración	
		Azul Trip. (%)	FDA- BrEt (%)			1er día (%)	11vo día (%)
0.0	0	88.4	89.2	77.9	0	100	100
0.1	ND	98.1	89.0	90.2	ND	73.5 *	60.4 *
0.2	ND	95.4	87.3	100.7	ND	96.2	41.9 *
0.3	12.5	88.1	92.4	89.7	0.94	65.8 *	27.5 *
0.4	ND	95.6	87.0	108.0	30.1 *	42.0 *	34.0 *
0.5	ND	96.0	86.3	106.8	22.3 *	52.1 *	45.9 *
0.7	25	86.6	81.0	149.5 *	22.2 *	38.2 *	30.9 *
1.0	25	62.3 *	65.3 *	210.1 *	ND	ND	ND
5.0	62.5	67.0 *	64.0 *	158.1 *	ND	ND	ND
10.0	87.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND. No determinado UA. Unidades arbitrarias FDA-BrEt. Flourescein diacetato-Bromuro de etidio.

* Diferencias significativas p<0.05

6.5. Efecto de lindano en la actividad de alimentación en *C. gigas*.

El efecto en la actividad de alimentación de *C. gigas* fue evaluado por la filtración de de microalgas presentes en el agua. Las curvas de filtración se realizaron con los valores obtenidos en las primeras cuatro horas de exposición a γ HCH en el primer

día de bioensayo y en las cuatro horas posteriores a la alimentación del décimo-primer día. Los valores obtenidos permitieron construir las curvas de filtración de alimento (fig. 13).

Las pendientes de los grupos control presentaron valores de 49.14×10^4 y 52.83×10^4 células h^{-1} para el primer y el décimo-primer día respectivamente. Únicamente la pendiente de la filtración del alimento de los organismos expuestos a 0.2 mg L^{-1} en el primer día, mostró una pendiente cercana al valor del grupo control (47.29×10^4 células h^{-1}). Para el resto de las curvas de filtración durante el primer y décimo-primer día se calcularon pendientes por debajo de 37.0×10^4 células h^{-1} .

Las diferencias de las pendientes de filtración de alimento fueron evaluadas por la prueba *t* para comparación de pendientes. Los resultados muestran diferencias significativas en todas las concentraciones de γHCH en los dos días evaluados; a excepción de la pendiente de 0.2 mg L^{-1} del primer día de bioensayo.

El efecto tóxico del γHCH en la actividad de alimentación fue calculado como porcentaje de tasa de filtración respecto al grupo control (tabla IV). Donde se observa el descenso de la actividad de alimentación de los grupos expuestos en todas las concentraciones evaluadas entre 73.5 y 27.5% para ambos días de evaluación.

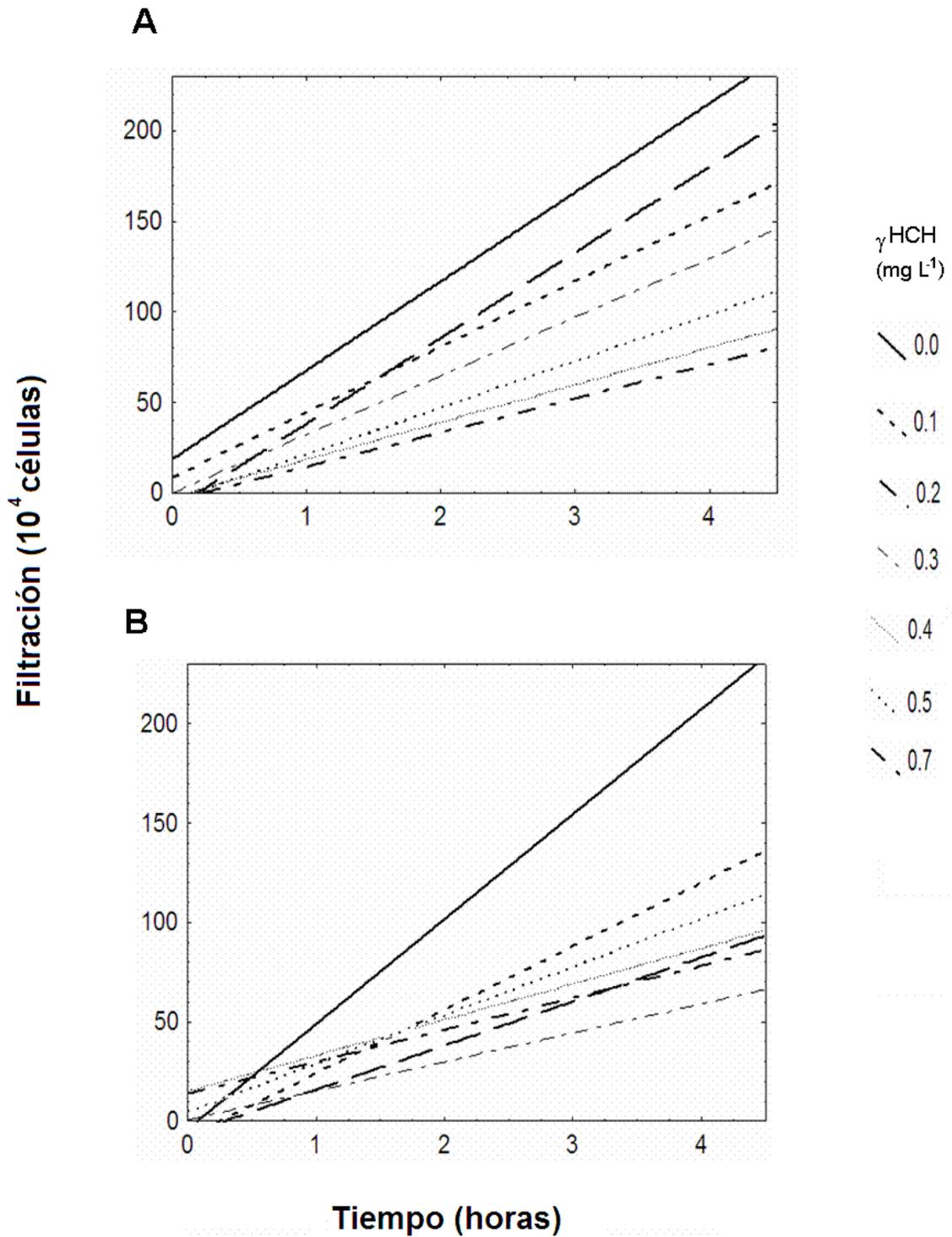


Figura 13. Efecto de γ HCH en la actividad de filtración de alimento. (A) filtración de las primeras cuatro horas de exposición. (B) filtración después de once días de exposición.

Solamente el grupo expuesto a 0.2 mg L^{-1} evaluado al primer día registra un leve decremento de la actividad de filtración de alimento con un porcentaje del 96.2 %.

6.6. Efecto de la exposición crónica subletal de lindano en la expresión de genes de la glándula digestiva de *C. gigas*.

Las glándulas digestivas de ostiones *C. gigas* que fueron expuestos a 0.2 mg L^{-1} de γHCH durante 15 ó 30 días se utilizaron para generar cuatro genotecas de expresión. Correspondientes a secuencias de genes inducidos o inhibidos por la exposición a γHCH por 15 ó 30 días.

De cada una de las cuatro genotecas se secuenciaron 384 clonas, de las cuales se obtuvieron 1289 secuencias de aceptable calidad. La técnica de obtención de secuencias diferencialmente expresadas por SSH fue capaz de reconocer un número importante de secuencias en las cuatro genotecas realizadas. Dichas secuencias están en proceso de incorporarse a la base de datos de Genbank.

Paralelamente, las secuencias de las genotecas fueron sometidas a un análisis bioinformático (BLASTx) para identificar posibles genes y proteínas de alta similitud, registradas en la base de datos de GenBank (tabla V). La mayor cantidad de genes putativos fueron reconocidos en las bancas de inducción tanto para los 15 como a los 30 días de exposición a γHCH .

Los valores de redundancia registrados en la tabla V son considerados como el número de genes putativos reconocidos en las bancas entre el número de secuencias diferencialmente expresadas considerando un límite mínimo de similitud entre secuencia de $E > 10^{-2}$.

Tabla V. Resumen general de secuencias obtenidas por las genotecas de glándula digestiva de *Crassostrea gigas* en organismos expuestos a 0.2 mg/L de γ HCH.

Genoteca de expresión	Secuencias	Secuencias Desconocidas ó valor $E \geq (10^{-2})$	Genes putativos	Redundancia Promedio (%)
Inducidos a 15 días	345	122	75	52.08
Inhibidos a 15 días.	324	136	10	30.30
Inducidos a 30 días.	327	121	73	51.04
Inhibidos a 30 días.	293	160	10	20.00

De las 266 secuencias los genes inducidos a 15 días se reconocen 122 secuencias de baja similitud o sin registro de proteínas en GenBank, 84 secuencias similares a genes de proteínas ribosomales y factores de transcripción y 58 secuencias de alta similitud a genes de proteínas estructurales o funcionales lo que corresponde al 45.9, 31.6 y 22.5% del total, respectivamente (fig. 14A).

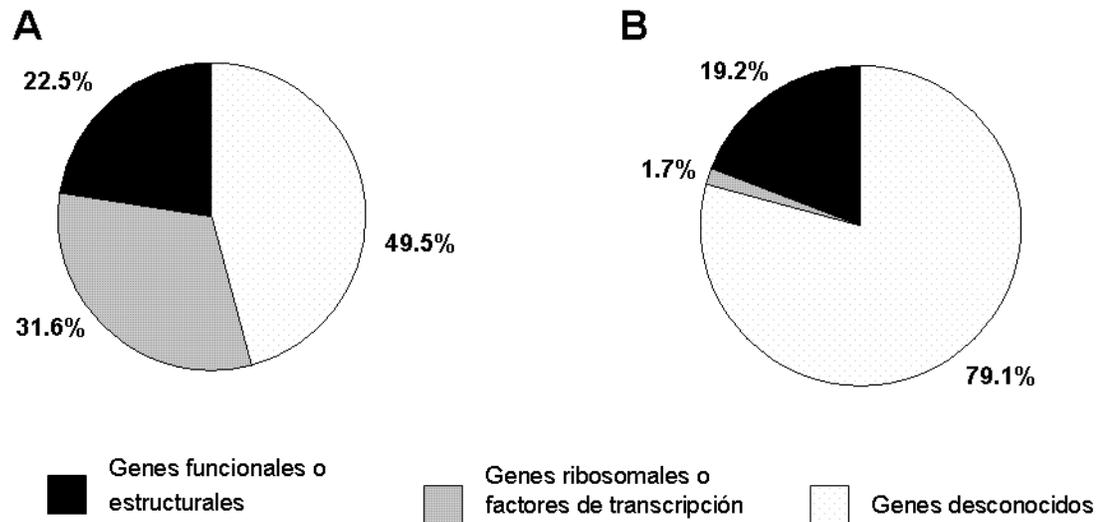


Figura 14. Porcentaje de las secuencias obtenidas de las genotecas de glándula digestiva de *Crassostrea gigas* expuesto a 0.2 mg L^{-1} de γHCH durante 15 días. (A) genoteca de genes inducidos. (B) genoteca de genes inhibidos.

La genoteca de genes inhibidos a 15 días presentó 172 secuencias diferencialmente expresadas, de las cuales 136 secuencias fueron desconocidas, 3 presentan similitud a proteínas ribosomales y 33 a genes estructurales o funcionales correspondiendo al 79.1, 1.7 y 19.2% del total, respectivamente (fig. 14B).

La genoteca de genes inducidos a 30 días mostró 264 secuencias diferencialmente expresadas. Con 121 secuencias desconocidas, 71 secuencias con similitud a genes de proteínas ribosomales o factores de transcripción y 72 secuencias de genes estructurales, correspondiendo al 45.8, 26.9 y 27.3% del total, respectivamente (fig. 15A).

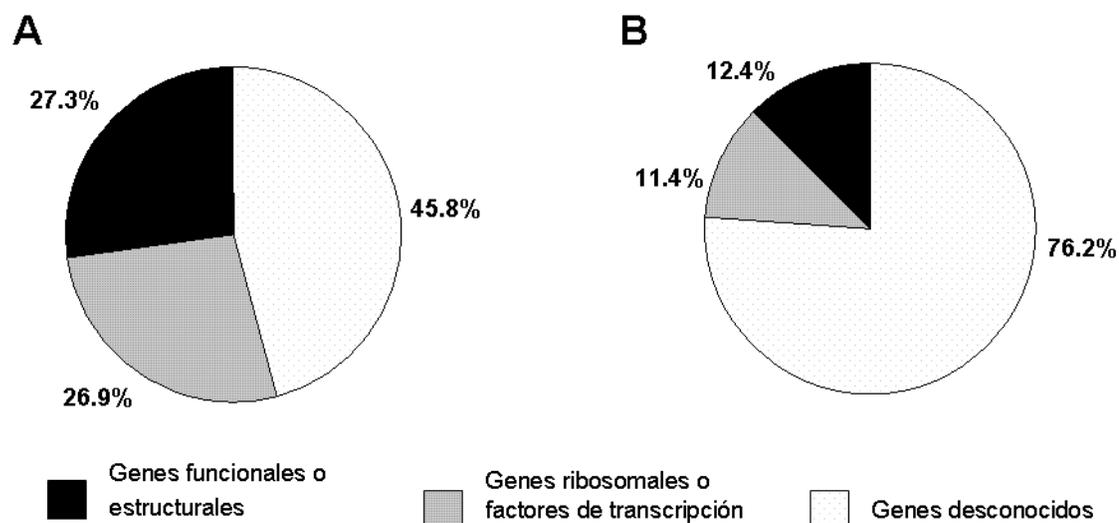


Figura 15. Porcentaje de las secuencias obtenidas de las genotecas de glándula digestiva de *Crassostrea gigas* expuesto a 0.2 mg L^{-1} de γHCH durante 30 días. (A) genoteca de genes inducidos. (B) genoteca de genes inhibidos.

Finalmente se obtuvieron 210 secuencias de genes diferencialmente expresados en la genoteca de genes inhibidos a 30 días. De ellas 160 secuencias no presentan alta similitud a genes de la base informática de GenBank, 24 secuencias tienen similitud a genes de proteínas ribosomales y 26 a genes de proteínas estructurales o funcionales, estos valores corresponden al 76.2, 11.4 y 12.4% del total de secuencias (fig. 15B).

De las secuencias de genes putativos inducidos a 15 días de exposición se reconocen 16 genes descritos para la *C. gigas*, 1 gen del género *Crassostrea sp.*, 12 genes de moluscos bivalvos, 3 genes de moluscos, 25 genes de invertebrados, 12 genes de peces, 9 genes de mamíferos, 7 genes de vertebrados y 3

secuencias de otros *taxa*. La secuencia de mayor similitud mostró un valor de $E=3 \times 10^{-146}$ y la menor similitud presento un valor de $E=1.9 \times 10^{-2}$ (tabla VI).

La genoteca de genes inhibidos a 15 días presenta: 3 genes putativos de *C. gigas*, 1 gen de molusco bivalvo, 2 genes de invertebrados, 3 genes de peces, 1 gen de mamífero y 2 genes de otros vertebrados. La mayor similitud registrada fue de $E=9 \times 10^{-57}$ y la menor fue de $E=9 \times 10^{-3}$ (tabla VII).

Para la genoteca de genes inducidos por exposición a γ HCH por 30 días se reconocieron 13 genes putativos de *C. gigas*, 1 gen del genero *Crassostrea sp.*, 15 genes de otros bivalvos, 3 genes de moluscos, 13 genes de invertebrados, 11 genes de peces, 5 genes de mamíferos y 3 de otros *taxa*. La mayor similitud registrada fue de $E=4 \times 10^{-120}$ y el menor valor de E fue de 3×10^{-3} (tabla VIII).

Las secuencias de la genoteca de genes inhibidos a 30 días mostraron: 2 genes putativos de *C. gigas*, 2 genes de otros bivalvos, 1 gen de molusco, 3 genes de invertebrados, 3 genes de peces y 1 gen de mamífero. La secuencia de mayor similitud registró un valor $E=7 \times 10^{-74}$ y la de menor valor fue de $E=2 \times 10^{-7}$ (tabla IX).

Tabla VI. Genes putativos inducidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L⁻¹ durante 15 días.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
1.	40S ribosomal protein S2	[Ictalurus punctatus] [Strongylocentrotus purpuratus] [Urechis caupo]	AAK95183.1 XP_795432.1 P49154	2.00E-19 2.00E-50 1.00E-49
2.	40S ribosomal protein SA (p40) (34/67 kDa laminin binding protein)	[Urechis caupo]	P38981	1.00E-86
3.	60S ribosomal protein L13A	[Mytilus edulis]	ABA46793.1	5.00E-51
4.	60S ribosomal protein L17	[Podocoryne carnea]	CAA50504.1	1.00E-40
5.	60S ribosomal protein L23	[Ixodes scapularis]	AAAY66949.1	2.00E-56
6.	60S ribosomal protein L3	[Toxocara canis] [Argopecten irradians]	P49149 AAN05614.1	7.00E-34 9.00E-40
7.	60S ribosomal protein L6	[Pagrus major] [Strongylocentrotus purpuratus] [Ictalurus punctatus]	AAP20201.1 XP_788067.1 AAK95130.1	1.00E-51 8.00E-55 2.00E-30
8.	60S ribosomal protein P2	[Cryptochiton stelleri] [Culicoides sonorensis]	AAC15656.1 AAV84269.1	6.00E-15 3.00E-19
9.	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	[Rattus norvegicus] [Mus musculus]	AAH62006.1 AAC52329.1	1.90E-02 4.00E-03
10.	arginine kinase	[Crassostrea gigas]	BAD11950.1	3.00E-23
11.	ATP synthase beta subunit	[Nucula proxima]	AAT06142.1	3.00E-60
12.	Mitochondrial H+ ATPase a subunit	[Pinctada fucata]	ABJ51956	4.00E-47
13.	BTF3a	[Pagrus major]	AAP20163.1	9.00E-23
14.	cathepsin L	[Hymeniacion perlevis]	ABB91778.1	2.20E-03
15.	chitinase	[Haemaphysalis longicornis]	BAC06447.1	3.00E-05
16.	cystatin A1	[Dictyostelium discoideum]	XP_629960.1	5.00E-09
17.	cytochrome c oxidase subunit II	[Crassostrea gigas]	NP_037546.1	7.00E-66
18.	delta-9-desaturase	[Ctenopharyngodon idella]	CAB53008.1	4.00E-34
19.	disrupted transposase of Tn10	[uncultured bacterium]	CAH64774.1	3.00E-146
20.	ENSANGP00000014070	[Anopheles gambiae str. PEST]	EAA11925.2	7.00E-08
21.	eukaryotic translation elongation factor 1 delta	[Xenopus tropicalis]	CAJ83858.1	8.00E-25
22.	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	[Branchiostoma lanceolatum]	AAM93480.1	9.00E-46
23.	Eukaryotic translation elongation factor 2	[Xenopus tropicalis]	AAH84061.1	1.00E-24
24.	Ferritin GF1	[Crassostrea gigas]	AAP83793.1	3.00E-34
25.	Ferritin GF2	[Crassostrea gigas]	AAP83794.1	7.00E-75
26.	GA10443-PA	[Drosophila pseudoobscura]	EAL33959.1	2.00E-12
27.	H(+)-transporting ATP synthase	[Rattus norvegicus]	CAA39599.1	1.00E-40
28.	heat shock protein 70	[Crassostrea gigas]	AAD31042.1	5.00E-105
29.	IF protein	[Lineus viridis]	CAA69027.1	9.00E-17
30.	Ribosomal protein L10a	[Suberites domuncula] [Apis mellifera]	AAX48842.1 XP_397307.2	4.00E-42 5.00E-41
31.	MGC80014 protein	[Xenopus laevis]	AAH77266.1	4.00E-20
32.	Mitochondrial ATP synthase gamma subunit	[Theromyzon tessulatum] [Cyprinus carpio]	AAW02966.1 BAB47390.1	2.00E-15 8.00E-12

Tabla VI Continuación.

Proteína	Especie	GenBank	Valor E
33. mitochondrial ATPase alpha subunit	[Ictalurus punctatus]	ABD65517.1	5.00E-41
34. Myc homolog	[Crassostrea virginica]	AAB34577.1	1.00E-05
35. nitric oxide synthase 2	[Lymnaea stagnalis]	AAW88577.1	1.00E-13
36. novel histone H2A family member	[Mus musculus]	CAI26006.1	4.00E-29
37. O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1	[Danio rerio]	AAI09474.1	4.00E-11
38. PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L29 (Cell surface heparin binding protein HIP)	[Pan troglodytes]	XP_517026.1	2.00E-12
39. PREDICTED: similar to chromosome 13 open reading frame 12; 2510048006Rik	[Gallus gallus]	XP_417119.1	6.00E-21
40. PREDICTED: similar to Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1, mitochondrial precursor (COX IV-1) (Cytochrome c oxidase polypeptide IV)	[Strongylocentrotus purpuratus]	XP_796538.1	2.00E-03
41. PREDICTED: similar to ribosomal protein L18a isoform 3	[Bos taurus]	XP_886640.1	1.00E-29
42. PREDICTED: similar to ribosomal protein L27 isoform 1	[Strongylocentrotus purpuratus]	XP_780039.1	9.00E-03
43. PREDICTED: similar to small optic lobes	[Danio rerio]	XP_697368.1	6.00E-04
44. PREDICTED: similar to SOP2	[Apis mellifera]	XP_392430.1	7.00E-03
45. putative HMG-like protein	[Crassostrea gigas]	CAD91447.1	2.00E-49
46. QM protein	[Pinctada fucata]	AAN85578.1	1.00E-30
47. Receptor of Activated Kinase C 1	[Mya arenaria]	CAL48986.1	2.00E-119
48. ribosomal protein L	[Argopecten irradians]	AAN05596.1	2.00E-68
49. ribosomal protein L10a isoform B	[Lysiphlebus testaceipes]	AAX62471.1	3.00E-40
50. ribosomal protein L13	[Ictalurus punctatus]	AAK95139.1	8.00E-17
51. ribosomal protein L14	[Argopecten irradians]	AAN05609.1	5.00E-23
52. ribosomal protein L17A	[Argopecten irradians]	AAN05612.1	6.00E-68
	[Crassostrea gigas]	CAD91439.1	4.00E-48
53. ribosomal protein L18	[Crassostrea gigas]	CAD91422.1	5.00E-67
54. ribosomal protein L18a variant	[Homo sapiens]	BAD96367.1	2.00E-30
55. ribosomal protein L19	[Crassostrea gigas]	CAD91441.1	1.00E-27
56. ribosomal protein L26	[Argopecten irradians]	AAN05608.1	2.00E-22
57. ribosomal protein L32	[Crassostrea gigas]	CAD79337.1	3.00E-27
	[Xenopus laevis]	CAA38849.1	1.00E-40
58. ribosomal protein L35Ae	[Carabus granulatus]	CAJ17420.1	5.00E-40
59. ribosomal protein L40	[Crassostrea gigas]	CAD91438.1	8.00E-18
60. ribosomal protein L5	[Crassostrea gigas]	CAD91421.1	8.00E-31
61. ribosomal protein S11	[Crassostrea gigas]	CAD91419.1	3.00E-28
62. Ribosomal protein S14	[Danio rerio]	AAH59561.1	5.00E-27
	[Stomoxys calcitrans]	AAD26263.1	1.00E-45
63. ribosomal protein S27-1	[Crassostrea gigas]	CAD91436.1	2.00E-45
64. ribosomal protein S4	[Argopecten irradians]	AAN05593.1	8.00E-52
65. ribosomal protein S5	[Crassostrea gigas]	CAD91445.1	7.00E-74
66. ribosomal protein S6	[Gallus gallus]	AAF18987.1	1.00E-62
	[Homo sapiens]	AAH13296.1	2.00E-75

Tabla VI Continuación.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
67.	ribosomal protein S8	[Crassostrea gigas]	CAD91426.1	2.00E-59
68.	Rps9-prov protein	[Xenopus laevis]	AAH41242.1	2.00E-50
69.	RSSA_URECA 40S ribosomal protein SA (p40) (34/67 kDa laminin binding protein)	[Urechis caupo]	P38981	3.00E-86
70.	SHG stress oxydatif	[Littorina littorea]	AAM20843.1	2.00E-02
71.	SJCHGC02562 protein	[Schistosoma japonicum]	AAX30262.1	6.00E-15
72.	TGF beta-inducible nuclear protein	[Aplysia californica]	AAU05111.1	4.00E-53
73.	translation elongation factor-1 gamma	[Locusta migratoria]	AAL78751.1	3.00E-33
74.	vitellogenin	[Verasper moseri]	BAD93696.1	1.00E-43
75.	voltage dependent anion channel	[Rattus norvegicus]	AAD22723.1	2.00E-11

Tabla VII. Genes putativos inhibidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L⁻¹ durante 15 días.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
1.	DC2-related axonemal dynein intermediate chain 4	[Ciona intestinalis]	BAE71135.1	3.00E-12
2.	Elongation factor 2	[Oxyuranus scutellatus scutellatus]	AAV33974.1	8.00E-26
3.	Heat shock protein 1	[Lonomia obliqua]	AAV91360.1	5.00E-06
4.	Hemocyte extracellular superoxide dismutase	[Crassostrea gigas]	AAV60161.1	5.00E-49
	Lipoprotein lipase	[Danio rerio]	AAH64296.1	9.00E-12
5.		[Oncorhynchus mykiss]	CAB40545.1	6.00E-15
		[Siniperca chuatsi]	AAX56090.1	3.00E-13
6.	MGC53587 protein	[Xenopus laevis]	AAH41749.1	9.00E-03
7.	MLE_PATYE Myosin, essential light chain, adductor muscle (Sulfhydryl light chain) (SHLC)	[Mizuhopecten yessoensis]	P07290	2.00E-09
8.	Myosin essential light chain	[Crassostrea gigas]	CAD91423.1	7.00E-08
9.	NADH dehydrogenase 1	[Crassostrea gigas]	AAF20051.1	9.00E-57
10.	Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase subunit 9 and Rieske iron sulfur protein	[Pithecia irrorata]	AAR32721.1	1.00E-26

Tabla VIII. Genes putativos inducidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L⁻¹ durante 30 días.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
1.	40S ribosomal protein S4	[Mytilus edulis]	ABA55738.1	4.00E-40
		[Argopecten irradians]	AAN05593.1	4.00E-41
2.	40S ribosomal protein S9	[Ictalurus punctatus]	AAK95191.1	6.00E-65
		[Ixodes scapularis]	AAV66962.1	2.00E-15
3.	60S ribosomal protein L13A	[Mytilus edulis]	ABA46793.1	4.00E-46
4.	alpha-1 type XI collagen	[Gallus gallus]	AAA48707.1	2.00E-11
5.	Apolipoporphins precursor	[Locusta migratoria]	Q9U943	5.00E-16
6.	ATP synthase beta subunit	[Pinctada fucata]	ABC86835.1	4.00E-52
7.	brain acidic ribosomal phosphoprotein P0	[Rana sylvatica]	AAG09233.1	6.00E-23
8.	carboxypeptidase B	[Litopenaeus vannamei]	ABD65300.1	3.00E-28
9.	cathepsin	[Branchiostoma lanceolatum]	AAQ01137.1	1.00E-26
10.	cathepsin L	[Hymeniacidon perlevis]	ABB91778.1	2.00E-03
11.	cavortin	[Crassostrea gigas]	AAP12558.1	1.00E-31
12.	chitinase 10	[Tribolium castaneum]	NP_001036067.1	1.00E-03
13.	cytochrome P450 like_TBP	[Citrullus lanatus]	BAD26579.1	3.00E-22
14.	defensin	[Anopheles sinensis]	AAV21793.1	2.00E-06
15.	delta-9-desaturase	[Ctenopharyngodon idella]	CAB53008.1	1.00E-23
16.	elongation factor 1 alpha	[Crassostrea gigas]	BAD15289.1	1.00E-91
17.	elongation factor 2	[Oxyuranus scutellatus scutellatus]	AAV33974.1	8.00E-26
18.	ER-resident chaperone calreticulin	[Ictalurus punctatus]	AAQ19852.1	4.00E-13
19.	Eukaryotic translation elongation factor 2	[Gallus gallus]	NP_990699.1	2.00E-58
		[Xenopus tropicalis]	AAH84061.1	1.00E-25
20.	ferritin GF1	[Crassostrea gigas]	AAP83793.1	2.00E-42
21.	fertilization envelope outer layer protein	[Cyprinus carpio]	AAD23572.1	3.00E-14
22.	glutamine synthetase	[Crassostrea gigas]	CAD90162.1	2.00E-78
23.	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	[Crassostrea gigas]	CAD67717.1	2.00E-37
24.	GTP-binding nuclear protein Ran	[Bombyx mori]	ABD36346.1	4.00E-40
25.	guanine nucleotide-binding protein	[Petromyzon marinus]	AAM88904.1	8.00E-33
26.	heat shock protein 70	[Crassostrea gigas]	AAD31042.1	1.00E-105
27.	hemolactin	[Drosophila melanogaster]	BAA88518.1	7.00E-09
28.	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	[Mus musculus]	NP_031542.1	5.00E-22
29.	histone H1	[Mytilus chilensis]	CAC94905.1	1.00E-08
		[Mytilus trossulus]	CAC94908.1	1.00E-08
30.	Hypothetical 18K protein	[Carassius auratus]	JC1348	3.00E-03
31.	MGC80014 protein	[Xenopus laevis]	AAH77266.1	5.00E-20
32.	Mitochondrial H+ ATPase a subunit	[Pinctada fucata]	ABJ51956.1	1.00E-24
33.	Myc homolog	[Crassostrea virginica]	AAB34577.1	1.00E-05
34.	Myeloid leukemia-associated SET translocation protein	[Danio rerio]	AAQ97849.1	2.00E-18
35.	NADH dehydrogenase 1	[Crassostrea gigas]	AAF20051.1	3.00E-59
36.	NADH dehydrogenase subunit 6	[Crassostrea gigas]	NP_037551.1	1.00E-20
37.	novel protein similar to vertebrate eukaryotic translation elongation factor 1 delta	[Danio rerio]	CAI21007.1	2.00E-51

Tabla VIII. Continuación.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
38.	PREDICTED: methionine adenosyltransferase I, alpha	[Rattus norvegicus]	XP_579352.1	4.00E-38
39.	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L6	[Strongylocentrotus purpuratus]	XP_788067.1	2.00E-38
40.	PREDICTED: similar to eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	[Homo sapiens]	XP_944971.1	3.00E-29
41.	PREDICTED: similar to GA13976-PA	[Apis mellifera]	XP_394269.2	5.00E-15
42.	PREDICTED: similar to Intestinal mucin-like protein (MLP), partial	[Danio rerio]	XP_684190.1	4.00E-06
43.	PREDICTED: similar to male sterility domain containing 1	[Rattus norvegicus]	XP_575726.1	7.00E-11
44.	PREDICTED: similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5	[Mus musculus]	XP_899400.1	5.00E-10
45.	PREDICTED: similar to PTEN induced putative kinase 1	[Danio rerio]	XP_688367.1	1.00E-11
46.	QM protein	[Pinctada fucata]	AAN85578.1	1.00E-30
47.	Ran protein	[Salmo salar]	CAA10040.1	1.00E-16
48.	ribosomal protein L	[Argopecten irradians]	AAN05596.1	4.00E-68
49.	ribosomal protein L17A	[Argopecten irradians]	AAN05612.1	6.00E-68
		[Crassostrea gigas]	CAD91439.1	9.00E-45
50.	ribosomal protein L18	[Crassostrea gigas]	CAD91422.1	5.00E-67
51.	ribosomal protein L27	[Pisum sativum]	1909362A	7.00E-16
52.	ribosomal protein L3	[Argopecten irradians]	AAN05614.1	9.00E-40
		[Toxocara canis]	P49149	7.00E-34
		[Apis mellifera]	XP_624821.1	1.00E-39
53.	ribosomal protein L35a	[Cirrhinus molitorella]	AAY21901.1	6.00E-31
54.	ribosomal protein L35Ae	[Carabus granulatus]	CAJ17420.1	5.00E-40
55.	ribosomal protein L7	[Crassostrea gigas]	CAD89885.1	2.00E-35
56.	ribosomal protein L9	[Argopecten irradians]	AAN05606.1	3.00E-26
57.	ribosomal protein P2-like	[Culicoides sonorensis]	AAV84269.1	3.00E-19
58.	ribosomal protein S13	[Argopecten irradians]	AAN05601.1	5.00E-25
59.	ribosomal protein S18	[Crassostrea gigas]	BAE16014.1	6.00E-28
60.	ribosomal protein S2	[Chlamys farreri]	AAM94271.1	1.00E-51
		[Urechis caupo]	P49154	1.00E-50
61.	ribosomal protein S27-1	[Crassostrea gigas]	CAD91436.1	2.00E-45
62.	ribosomal protein S3a	[Crassostrea gigas]	CAD91420.1	4.00E-120
63.	similar to Drosophila melanogaster alphaTub84B	[Drosophila yakuba]	AAR09810.1	1.00E-86
64.	taurine transporter	[Crassostrea gigas]	BAE80716.1	2.00E-56
65.	TGF beta-inducible nuclear protein	[Aplysia californica]	AAU05111.1	2.00E-39
66.	thioester-containing protein	[Euphaedusa tau]	BAE44110.1	4.00E-33
67.	thymosin beta 4	[Gallus gallus]	NP_001001315.1	6.00E-12
68.	translation elongation factor 1-gamma	[Danio rerio]	NP_001019390.1	1.00E-25
69.	translationally-controlled tumor protein	[Branchiostoma belcheri]	AAK84394.1	1.00E-16
70.	vdg3	[Mytilus edulis]	ABB76764.1	4.00E-10
71.	vitelline membrane outer layer protein I-like protein	[Pacifastacus leniusculus]	AAX54597.1	1.00E-13
72.	vitellogenin	[Verasper moseri]	BAD93696.1	1.00E-17

Tabla IX. Genes putativos inhibidos por exposición a γ HCH 0.2 mg L⁻¹ durante 30 días.

	Proteína	Especie	GenBank	Valor E
1.	Death-associated protein	[Ixodes scapularis]	AAV66888.1	2.00E-15
		[Apis mellifera]	XP_392446.1	9.00E-14
2.	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	[Danio rerio]	ABC59849.1	2.00E-33
3.	NADH dehydrogenase subunit 3	[Crassostrea gigas]	NP_037552.1	4.00E-14
4.	PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L17 (L23)	[Canis familiaris]	XP_849424.1	2.00E-10
5.	PREDICTED: similar to Apolipoprotein(a) precursor (Apo(a)) (Lp(a))	[Strongylocentrotus purpuratus]	XP_783458.1	2.00E-07
6.	Ribosomal protein L22	[Argopecten irradians]	AAN05585.1	4.00E-12
7.	Ribosomal protein S19	[Chlamys farreri]	AAO11519.1	1.00E-15
8.	Ribosomal protein S24	[Bombyx mori]	AAV34881.1	2.00E-15
9.	Ribosomal protein S5	[Crassostrea gigas]	CAD91445.1	7.00E-74
		[Danio rerio]	AAH59443.1	4.00E-59
10.	Vitellogenin	[Verasper moseri]	BAD93696.1]	7.00E-40

6.7. Evaluación de genes diferencialmente expresados por la exposición a lindano.

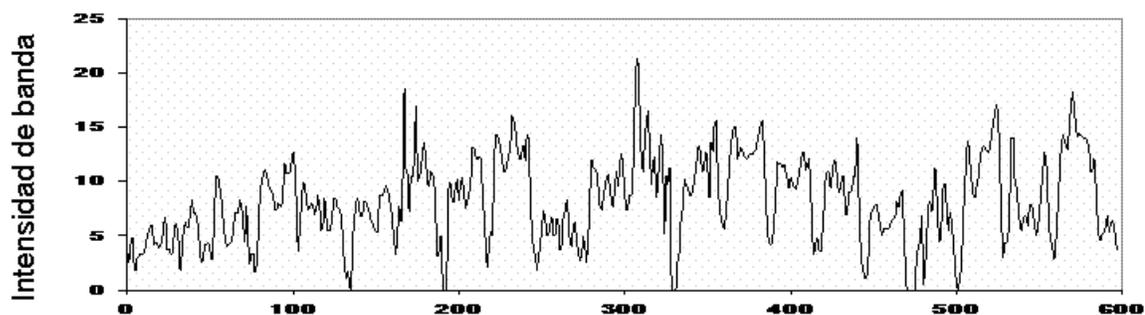
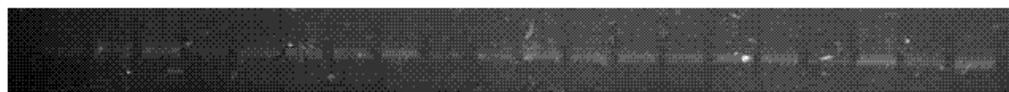
Cuatro EST de alta similitud a genes en procesos de estrés ambiental fueron seleccionadas para ser evaluadas por cinética de expresión. El criterio de selección se basó en la función molecular reconocida para los genes putativos, donde dicha función este relacionada a los mecanismos de respuesta del organismo al estrés químico o a proceso fisiológicos y celulares sensibles a la exposición del tóxico. De esta forma se seleccionaron los EST con similitud a los genes de la superóxido dismutasa (SOD), la ferritina GF2 y la proteína SHG; estas proteínas muestran relación con la presencia de especies reactivadas de

oxígeno (ROS) y radicales libres. El cuarto EST seleccionado muestra similitud al gen de la proteína QM; dicho gen codifica para una proteína involucrada en el ciclo celular y es reconocido como factor supresor de tumores. Adicionalmente fue utilizado el gen de actina como gen de referencia en la cuantificación relativa de la expresión.

Muestras individuales de glándula digestiva de cinco ostiones expuestos a 0.2 mg L⁻¹ fueron tomadas en el día previo y a los 7, 15 y 30 días de exposición. El RNA total fue purificado y se sintetizó el cDNA correspondiente para cada muestra. Los cDNA fueron amplificados por PCR utilizando *primers* específicos diseñados en base a la secuencia de las EST obtenidas para los genes de actina, SOD, ferritina GF2, proteína QM y proteína SHG. El producto de amplificación de cada organismo para los cinco genes evaluados fue corrido por electroforesis horizontal y fue detectado por luz ultravioleta en una solución de BrEt. La imagen digitalizada fue analizada por el programa ImageJ generando un gráfico de la densidad óptica (DO) de la columna de pixeles en el eje de las ordenadas, eje X (figs.16, 17 y 18).

De acuerdo a lo esperado, las diferencias de expresión del gen de actina al tiempo inicial y en los días 7, 15 y 30 posteriores a la exposición de γ HCH no presentaron diferencias de expresión significativas entre ellas.

Actina



Superóxido dismutasa (SOD ó Cavortina)

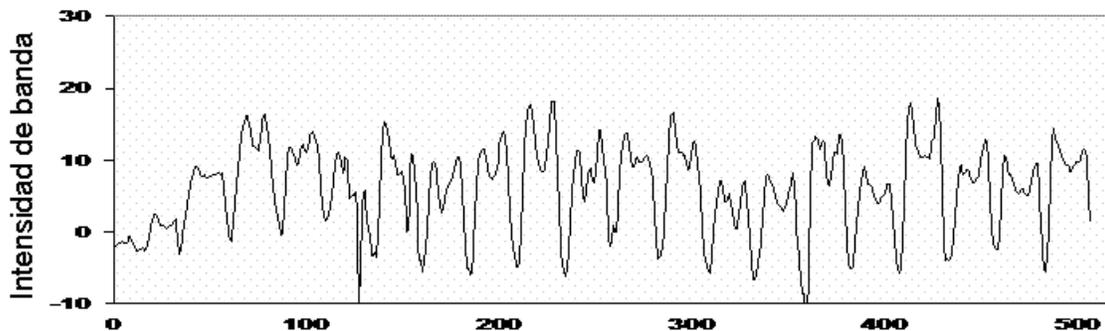
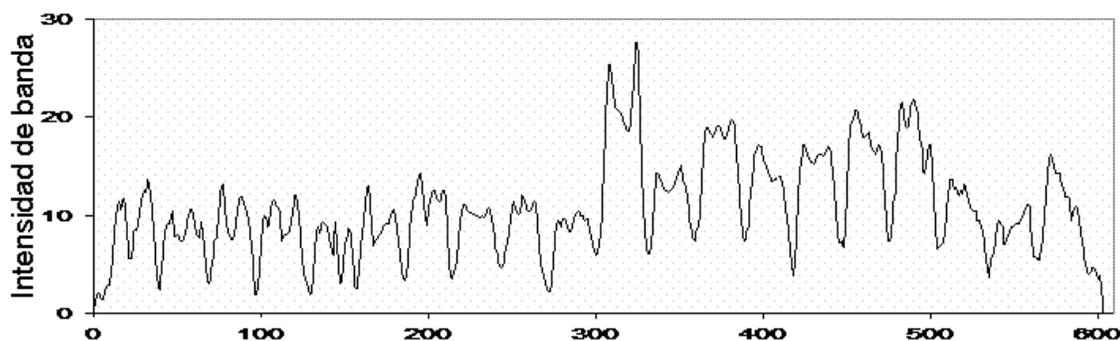
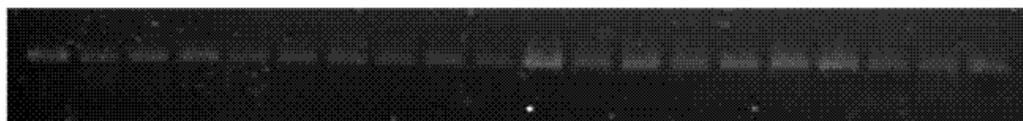


Figura 16. Expresión de genes inducidos o inhibidos por exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH . Los genes de actina y SOD fueron amplificados por 32 ciclos. Las gráficas indican el valor numérico de la intensidad de la banda en la imagen digitalizada. Los primeros cinco carriles corresponden a los organismos sin exposición a γHCH ; del 6 al 10 a organismos expuestos a γHCH por 7 días, del 11 al 15 a organismos expuestos por 15 días y del 16 al 20 a organismos expuestos por 30 días.

Ferritina GF2



Proteína SHG

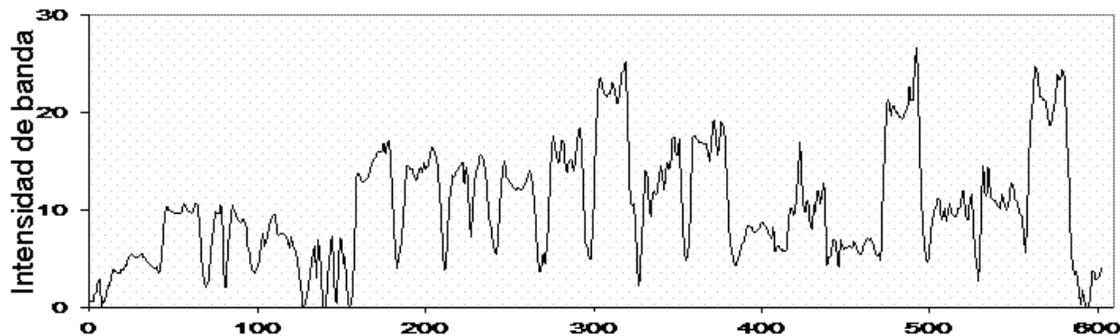
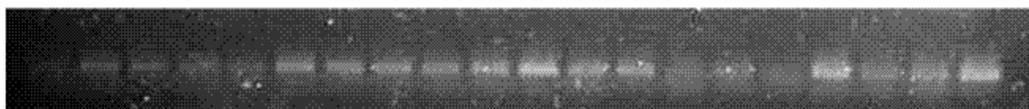


Figura 17. Expresión de genes inducidos por exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH . Los genes de ferritina GF2 y SHG fueron amplificados por 32 ciclos. Las gráficas indican el valor numérico de la intensidad de la banda en la imagen digitalizada. Los primeros cinco carriles corresponden a los organismos sin exposición a γHCH ; del 6 al 10 a organismos expuestos a γHCH por 7 días, del 11 al 15 a organismos expuestos por 15 días y del 16 al 20 a organismos expuestos por 30 días.

Proteína QM

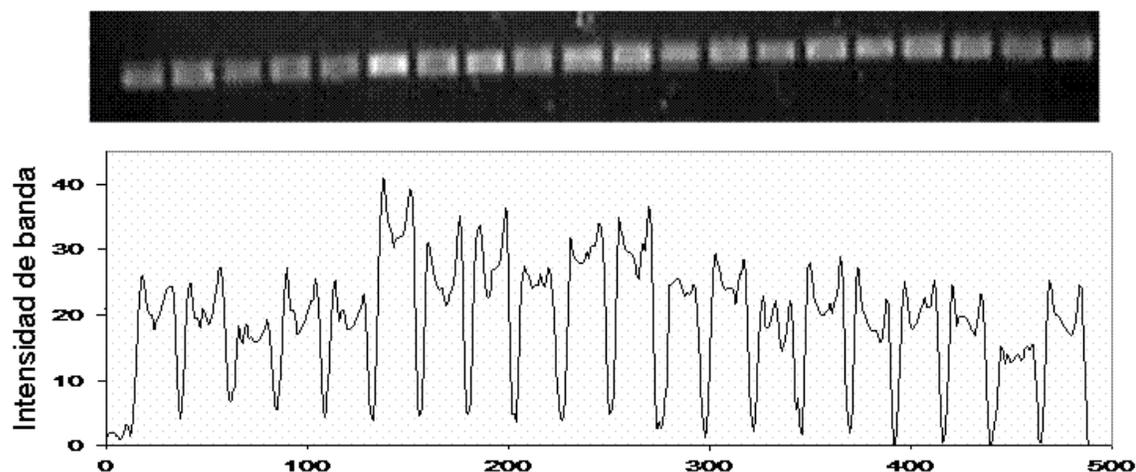


Figura 18. Expresión del gen inducido por exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH . El gen de la proteína QM fue amplificado por 31 ciclos. Las gráficas indican el valor numérico de la intensidad de la banda en la imagen digitalizada. Los primeros cinco carriles corresponden organismos sin exposición a γHCH ; del 6 al 10 a organismos expuestos a γHCH por 7 días, del 11 al 15 a organismos expuestos por 15 días y del 16 al 20 a organismos expuestos por 30 días.

Estos valores fueron utilizados para evaluar la expresión de los genes restantes en términos relativos a la expresión de actina para cada organismo.

La expresión relativa de SOD, Ferritina GF2, QM y SHG muestran diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición a γHCH (fig. 19).

Los niveles de expresión relativos de los genes evaluados en el día previo a la exposición son superiores entre 1.5 y 2.5 veces a la expresión del gen constitutivo

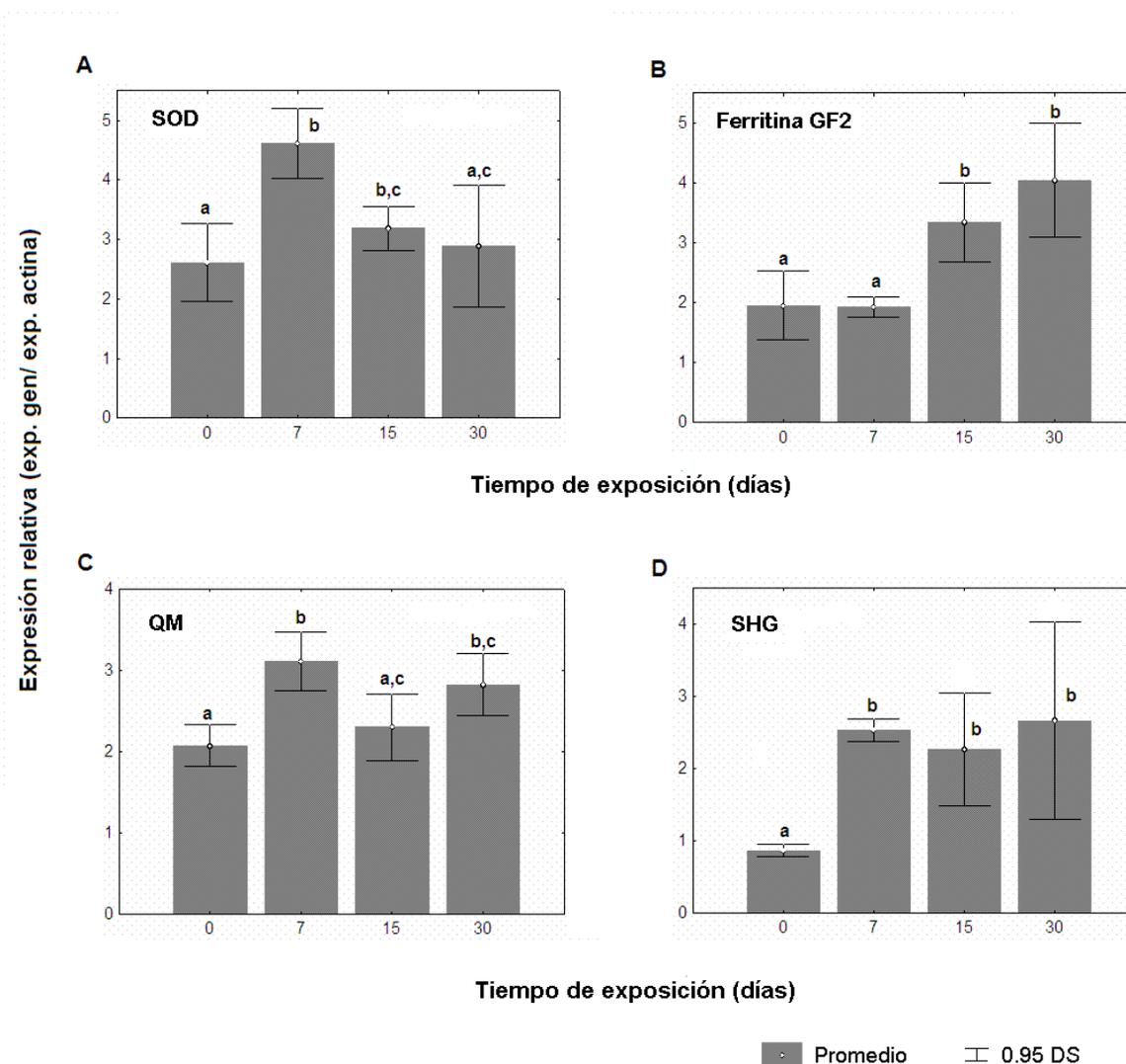


Figura 19. Cinética de expresión de genes presentes en las genotecas de glándula digestiva de *Crassostrea gigas* de organismos expuestos a 0.2 mg/L de γ HCH. A) Expresión relativa del gen de la proteína SOD; B) Expresión relativa del gen de ferritina GF2; C) Expresión relativa del gen de la proteína QM; D) Expresión relativa de la proteína SHG. Las letras minúsculas en cada gráfico indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

de actina (fig. 19A-C). Únicamente el gen de SHG mostró valores inferiores (0.8) al gen de actina (fig. 19D).

El gen de SOD muestra inducción significativa a los siete días de exposición a γ HCH, para los días 15 y 30 esta expresión fue disminuyendo hasta no mostrar diferencias estadísticas significativas con respecto al tiempo inicial (fig. 19A).

El gen de ferritina FG2 no muestra incremento en su expresión después de 7 días de exposición; a los 15 y 30 días se registraron incrementos significativos comparados con la expresión previa a la exposición de γ HCH (fig. 19B).

El gen de la proteína QM muestra incremento significativo en la expresión a los 7 y 30 días de exposición. Para la expresión registrada a los 15 días aún cuando fue superior a la expresión del tiempo inicial su diferencia no fue significativa (fig. 19C).

Finalmente la expresión del gen de la proteína SHG mostró las mayores diferencias entre la expresión del gen previo a la exposición a γ HCH y los valores registrados en los tres tiempos evaluados, las diferencias en todos los casos fueron significativas con respecto al control (fig. 19D).

7. DISCUSION.

7.1. Sensibilidad del ostión *C. gigas* a la exposición de lindano.

La exposición del ostión del pacífico *Crassostrea gigas* al plaguicida organoclorado γ HCH fue caracterizada por su efecto letal como CL_{50} . En este trabajo se reporta una CL_{50} de 2.21 mg L^{-1} a 12 días de exposición. Trabajos realizados con estadios larvarios de *C. gigas* registraron valores de CL_{50} de 0.17 mg L^{-1} después de 9 días de exposición (His y Seaman, 1993) y en otras especies de moluscos bivalvos se han reportados CL_{50} de 145 mg L^{-1} a 4 días de exposición para la especie dulce acuícola *Egeria radiata* (Udoiong y Akpan 1991) y 1.5 mg L^{-1} después de 7 días de exposición en *Mytilus galloprovincialis*. (Rao, 1981)

Las diferencias en la sensibilidad de organismos adultos de *C. gigas* comparados con organismos en estadio larvario o con otras especies de bivalvos pueden ser originadas por diversos factores; la concentración y el tiempo de exposición son las condiciones de mayor peso. Las CL_{50} de γ HCH para moluscos bivalvos se ubican entre 0.17 y 145 mg L^{-1} con tiempos de exposición entre 4 y 12 días. De estos datos se reconoce que la menor CL_{50} reportada fue realizada en organismos en estadio larvario a 9 días de exposición y la mayor CL_{50} está reportada para una especie dulceacuícola después de 4 días de exposición. La comparación de las CL_{50} de organismos adultos de *C.gigas* y *M. galloprovincialis* son las mas

cercanas en concentración (2.21 y 1.5 mg L⁻¹) y en los tiempos de exposición (12 y 7 días) respectivamente.

Algunos factores biológicos que influyen en la sensibilidad al efecto letal de plaguicidas organoclorados son: el contenido lipídico de los organismos expuestos, las condiciones metabólicas y procesos o estados fisiológicos en los que se encuentran los organismos, así como factores de estrés y condición de salud de los organismos (Geyer *et al.*, 1997; His *et al.*, 1999).

Las concentraciones letales reportadas para γ HCH y los tiempos de exposición en los bioensayos realizados con especies de moluscos son altos comparados con las CL₅₀ de especies de peces (Geyer, *et al.*, 1993). Estas diferencias pueden deberse a la capacidad de los bivalvos para controlar el flujo de agua en el interior de las valvas; convirtiéndose ésta en una primera respuesta de los moluscos bivalvos ante la presencia de agentes estresantes como plaguicidas, metales tóxicos o elementos radiactivos (Fournier *et al.*, 2004; Duquesne *et al.*, 2004). Aunado a la disminución de la exposición por el cierre de las valvas; los moluscos bivalvos tienen la capacidad de modificar su actividad metabólica y fisiológica logrando subsistir por tiempos prolongados sin ingestión de alimento (Heinonen *et al.*, 2003; Smolders *et al.*, 2004). Adicionalmente los moluscos bivalvos tienden a presentar mayor acumulación de compuestos tóxicos lipofílicos en sus tejidos grasos debido a las diferencias en la capacidad para metabolizar compuestos

exógenos por la glándula digestiva de moluscos y el hígado de peces o de vertebrados terrestres (McDollew, 1996).

En diversos trabajos científicos se ha utilizado la actividad de filtración de agua en los organismos bivalvos como indicadores de estrés ambiental (Das y Jana, 2003; Smaal *et al.*, 1991). En este proyecto se realizó una evaluación del efecto de la exposición de γ HCH en la actividad de alimentación de *C. gigas*, cuantificada como filtración de microalgas por tiempo (tasa de filtración).

La actividad de alimentación de los bivalvos esta estrechamente relacionada con la tasa de filtración de agua. En este proceso se involucra el músculo abductor, los lóbulos del manto y el sistema branquial. Cuando las valvas se encuentran abiertas los lóbulos del manto regulan la presión y velocidad de entrada y salida de agua en función de la concentración de microalgas presentes, que serán retenidas en el sistema branquial y dirigidas hacia la cavidad bucal (Gosling, 2003).

Los resultados comparativos de las tasas de filtración durante las primeras cuatro horas de exposición a γ HCH muestran decrementos en el porcentaje de actividad de alimentación, con inhibiciones significativas entre el 73.5 y 38.2%. Estos porcentajes se registraron desde la menor concentración 0.1 mg L^{-1} hasta los 0.7 mg L^{-1} ; sólo la concentración de 0.2 mg L^{-1} no mostró cambios significativos

(96.2%) respecto del grupo control. El análisis de la actividad de alimentación medida por la tasa de filtración fue realizado durante las primeras cuatro horas de exposición a γ HCH; esto se debe a que en este tiempo el comportamiento de la curva de filtración es lineal. Las mediciones posteriores a las cuatro horas tienden a disminuir la pendiente y en los grupos control y expuestos a las menores concentraciones de γ HCH la concentración de microalgas es escasa. En base a los resultados se puede reconocer que a partir de los 0.3 mg L^{-1} de γ HCH la actividad de alimentación de los organismos expuestos se ve inhibida significativamente en porcentajes de 65.8 a 38.2% evidenciando una respuesta inmediata a la presencia del plaguicida. Las inhibiciones registradas para las primeras cuatro horas de exposición a γ HCH en el décimoprimer día del bioensayo mostraron un efecto inhibitorio significativo entre 60.4% y 30.9% de actividad en todos los grupos de exposición de 0.1 a 0.7 mg L^{-1} .

La baja inhibición en la tasa de filtración del grupo 0.2 mg L^{-1} al primer día de exposición puede ser debida a que la cuantificación fue registrada como resultado de la actividad de alimentación por grupo de cuatro ostiones. En donde algún animal del grupo no haya modificado su actividad o que presentara una velocidad de alimentación por arriba del promedio de los organismos.

El efecto inhibitorio de la actividad de alimentación tanto para el primer día como para el décimoprimer día, si bien tienen diferencia significativa con el grupo control,

no se reconoce una relación entre la concentración de γ HCH y el porcentaje de actividad de alimentación debido posiblemente a diferencias en las respuestas de alimentación entre los organismos en el grupo evaluado.

Es importante mencionar que el cambio en la actividad de alimentación de los organismos no puede ser considerado como efecto tóxico del γ HCH. Pero la inhibición prolongada de la actividad es probable que propicie cambios metabólicos y fisiológicos que alterarían la condición nutricional de los organismos expuestos y en consecuencia incidirían en la condición de salud de los organismos y en la actividad de procesos fisiológicos como la maduración gonádica o el desarrollo ontológico, en los mecanismos de respuesta a patógenos y enfermedades, así como en la respuesta a otros factores de estrés ambiental como hipoxia por eutrofización o por contaminantes químicos como plaguicidas, hidrocarburos y metales tóxicos.

El efecto en la actividad enzimática de la AChE por exposición a γ HCH fue evaluado como la inhibición de la actividad AChE por el método de Ellman. La exposición a γ HCH durante 12 días indujo inhibición de la actividad AChE a 30.1, 22.3 y 22.2% en las concentraciones de 0.4, 0.5 y 0.7 mg L⁻¹ respectivamente. Estas inhibiciones son bajas comparadas con las producidas por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos a concentraciones semejantes (Anguiano *et al.*, APENDICE B); sin embargo, considerando la familia química a la

cual pertenece el γ HCH, el reporte de efecto inhibitorio en la actividad AChE por plaguicidas organoclorados lo hace relevante.

Esta ampliamente documentado el efecto de inhibición de la actividad AChE en organismos marinos por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos (Ozmen *et al.*, 1999; Printes y Callaghan, 2004; Pfeifer *et al.*, 2005). Se ha caracterizado la enzima AChE de *C. gigas* (Bocquene *et al.*, 1997) y se reporta su uso como biomarcador de exposición plaguicidas organofosforados en diversas especies de organismos marinos, incluyendo algunas especies de moluscos bivalvos (Sandhal y Jenkins, 2002; Dembélé *et al.*, 1999; Corsi *et al.*, 2003; Valbonesi *et al.*, 2003). Aunque el principal efecto neurotóxico del γ HCH ha sido caracterizado por alteración a los canales iónicos de sodio, cloro y potasio (Vale *et al.*, 2003; Parries y Hokin-Neaverson, 1985; Sauviat *et al.*, 2002). Existe un reporte de inhibición de la actividad AChE en branquias por exposición a γ HCH en la especie de bivalvo *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai *et al.*, 1998). Sin embargo no puede descartarse que la inhibición en la actividad de la enzima AChE se genere por el efecto oxidante del plaguicida sobre dicha proteína, y no por presentar las características de un inhibidor enzimático específico, como es el caso de los plaguicidas organofosforados o carbamatos (Ozmen *et al.*, 1999).

7.2. Efectos citotóxicos y genotóxicos del lindano en hemocitos de *C. gigas*.

La evaluación del efecto subletal del γ HCH se realizó a diferentes niveles de organización biológica. El efecto en toxicidad de la célula se efectuó en hemocitos de ostiones *C. gigas* expuestos a γ HCH por la técnica de tinción con azul tripano y la tinción dual con FDA-BrEt. El azul tripano es un colorante comúnmente utilizado para la cuantificación de células en solución, donde las células muertas o con problemas de integridad de membrana permiten la entrada del colorante a su interior tiñéndose la célula de azul. Las células vivas por el contrario permanecen sin coloración y se realiza el conteo de las proporciones de células azules y blancas para obtener indicadores de porcentaje de viabilidad y concentración de células vivas en cámara de Neubauer.

La técnica de tinción dual se basa en la detección por fluorescencia del producto metabolizado de FDA, este compuesto atraviesa la membrana celular y en el citoplasma de células con la maquinaria metabólica intacta se produce un metabolito fluorescente en color verde intenso. Cuando la célula está muerta o su sistema metabólico dañado no se genera la fluorescencia. Adicionalmente la presencia de BrEt en la solución permite reconocer células con rompimiento de membrana, dicha alteración permite el paso del BrEt tiñendo el núcleo de la célula en rojo bajo luz ultravioleta. De la misma forma que la tinción con azul tripano es posible realizar una cuantificación de la proporción de células verdes (viables) y

células de núcleo rojo (células dañadas) obteniendo el porcentaje de viabilidad celular.

Los efectos de citotoxicidad del γ HCH evaluado por ambas técnicas muestran resultados similares, ya que las concentraciones menores de 1 mg L^{-1} de γ HCH no muestran diferencias significativas con respecto al grupo control y en ambas tinciones los porcentajes de viabilidad de los grupos expuestos son superiores al 80%. La viabilidad registrada para los grupos de 1.0 y 5.0 mg L^{-1} presentaron un descenso en porcentajes del 67.0% o menores, siendo estas diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control de organismos no expuestos a γ HCH.

Existe una ligera diferencia entre los porcentajes viabilidad registrados por azul tripano y la tinción dual, donde la tinción con azul tripano presenta valores superiores a los registrados por la tinción dual, dicha diferencia puede deberse a que estas técnicas utilizan diferentes parámetros de evaluación. La primera evalúa la integridad de la membrana celular y la otra evalúa la actividad metabólica de la célula y la permeabilidad de membrana a BrEt. Siendo posible detectar los efectos oxidantes del tóxico sobre los compuestos citoplasmáticos, concretamente sobre la capacidad de metabolización del FDA y la peroxidación de la membrana nuclear, con mayor sensibilidad comparada con el efecto del rompimiento de la membrana lipídica de la celular por la peroxidación de ésta.

El efecto de γ HCH en la citotoxicidad de moluscos bivalvos esta poco documentado pero se reconoce efecto de estrés oxidante en diversas células de peces por exposición a plaguicidas organoclorados u organofosforados (Dorsey y Tchounwou, 2004; Li y Zhang, 2002), y se ha reportado efecto citotóxico de γ HCH en células nerviosas y hemáticas de mamíferos (Rosa *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 1992). La probable acción del γ HCH en hemocitos de *C. gigas* se dirige hacia la integridad de la membrana lipídica extracelular e intracelulares; generando peroxidación lipídica de membranas como principal efecto tóxico de la exposición a γ HCH (Banerjee *et al.*, 1999). Mayores concentraciones de éste agente oxidante pueden inducir daño en otros tipos de macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos.

La cuantificación de la toxicidad celular por exposición a un compuesto químico es un requisito previo para la evaluación genotóxica por el método de SCGE (Tice *et al.*, 2000), de forma que la determinación de genotoxicidad de un compuesto debe de presentarse en ausencia de daño citotóxico o que la toxicidad celular sea muy ligera. En general se recomienda que las muestras empleadas para la evaluación de genotoxicidad por SCGE presenten viabilidades celulares superiores al 85% (Coughlan *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2003). Las muestras de hemocitos de ostiones expuestos a γ HCH presenta estas condiciones en los grupos expuestos entre 0.1 y 0.7 mg L⁻¹. Sin embargo la evaluación de daño a la hebra de DNA por

γ HCH se extendió a los grupos de 0.1 a 5.0 mg L⁻¹ que registraron porcentajes de viabilidad celular por debajo del 68%.

El efecto genotóxico de γ HCH en hemocitos de *C. gigas* fue analizado como UA de daño al DNA por grupo de exposición. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas respecto al control en las concentraciones de 0.7, 1.0 y 5.0 mg L⁻¹. Al considerar el efecto citotóxico de γ HCH se puede observar que la concentración de 0.7 mg L⁻¹ registra daño significativo en la molécula de DNA de hemocitos sin mostrar efecto citotóxico. Las concentraciones de 1.0 y 5.0 mg L⁻¹ aun cuando muestran daño significativo al DNA, los porcentajes de viabilidad celular son bajos, indicando que dicha alteración puede ser magnificada por el efecto citotóxico. Por estas causas se puede reconocer que la exposición a 0.7 mg L⁻¹ de γ HCH durante 12 días muestra efecto genotóxico en hemocitos de *C. gigas*.

La evaluación genotóxica del γ HCH también fue realizada con el porcentaje de frecuencia de los hemocitos en cada categoría de daño al DNA y se obtuvieron resultados similares a la evaluación por UA. Las concentraciones de 0.7, 1.0 y 5.0 mg L⁻¹ presentaron diferencias significativas respecto al control. El gráfico de frecuencia de daño (ver 6.Resultados, fig. 11, pág. 72) permite observar un incremento en el porcentaje de células con niveles de daño (2 y 3) conforme se incrementa la concentración del γ HCH, disminuyendo el porcentaje de células sin daño (nivel 0), Estas diferencias sin llegar a ser estadísticamente significativas se

pueden observar en hemocitos de organismos expuestos a γ HCH a partir en las concentraciones de 0.3, 0.4 y 0.5 mg L⁻¹.

Los resultados anteriormente mencionados fueron confirmados cuando se realizó el análisis de correlación entre el nivel de daño al DNA de cada organismo y la concentración de γ HCH. Se reconoce una correlación lineal positiva por exposición a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg L⁻¹ de γ HCH ($r=0.7286$). Para este análisis no fue considerado el grupo de concentración a 0.5 mg L⁻¹ debido a que los valores de UA disminuyeron respecto a la concentración de 1.0 mg L⁻¹. Esta situación puede deberse a que se observa un descenso significativo en el porcentaje de viabilidad celular de ambos grupos (entre 62.3 y 67%) y a que el número de organismos de grupo expuesto a 0.5 mg L⁻¹ de γ HCH fue bajo ($n=3$), ya que en esta concentración se registraron altas mortalidades después de 12 días de exposición; dando la posibilidad de que los organismos evaluados correspondan a los animales con mayor resistencia al daño por exposición a γ HCH.

Los hemocitos presentaron efecto genotóxico por exposición a γ HCH en los tres análisis efectuados. El uso de hemolinfa ha sido reportado en trabajos de toxicología ambiental y genotoxicidad de especies de moluscos bivalvos (Cheung *et al.*, 2006; Hamoutene *et al.*, 2002). La ventaja del uso de este tipo celular sobre otros, como el tejido branquial, el manto o la glándula digestiva, se debe a que el procedimiento de preparación de la muestra se simplifica y que al ser un tejido

celular ampliamente distribuido en los organismos la evaluación de hemolinfa muestra el efecto sistémico del tóxico. Adicionalmente, resultados reportados para tejidos de branquia y glándula digestiva muestran importantes niveles de ruido de fondo en la evaluación por fluorescencia (Rigonato *et al.*, 2005; Carrisoza, 2006).

El γ HCH ha sido reportado como agente genotóxico en diferentes tejidos de mamíferos. Es capaz de inducir daño en la molécula de DNA de células epiteliales humanas evaluada por SCGE (Pool-Zobel *et al.*, 1993), induce la aparición de micronúcleos y daño al DNA en hepatocitos murinos y humanos (Mattioli *et al.*, 1996; Kalantzi *et al.*, 2004). En invertebrados terrestres se reporta efecto genotóxico del γ HCH en anélidos (*et al.*, 2005). El probable modo de acción del γ HCH para generar daño al DNA se debe a la capacidad de éste compuesto de generar estrés oxidante en las células expuestas, dicha capacidad ha sido comprobada por reportes donde la exposición a γ HCH induce respuestas en la concentración y actividad de enzimas antioxidantes (Rocher *et al.*, 2006; Ananya *et al.*, 2005). La molécula de DNA presente en las células muestra alta sensibilidad al efecto de compuestos oxidantes como el γ HCH y a ROS como los radicales hidroxilo. La heterogenicidad y estructura química del DNA la hace vulnerable a la exposición de ROS tanto en las bases nucleotídicas como en las azúcares fosfatadas presentes en el esqueleto de carbono de la molécula. Sin embargo se reportan mayor sensibilidad de la estructura nucleotidas sobre la alteración de los azucares del esqueleto de carbono.

La principal alteración ocasionada por estrés oxidante incide en la base 2-deoxiguanosina induciendo su oxidación a la forma 8-oxo 2-hidroxi-guanosina. Adicionalmente alteraciones en los azúcares de la DNA produce sitios apurínicos donde las bases han sido removidas y rompimiento de la cadena sencilla o doble donde los azúcares han sido oxidados (Valavanidis et al., 2006).

7.3. Biomarcadores de exposición o efecto de lindano en *C. gigas*.

El análisis integral de los efectos tóxicos inducidos por exposición a γ HCH muestra diferencias en la concentración mínima de efecto observado para los distintos parámetros o biomarcadores utilizados. Esta información puede ser ordenada en escala gradual de menor a mayor concentración y relacionarse con el nivel de organización biológica en el cual se ubique el biomarcador (fig. 20).

La menor concentración en la cual se observa efecto fue 0.1 mg L^{-1} registrado para el efecto en la actividad de alimentación o tasa de filtración después de once días de exposición. La inhibición de la actividad AChE mostró efecto significativo a 0.4 mg L^{-1} . El efecto genotóxico fue observado en hemocitos por SCGE en la concentración de 0.7 mg L^{-1} y se observó efecto citotóxico en hemocitos en concentraciones de 1.0 mg L^{-1} . Finalmente se calculó el efecto letal como CL_{50} después de 12 días de exposición a γ HCH obteniendo un valor de 2.219 mg L^{-1} .y registrando mortalidad de organismos en concentraciones a partir de 0.3 mg L^{-1} .

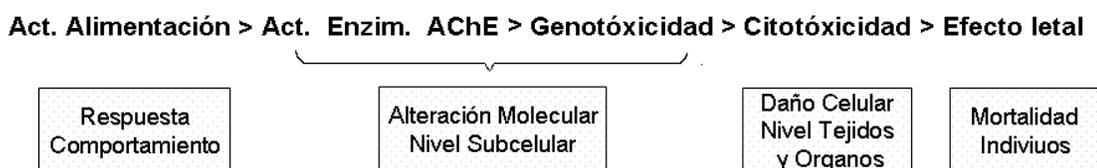


Figura 20. Sensibilidad de biomarcadores utilizados a la exposición por 12 días a γ HCH. En los recuadros se indica el nivel de organización biológica de cada biomarcador.

Se observa que las menores concentraciones tienen efecto en los niveles de organización inferiores a nivel subcelular o del comportamiento en respuesta a factores de estrés y al incrementarse la concentración del tóxico se encuentran daños significativos a niveles tisulares, orgánicos o sistémicos hasta incidir en efectos letales de los organismos expuestos. Estos datos concuerdan con los patrones de respuesta propuestos para los biomarcadores de exposición y toxicidad en organismos silvestres (Schlenk, 1999; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003; Sarkar *et al.*, 2006)

La evaluación del efecto tóxico del γ HCH en este proyecto fue realizada hasta el nivel individual en bioensayos de laboratorio. Los análisis de los resultados sugieren la posibilidad de que la exposición a lindano en ambientes naturales en concentraciones de 0.4 mg L^{-1} por tiempos prolongados incidirían en procesos biológicos y en la subsistencia de organismos de la población con las consecuentes repercusiones ecológicas para el sistema.

7.4. Efecto en la expresión génica de la glándula digestiva de *C. gigas* por exposición crónica subletal a lindano.

El bioensayo de exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH durante 15 y 30 días fue realizado para analizar el efecto en la expresión de genes de la glándula digestiva por exposición crónica subletal a lindano.

La técnica de hibridación por supresión sustractiva (SSH) fue exitosamente utilizada para la obtención de EST diferencialmente expresadas en las cuatro genotecas generadas, obteniendo 1289 secuencias de alta calidad. Esta técnica de obtención de genotecas ha sido utilizada para obtener genes expresados en diferentes tejidos de diversas especies de organismos y bajos varios factores de estrés ambiental (Straub *et al.*, 2004; Boutet *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2006; David *et al.*, 2005).

Las genotecas obtenidas fueron clasificadas como secuencias de genes inducidos y genes inhibidos por la exposición a γHCH durante 15 y 30 días en relación con la expresión de genes del grupo control. La mayoría de las secuencias obtenidas no presentaron similitud significativa con secuencias registradas en GenBank ($E > 10^{-2}$) con un porcentaje general de 41.6% y entre el 45.8 y 79.1% en las diversas genotecas. Estas cifras revelan que aun cuando la especie de *C. gigas* ha sido un

modelo biológico ampliamente utilizado en diversos estudios y procesos biológicos a nivel molecular; existe en la actualidad una gran cantidad de genes y proteínas de las cuales se desconoce la función molecular y el proceso biológico en el cual participan. Las bibliotecas de genes inducidos presentaron elevados porcentajes de EST con similitud a genes ribosomales, factores reguladores de transcripción y factores de traducción; en su conjunto estas EST representan entre el 31.6 y el 26.9% para los 15 y 30 días respectivamente. Estos porcentajes de secuencias son indicativos de intensa actividad de la maquinaria celular relacionada a la expresión génica.

El resto de las secuencias presentaron similitud con 168 genes registrados en GenBank; de ellas el 20.3% corresponden a genes de *Crassostrea gigas*, 21.4% a genes del Género *Crassostrea sp.*, 39.2% a genes de moluscos bivalvos, 43.4% genes pertenecientes a organismos de *Phylum Mollusca* y 69% a genes de invertebrados. Estos resultados indican que las bibliotecas generadas fueron eficientemente selectivas para EST de *C. gigas* y la técnica de SSH presenta alta eficiencia para enriquecer y normalizar EST de bajo número de copias.

Por los resultados obtenidos en este trabajo queda de manifiesto que los principales procesos biológicos que se ven afectados por la exposición crónica a 0.2 mg L^{-1} de γHCH son los procesos de transcripción y traducción de genes, los procesos metabólicos para proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, mecanismos de

respuesta a estrés oxidante y moléculas transportadoras de iones y electrones. Dichos procesos han sido reportados por su sensibilidad a factores ambientales como hidrocarburos, plaguicidas o eventos de hipoxia (Tanguy *et al.*, 2008).

De los genes putativos reconocidos en las genotecas resaltan por su función molecular y por su importancia potencial como posible biomarcador: proteínas de estrés oxidante o reguladoras de iones metálicos como la ferritina GF1 y GF2, la superóxido dismutasa (SOD) o cavortina, la óxido nítrico sintasa y la SHG. Proteínas de metabolismo de lípidos como la delta 9 desaturasa. Proteínas reguladoras de transcripción y traducción de genes como la proteína Myc y la proteína QM. Algunos de estos considerados como protooncogenes inductores proliferación celular en tumores o genes con actividad supresora de tumores. Proteínas transportadoras de lípidos o proteínas como la vitelogenina, la dineina y la proteína Ran, así como proteínas relacionadas a estrés como la HSP 70.

La evaluación de la cinética de expresión génica se enfocó en el análisis de cuatro de los más relevantes EST, que presentaron similitud a genes reportados para la SOD, la ferritina GF2, la proteína QM y la proteína SHG. La expresión génica fue evaluada por análisis semicuantitativo en muestras de glándula digestiva al día 0, 7, 15 y 30 de exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH .

La cinética de expresión observada en los cuatro EST evaluados concuerda con los resultados de las genotecas obtenidas. Dichos EST se encuentran diferencialmente expresados en las genotecas de inducción a 15 o 30 días. En todos los casos se registró un incremento de expresión génica significativo en por lo menos uno de los tiempos de exposición evaluados. La expresión de la SOD registró diferencias significativas respecto al grupo control a los 7 y 15 días de exposición a γ HCH. Sin embargo, la SOD mostró un descenso en los niveles de expresión a los 15 y 30 días comparados con la expresión para los días 7 y 15, respectivamente. La expresión de SOD no presentó diferencias significativas a los 30 días de exposición a γ HCH respecto al día cero. Las genotecas de expresión reportan inhibición del gen de SOD a los 15 días e inducción de este para los 30 días. Los valores de expresión relativa obtenidos tanto para los 15 y 30 días se encuentran ligeramente por arriba del valor al del grupo control, sin embargo el incremento no es significativo para el día 30.

La SOD forma parte de una serie de enzimas que regulan la acción de compuestos ROS altamente oxidantes y constituyen una batería de proteínas que responden a eventos de estrés oxidante (Valavanidis *et al.*, 2006). La catalasa, la glutathione-S transferasa y la SOD son enzimas antioxidantes comúnmente utilizadas como indicadores de alteración por ROS (Vlahogianni *et al.*, 2007). Este tipo de enzimas responden a diversos factores de estrés ambiental, siendo sensibles a contaminantes diversos como plaguicidas, metales tóxicos o

hidrocarburos (Valavanidis *et al.*, 2006; Romero-Ruiz *et al.*, 2003; Khessiba *et al.*, 2005; Orbea *et al.*, 2002) y a múltiples parámetros ambientales como temperatura, salinidad o concentración de oxígeno, entre otros (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2002).

Por los resultados obtenidos podemos reconocer que la inducción de la SOD en glándula digestiva por exposición a γ HCH muestra una respuesta temprana al plaguicida, dicha respuesta va disminuyendo respecto al tiempo de exposición al tóxico hasta mostrar valores de expresión similares a los registrados para organismos no expuestos. El incremento en la expresión de la SOD puede ser el inicio de una respuesta integral y coordinada de una batería de enzimas y compuestos antioxidantes con la intención de abatir el estrés oxidante (Valavanidis *et al.*, 2006). Donde la expresión de las enzimas de la batería está regulada por diferentes factores de transcripción (Scandalios, 2005), por lo que se pueden generar fluctuaciones en la expresión y concentración de las diferentes enzimas en función de la concentración del agente oxidante y el tiempo de exposición al mismo.

La cinética de expresión del EST con alta similitud a ferritina muestra que para el día 7 de exposición los valores de expresión son muy similares al grupo control y para los 15 y 30 días una inducción significativa respecto al día cero de exposición al plaguicida. Las genotecas de expresión presentaron inducción en la expresión de los genes de ferritina GF1 y GF2 tanto para la exposición a 15 como a 30 días.

La ferritina es una proteína involucrada en los procesos de transporte y regulación del ion ferroso en tejido sanguíneo y otros (Torti y Torti, 2002). La acción del ion ferroso y algunas enzimas involucradas en su homeostasis tienen estrecha relación con la presencia de ROS (Puntarulo, 2005). Aunado a ello la expresión de ferritina puede ser inducida por diversos factores, influyendo la concentración de otras enzimas antioxidantes y del sistema inmune, así como factores relacionados como el sistema glutatión reductasa (Torti y Torti, 2002).

La ferritina juega un papel primordial en la captación y detoxificación de iones ferrosos que puedan encontrarse de forma libre en el sistema. Ya que este tipo de iones son altamente tóxicos por sus características oxidantes, adicionalmente se reconoce un papel protector ante eventos de estrés oxidante por la presencia de ROS (Orino *et al.*, 2001). Aun cuando el mecanismo de eliminación/reducción de ROS no ha sido dilucidado completamente existen reportes de efecto protector ante estrés oxidante por el incremento en la expresión del gen de ferritina (Torti y Torti, 2002).

La inducción del gen de ferritina GF2 por exposición a γ HCH tiene una respuesta a partir de los 15 días de exposición. Por lo que puede considerarse que este EST muestra una respuesta de expresión retardada y que puede estar relacionada en la respuesta a factores de estrés oxidante cuando los tiempos de exposición son

prolongados o crónicos. Existen estudios que demuestran la inducción a la expresión de Ferritina y otros componentes del metabolismo del hierro por un incremento en la concentración de la SOD (Danzeisen *et al.*, 2006), estos sugieren una posible respuesta coordinada entre un conjunto de enzimas y proteínas involucradas en el proceso de homeostasis por agentes oxidantes.

La evaluación del EST con similitud al gen de la proteína QM muestra incrementos significativos a los 7 y 30 días de exposición respecto al control; el incremento de expresión a los 15 días de exposición no fue significativo respecto al tiempo cero. Sin embargo este valor tampoco muestra diferencia significativa con la expresión registrada para los 30 días. Este EST fue el que mostró mayor nivel de expresión en el tiempo inicial, al mostrar valor de expresión relativos a actina por arriba de 2 y que fue necesario reducir el número de ciclos de amplificación del mismo para no saturar la lectura de la densidad óptica.

La proteína QM esta reportada como un factor supresor de tumores en mamíferos (Dowdy *et al.*, 1991) y ha sido caracterizada para el molusco bivalvo *Pinctada fucata* (Zhang *et al.*, 2004). El gen de QM se implica en la transcripción de proteínas ribosomales y en la unión de las sub unidades ribosomales 40s y 60s (Eisinger *et al.*, 1997). Adicionalmente es capaz de unirse a otras proteínas reguladoras de la transcripción como c-Jun, dicha union bloquea la capacidad la proteína c-Jun inducir la expresión de genes, relacionados con la proliferación celular en tumores de mamíferos. La proteína QM es sensible a iones metálicos

como el Zinc que bloquea su capacidad para unirse a c-Jun (Monteclaro *et al.*, 1993).

El Factor de transcripción c-Jun es una proteína activadora de la expresión de genes que ha sido localizada dentro del principal mecanismo de transducción de señales en la cascada de proteínas mitogénicas activadas por kinasa (MAP kinasas, por sus siglas en inglés). Esta cascada ha sido relacionada con la proliferación celular en tumores, inducida por hipoxia. La cascada de señalización MAP kinasas, donde se ubica c-Jun, es sensible diversos factores de crecimiento, factores supresores de tumores (como es el caso de la proteína QM), compuestos mitogénicos y factores de estrés ambiental como por ejemplo; el desbalance en la concentración de oxígeno (Kunz y Ibrahim, 2003).

La exposición γ HCH podría inducir procesos mitogénicos por la vía del factor de transcripción c-Jun y el incremento de la expresión del gen de la proteína QM puede ser generada como respuesta a la actividad de c-Jun, con la intención de mitigar posibles procesos mitogénicos por proliferación celular.

El EST con similitud a la SHG fue el que mostró las más altas diferencias entre los valores de expresión del grupo control y los tiempos de exposición a 7, 15 y 30 días. Para todos los tiempos evaluados las diferencias fueron significativas respecto al tiempo cero. Adicionalmente la expresión del tiempo cero se encuentra

por debajo de la expresión del gen constitutivo de actina y el incremento de la expresión en los organismos expuestos fue superior al doble de la expresión del gen de actina.

Estos resultados indican que el EST con similitud a la SHG fue el que mostró el mayor incremento de expresión por exposición a γ HCH, sin embargo existe un muy escaso conocimiento sobre la secuencia, estructura, función molecular y proceso biológico en el cual está involucrado,

La SHG es una proteína relacionada con procesos de estrés oxidante o hipoxia; fue caracterizada en el molusco gasterópodo *Littorina littorea*, esta secuencia está registrada en el GenBank (No. AAM 20842.1) y fue obtenida a partir de bioensayos de baja concentración de oxígeno (Larade 2001, datos no publicados). Este EST mostró un valor de similitud (E) muy cercano al límite mínimo para este trabajo ($E \times 10^{-2}$). Esta situación recalca la importancia que tiene la gran cantidad de secuencias que fueron obtenidas en las genotecas y que no presentaron similitudes significativas o que no tienen registros similares en las bases de datos bioinformáticas. Muy probablemente alguno de estos EST posea características adecuadas para ser utilizado como biomarcador de exposición o efecto de γ HCH u otros plaguicidas organoclorados.

Otro EST de *C. gigas* con alta similitud a SHG han sido obtenidos de bioensayos de exposición a condiciones de hipoxia (David *et al.*, 2005), sin embargo no se han desarrollado trabajos más profundos sobre la caracterización de dicho gen en *C. gigas*. Aun cuando existe un gran vacío en la caracterización del probable gen de SHG en *C. gigas*. Este EST no debe ser descartado como candidato a biomarcador de estrés oxidante y probablemente a compuestos tóxicos como los plaguicidas organoclorados.

El análisis general de la respuesta de expresión de estos cuatro EST por exposición crónica a 0.2 mg L^{-1} indican que estos genes muestran una cinética de respuesta distintos entre ellos.

En resumen, el gen de SOD muestra una respuesta de expresión temprana intensa, dicha inducción va disminuyendo con respecto al tiempo. El gen de la ferritina presenta una respuesta de expresión tardía a partir de los 15 días de exposición y se mantuvo por lo menos hasta los 30 días. Los genes de QM y SHG mostraron respuestas tempranas y mantenidas durante todos los tiempos analizados. El gen QM mostró niveles de expresión elevados respecto al gen constitutivo en los organismos expuestos al plaguicida y en organismos al tiempo cero. Por otro lado el gen de SHG mostró los niveles de expresión al tiempo inicial más bajos y las más altas diferencias de expresión de los organismos expuestos con respecto al grupo control.

8. CONCLUSIONES.

Este proyecto permitió profundizar en el conocimiento toxicológico tanto del plaguicida organoclorado lindano (γ HCH) como en los efectos biológicos causados por éste en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. Se observaron efectos en diferentes indicadores biológicos a distintas concentraciones del tóxico y tiempos de exposición.

La concentración letal media (CL_{50}) del γ HCH para ostiones adultos *C. gigas* expuestos durante 12 días fue de 2.219 mg L^{-1} .

El efecto citotóxico del γ HCH en hemocitos de *C. gigas* expuestos por 12 días mostró mortalidad significativa en concentraciones de 1.0 mg L^{-1} .

El γ HCH registró efecto genotóxico en hemocitos de organismos expuestos a 0.7 mg L^{-1} durante 12 días.

La actividad enzimática de la AChE reportó inhibiciones superiores al 22% en concentraciones de 0.4 mg L^{-1} y superiores después de 12 días de exposición.

La actividad de alimentación fue sensible a la exposición de γ HCH en las cuatro primeras horas de exposición a partir de los 0.3 mg L^{-1} y después de 12 días de exposición la concentración mínima de efecto fue 0.1 mg L^{-1} .

Se reconoció un cambio en la expresión génica de células de glándula digestiva por exposición a 0.2 mg L^{-1} de γHCH durante 15 y 30 días.

A partir de los resultados anteriores, se obtuvo una lista de sensibilidad a la presencia de γHCH en los diferentes biomarcadores evaluados y el efecto en la expresión génica y se relacionó con el nivel de organización biológica al cual pertenecen.

La sensibilidad de cada biomarcador en orden de mayor a menor fue:

Tasa de filtración de alimento> Inhibición o inducción de la expresión de genes> Actividad enzimática AChE> Daño a la hebra de DNA> Mortalidad de hemocitos> Efecto letal (CL_{50}).

El orden por nivel de organización biológica:

Respuesta de comportamiento> Respuesta de expresión génica> Estructura y actividad molecular> Toxicidad celular y de tejidos> Mortalidad de individuos.

La exposición crónica a γHCH induce cambios en la expresión de genes relacionados con diversos procesos biológicos. Los principalmente afectados son:

El proceso de transcripción y traducción génica, los mecanismos de respuesta a estrés ambiental y preponderantemente respuesta a estrés oxidante, los procesos de metabolismo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y procesos celulares que implican transporte de electrones o iones.

Se obtuvo un número muy importante de etiquetas de secuencias expresadas (EST) diferencialmente expresadas similares a más de 160 genes de proteínas conocidas y en un porcentaje mayoritario EST correspondientes a genes desconocidos.

Los genes sensibles a la exposición por γ HCH muestran cinéticas de expresión con respuestas diversas. La SOD muestra incrementos en los tiempos iniciales y decae paulatinamente. La ferritina tiene un retraso en la inducción de su expresión hasta los 15 y 30 días. Los genes QM y SHG muestran cambios de expresión en los primeros días de exposición y permanecen alterados durante todo el tiempo en el que se expusieron los animales.

La exposición al γ HCH en diferentes concentraciones a 12 días de exposición muestra efectos en la condición fisiológica y patológica en los organismos de *C. gigas* que pueden ser analizados de forma integral.

El efecto tóxico a los diferentes niveles de organización biológica analizados indicó incrementos graduales de alteración en los biomarcadores evaluados relacionados con la concentración del tóxico; siendo los niveles de respuesta por comportamiento, respuesta molecular por expresión génica y la alteración funcional o estructural de macromoléculas los niveles de mayor sensibilidad a la exposición de γ HCH.

Es factible evaluar la exposición a γ HCH de forma integral, reconociendo los probables niveles de concentración de este contaminante en función del grado de las alteraciones en los biomarcadores observadas en conjunto y con mayor sensibilidad si se emplean métodos de evaluación de expresión molecular como la cinética de expresión génica de genes involucrados en la respuesta a la exposición de γ HCH.

Finalmente el principal efecto tóxico observado por la exposición a γ HCH fue por estrés oxidante, dicho efecto puede incidir con diferente intensidad en los distintos niveles de organización. El ostión responde a esto mediante la disminución de su actividad de filtración para reducir la exposición a γ HCH y con la inducción de genes destinados a restablecer las alteraciones generadas por éste.

|

9. PERSPECTIVAS.

El área de la toxicogenómica ambiental requiere de estudios profundos que evalúen los cambios en la expresión de genes sensibles a compuestos tóxicos ambientales. El reconocimiento de EST con expresión diferencial por exposición a tóxicos modelo como es el caso del γ HCH es el primer paso para identificar y reconocer posibles genes y proteínas con capacidad de uso como biomarcadores.

Se requiere evaluar intensivamente las EST obtenidas en este trabajo. Cuantificando la expresión de los genes de interés por técnicas de alta sensibilidad como PCR tiempo real y relacionarse con la concentración de la proteína correspondiente en la célula, así como la evaluación de la actividad de ésta; tanto en organismos expuestos al tóxico en bioensayo, como de organismos provenientes de sitios costeros con reporte de presencia de lindano u otros plaguicidas.

Los genes de QM y SHG requieren de ser caracterizados por su estructura y función molecular, realizar evaluaciones de las proteínas correspondientes a dichos genes y comportamiento de los genes y proteínas en organismos de sitios costeros contaminados.

Existe un grupo de EST obtenidos en este trabajo que muestran alta similitud a genes putativos de interés para ser utilizados como biomarcadores de contaminación, es necesario realizar un estudio más extenso de estos EST para identificar algunos otros genes con alta probabilidad de uso en toxicología ambiental.

Se tienen identificados diversos sitios costeros en el Golfo de California y en la costa del Pacífico de Baja California Sur con reporte de presencia de lindano en tejido de organismos *C. gigas*, Siendo interesante evaluar la expresión génica de los EST estudiados, así como otros biomarcadores utilizados en este proyecto.

10. LITERATURA CITADA.

1. Aardemaa, M. J., and MacGregor, J. T. 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutation Research* 499 (2002) 13–25. 499:13-25.
2. Al-Saleh, I. A. 1994. Pesticides: A Review article. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 13 (3):151-161.
3. Alavanja, M. C. R., Hoppin, J.A., Kamel, F. 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health*. 25:155-197.
4. Aldegunde, M., Soengas, J.L., Ruibal, C., and Andrés, M.D. 1999. Effects of chronic exposure to γ -HCH (lindane) on brain serotonergic and gabaergic systems, and serum cortisol and thyroxine levels of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 20:325-330.
5. Alzieu, C. 1998. Tributyltin: case of study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean and Coastal Management*. 40:23-36.
6. Ananya, R., Subeena, S., Kumar, D.A., Kumar, D.T., Kumar, M.S. 2005. Oxidative stress and histopathological changes in the heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. *Med Sci Monit*. 11 (9):325-329.
7. Ankley, G., Mihaich, E., Sthal, R., Tillit, D., Colborn, T., Mc Master, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar,

- L., Fry, M., Giesy, J., Gray, E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., Le Blanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., van der Kraak, and Zacharewski, T. 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17 (1):68-87.
8. Auffret, M., and Oubella, R. 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In Vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A (3):705- 712.
 9. Auffret, M., Mujdzic, N., Corporeau, C., Moraga, D. 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Mar Environ Res.* 54 (3-5):585-589.
 10. Avalos, M., y Ramírez, J. 2003. Situacion del lindano en México. *Gaceta Ecológica.* 69:93-100.
 11. Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters.* 107:33-47.
 12. Barbosa, S. V. 2004. Detección de agentes virales en ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Programa de Estudios de Posgrado, Doctorado. CIBNOR. La Paz. 247.
 13. Barreiro, R., Quintela, M., Ruiz, J.M. 2004. TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Ecosistemas.* 13 (3):1-17.

14. Barrón, S., Tusell, J.M., Serratosa, J. 1995. Effect of hexachloro cyclohexane isomers on calmodulin mRNA expression in the central nervous system. *Molecular Brain Research*. 30:279-286.
15. Baudrimont, M., Metivaud, J., Maury-Brachet, R., Ribeyre, F., Boudou, A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16 (10):2096-2105.
16. Bayne, C. J., Zelikoff, J. T. 1996. Modulators of immune responses: the evolutionary trail. *Immunol Today*. 17 (2):55-57.
17. Bebianno, M. J., Serafim, M.A., Simes, D. 2000. Metallothioneins in the clam *Ruditapes decussatus*: an overview. *Analisis*. 28 (5):386-390.
18. Bellas, J., Beiras, R., Mariño-Balsa, J.C., Fernández, N. 2005a. Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: A comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology*. 14:337-353.
19. Bellas, J., Hilvarsson, A., Granmo, A. 2005b. Sublethal effects of a new antifouling candidate on lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Biofouling*. 21 (3-4):207-216.
20. Berny, P., Sadoul, N., Dol, S., Videman, B., Kayser, Y., Hafner, H.L.N. 2002. Impact of local agricultural and industrial practices on organic contamination of little egret (*Egretta garzetta*) eggs in the Rhone delta,

- Southern Frances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (3):520-526.
21. Betoulle, S., Duchiron, C., Deschaux, P. 2000. Lindane differently modulates intracellular calcium levels in two populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes. *Toxicology*. 145:203-215.
 22. Bliss, C. J. 1935. The calculation of dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22:307-330.
 23. Blockwell, S. J., Maund, S.J., Pascoe, D. 1999. Effects of the organochlorine insecticide lindane ($\text{g-C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$) on the population response of freshwater amphipod *Hyaella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18 (6):1264-1269.
 24. Bocquene, G., Roig, A., Fournier, D. 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters*. 407:261-266.
 25. Borga, K., Fisk, A. T., Hoekstra, P. E., Muir, D. C. 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (10):2367-2385.

26. Botello, A. V., Rueda-Quintana, L., Díaz-González, G., Toledo, A. 2000. Persistent Organochlorine Pesticides (POPS) in Coastal Lagoons of the Subtropical Mexican Pacific. 64:390-397.
27. Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomas-Guyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S. 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*. 78:149-156.
28. Bouilly, K., Leitao, A., McCombie, H., Lapegue, S. 2003. Impacto of atrazine on aneuploidy in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (1):219–223.
29. Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D. 2004a. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1679:29-36.
30. Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D. 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *GENES & DEVELOPMENT*. 329:147–157.
31. Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D. 2003. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress & Chaperones*. 8 (1):76-85.

32. Broeg, K., Westernhagen, H.V., Zander, S., Körting, W., Koehler, A. 2005. The "bioeffect assessment index" (BAI). A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*. 50:495-503.
33. Brown, S. B., Adams, B. A., Cyr, D. G., Eales, J. G. 2004. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environ Toxicol Chem*. 23 (7):1680-1701.
34. Brusca, R. C., Brusca, G. J. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates. 2da Ed. Sunderland Massachusset. 702-769 pp.
35. Buckler, D. R., Mayer, F.L., Ellersieck, M.R., Amha Asfaw, A. 2005. Acute toxicity value extrapolation with fish and aquatic invertebrates. 49 (4):546-558.
36. Burgos-Hernández, A., García-Sifuentes, C.O., Aldana-Madrid, M.L., Mesa-montenegro, M.M. 2005. Detection and quantification of insecticides in shrimp grown in a coastal farm in Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 74:335-341.
37. Cabassi, E. 2007. The immune system and exposure to xenobiotics in animals. *Vet Res Commun*. 31 Suppl 1:115-120.
38. Carrisoza, V. M. G. 2006. Estandarización de la técnica de electroforesis en gel de células individuales (SCGE) para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). Programa de Estudios de Posgrado., Maestría. CIBNOR. La Paz. 86.

39. Carvalho, F. P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*. 9:685-692.
40. Castillo, L. E., De la Cruz, E., Ruepert, C. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16 (1):41-51.
41. Cekan, S. Z. 2004. Methods to find out the expression of activated genes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2 (68)
42. Charlier, C., Plomteux, G. 2002. Environmental chemical pollution and toxic risk for humans: the particular role of organochlorine pesticides. *Ann Biol Clin*. 60 (1):37-46.
43. Cheek, A., Brouwer, T.H., Carroll, S., Manning, S., McLachlan, J.A., Brouwer, M. 2001. Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. *Environmental Health Perspectives*. 109 (7):681-690.
44. Chen, W., Zhang, L., Xu, L., Wang, X., Hong, L., Hong, H. 2002. Residue levels of HCHs, DDTs and PCBs in shellfish from coastal areas of east Xiamen Island and Minjiang Estuary, China. 45:385-390.
45. Cheung, V. V., Depledge, M.H., Jha, A.N. 2006. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Marine Environmental Research*. 62:301-305.
46. Chrysikou, L., Gemenetis, P., Kouras, A., Manoli, E., Terzi, E. y Samara, C. 2007. Distribution of persistent organic pollutants, polycyclic

aromatic hydrocarbons and trace elements in soil and vegetation following a large scale landfill fire in northern Greece. *Environ Int.*

47. Chu, F. L. E., Soudant, P., Hale, R.C. 2003. Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. *Aquatic Toxicology*. 65
48. Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Gomot-de Vaufleury, A., Ribera, d., Badot, P.M. 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: Effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (9):1951-1957.
49. Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives*. 101 (5):378-384.
50. Collins, A. R. 2004. The Comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26:249-261.
51. Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., Focardi.S. 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Marine Pollution Bulletin*. 46:203-212.

52. Coughlan, B. M., Hartl, M.G.J., O'Reilly, S.J., Sheehan, D., C. Morthersill, C., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., O'Brien, N.M. 2002. Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 44:1359-1365.
53. Cunningham, C., Hikima, J.I., Jenny, J.I., Chapman, R.W., Fang, G.C., Sasaki, C., Lundqvist, M.L., Wing, R.A., Cupit, P.M., Gross, P.S., Warr, G.W., Tomkins, J.P. 2006. New resources for marine genomics: Bacterial artificial chromosome libraries for the eastern and Pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*). *Marine Biotechnology*. 8:521-533.
54. Cuppen, J. G. M., Crum, S.J.H., van den Heuvel, H.H., Smidt, R.A., van den Brink, P.J. 2002. Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosm: I. Fate of chlorpyrifos and lindane and response of macroinvertebrates. *Ecotoxicology*. 11:165-180.
55. Dallinger, R., Chabicosvky, M., Lagg, B., Schipflinger, R., Weirich, H.G., Berger, B. 2004. isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (4):902-910.
56. Danzeisen, R., Tilmann, A., Bederke, U., Cozzolino, M., Crosio, C., Ferri, A., Frenzel, M., Butler Gralla, E., Huber, L., Ludolph, A., Nencini, M., Rotilio, G., Selverstone Valentine, J., Carri, M. T., 2006. Superoxide

- dismutase 1 modulates expression of transferrin receptor. *J Biol Inorg Chem.*11: 489–498
57. Das, S., Jana, B. B. 2003. oxygen uptake and filtration rate as animal health biomarker in *Lamellidens marginalis* (Lamarck). *Indian J. Exp. Biol.* 41 (1306-1310)
 58. David, E., Tanguy, A., Moraga, D. 2007. Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat Toxicol.* 84 (3):389-398.
 59. David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal.* s272:5635-5652.
 60. Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, C. 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:731-742.
 61. Depledge, M. H., Galloway, T.S. 2005. Healthy animals, healthy ecosystems. *Front Ecol Environ.* 3 (5):251-258.
 62. Dich, J., Zahm S.H., Hanberg, A., Adami, H.O. 1997. Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control.* 8:420-443.
 63. Donald, D. B., Hunter, F. G., Sverko, E., Hill, B. D., Syrgiannis, J. 2005. Mobilization of pesticides on an agricultural landscape flooded by a torrential storm. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 24 (1):2-10.

64. Donohoe, R. M., Wang-Buhler, J.L., Buhler, D.R., Curtis, L.R. 1999. Effects of 3,39,4,49,5,59-Hexachlorobiphenyl on cytochrome P4501A and estrogen-induced vitellogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18 (5):1046-1052.
65. Dorsey, W. C., Tchounwou, P.B. 2004. Pentachlorophenol induced cytotoxic, mitogenic, and endocrine-disrupting activities in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 1 (2):90-99.
66. Dowdy, S. F., Lai, K. M., Weissman, B. E., Matsui, Y., Hogan, B. L., Stanbridge, E. J. 1991. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic Acids Res*. 19 (20):5763-5769.
67. Duquesne, S., Liess, M., Bird, D.J. 2004. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Marine Environmental Research*. 58:245-250.
68. Eble, A. F., Scro, R. 1996. General Anatomy. En: Kennedy, V. S., Newell, R. I. E., Eble, A. F. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Maryland sea grant book. Maryland, USA. 19-73.
69. Ecobichon, D. J. 2001. Pesticide use in developing countries. *Toxicology*. 160:27-33.

70. Eisinger, D. P., Dick, F. A., Trumpower, B. L. 1997. Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Mol Cell Biol.* 17 (9):5136-5145.
71. Eisler, R. 1970. Latent effects of insecticide intoxication to marine molluscs. *Hydrobiologia.* 36 (3-4):345-352.
72. Ellman, G. L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Feather-Stone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7:88-95.
73. Fernández, B. A., Yarto, R. M., Castro, D. J. 2005. Las sustancias tóxicas persistentes. Instituto Nacional de Ecología. México. 260 pp.
74. Forbes, V. E., Palmqvist A., Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers on ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 25 (1):272-280.
75. Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J. C., Garnier-Laplace, J. 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Environ Toxicol Chem.* 23:1108-1114.
76. Francis, A. J., Spanggard, R. J., Ouchi, G. I. 1975. Degradation of lindane by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology.* 29 (4):567-568.
77. Fry, D. M. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 7:165-171.
78. Galindo-Reyes, J. G., Dalla Venezia, L., Lazcano-Alvarez, G., Rivas-Mendoza, H. 2000. Enzymatic and osmoregulative alterations in white

- shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere*. 40:233-237.
79. Galindo-Reyes, J. G., Fossato, V.U., Villagrana-Lizarraga, C., Dolci, F. 1999. Pesticides in water, sediments, and shrimp from a coastal lagoon off the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. 38 (9):837-841.
80. Gamble, S. C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R. 1995. Glutathion peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Marine Environmental Research*. 39:191-195.
81. Geffard, O., Budzinski, H., Augagneur, S., Seaman, M.N.L., His, E. 2000. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20 (7):1605-1611.
82. Geyer, H. J., Scheunert, I., Brüggemann, R., Langer, D., Korte, F., Kettrup, A., Mansour, M., Steinberg, C.E.W., Nyholm, N., Muir, D.C.G. 1997. Half-lives and bioconcentration of lindane (γ-HCH) in different fish species and relationship with their lipid content. *Chemosphere*. 35 (1-2):343-351.
83. Geyer, H. J., Steinberg, C. E., Scheunert, I., Brüggemann, R., Schutz, W., Kettrup, A., Rozman, K. 1993. A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-HCH,

- Lindane) and total lipid content of different fish species. *Toxicology*. 83 (1-3):169-179.
84. Gold-Bouchot, G., Silva-Herrera, T., Zapata-Perez, O. 1995. Organochlorine Pesticide Residue Concentrations in Biota and Sediments from Rio Palizada, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:554-561.
85. Goldman, L., Tran, N. 2002. Toxics and poverty: The impact of toxic substances on the poor in developing countries. World Bank. Washington, D.C. 57 pp.
86. Gosling, E. 2003. Bivalves Molluscs. Biology, ecology and culture. Blackwell Science. Oxford. 441 pp.
87. Gray, D. W., Morris, P.J. 1987. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islet of Langerhans. *Stain Technol.* 62:373-381.
88. Hamoutene, D., Payne, J.F., Rahimtula, A., Leec, K. 2002. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*. 74:451-464.
89. Hamza-Chaffai, A., Roméo, M., Gnassia-Barelli, M., El Abed, A. 1998. Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61:397-404.

90. Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 18 (1):45-51.
91. Hayashi, H., Alia, Mustardy, L., Deshniun, P., Ida, M., Murata, N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal*. 12 (1):133-142.
92. Heeren, G. A., Tyler, J., Mandeya, A. 2003. Agricultural chemical exposures and birth defects in the Eastern Cape Province, South Africa. A case – control study. *Environmental Health*. 2 (1):11-19.
93. Heinonen, J., Penttinen O. P., Holopainen, I. J., Kukkonen, J. V. 2003. Sublethal energetic response by *Pisidium amnicum* (Bivalvia) exposed to pentachlorophenol at two temperatures. *Environ Toxicol Chem*. 22:433-438.
94. Henriques, W., Jeffers, R. D, Lacher, T. E., Kendall, R. J. 1997. Agrochemical use on banana plantations in latin america: Perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16 (1):91-99.
95. His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L. 1999. The assessment of marine pollution. Bioassays with bivalves embryo and larvaes. *Adv Mar Biol*. 37:1-178.

96. His, E., Seaman, M.N.L. 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). International Council for the Exploration of the Sea. ICES-CM. Copenage, Dinamarca. pp.
97. Hodkinson, I. D., Jackson, J. K. 2005. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. *Environ Manage.* 35 (5):649-666.
98. Huang, D. J., Wang, S.Y., Chen, H.C. 2004. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere.* 57:1621-1627.
99. Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y. 2006. Application of Ecotoxicogenomics for Studying Endocrine Disruption in Vertebrates and Invertebrates. *environmental Health Perspectives.* s114 (1):101-105.
100. Ilback, N. G., Friman, G. 2007. Interactions among infections, nutrients and xenobiotics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 47 (5):499-519.
101. INE. 2004. El lindano en México. Instituto Nacional de Ecología. México. 67 pp.
102. Irwin, L. K., Gray, S., Obertdöster, E. 2001. Vitellogenin induction in painted turtle, *Crysemis picta*, as biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquatic Toxicology.* 55:49-60.

103. Jenny, M. J., Chapman, R.W., Mancina, A., Chen, Y.A., McKillen, D. J., Trent, H., Lang, P., Escoubas, J. M., Bachere, E., Boulo, V., Liu, Z. J., Gross, P. S., Cunningham, C., Cupit, P. M., Tanguy, A., Guo, X., Moraga, D., Boutet, I., Huvet, A., De Guise, S., Almeida, J. S., Warr, G. W. 2007. A cDNA Microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Marine Biotechnology*. 9 (5):577-591.
104. Kalantzi, O. I., Hewitt, R., Ford, K.J., Cooper, L., Alcock, R.E., Thomas, G.O., Morris, J.A., McMillan, T.J., Jones, K.C., Martin, F.L. 2004. Low dose induction of micronuclei by lindane. *Carcinogenesis*. 25 (4):613-622.
105. Kallenborn, R., Christensen, G., Evenset, A., Schlabach, M., Stohl, A. 2007. Atmospheric transport of persistent organic pollutants (POPs) to Bjornoya (Bear island). *J Environ Monit*. 9 (10):1082-1091.
106. Khessiba, A., Romeó M., Aïssa, P. 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*. 133:275-281.
107. Khush, G. S. 2002. The promise of biotechnology in addressing current nutritional problems in developing countries. *Food Nutr Bull*. 23 (4):354-357.
108. Koci, K., Marku, E., Nuro, A., Topi, D. 2006. Distribution of organochlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Mussels tissue from Albania coast. *Balwois*.

109. Kölher, H. R., Knödler, C., Zanger, M. 1999. Divergent Kinetics of hsp70 Induction in *oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, γ -HCH, PCP): Suitability and limits of a biomarker. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36:179-185.
110. Kunz, M., Ibrahim, S. M., 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer* 2:23
111. Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*. 3:193-208.
112. Le Blanc, G. A., Bain, L. J. 1997. Chronic Toxicity of Environmental Contaminants: Sentinels and Biomarkers. *Environmental Health Perspectives*. 105 (1):65-80.
113. Lewis, W. J., van Lenteren, J. C., Phatak, S. C., Tumlinson, J. H., 3rd. 1997. A total system approach to sustainable pest management. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (23):12243-12248.
114. Li, H., Zhang, S. 2002. *in vitro* cytotoxicity of organophosphorus insecticide methylparathion to FG 9307, the gill cell line of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Cell Biology and Toxicology*. 18:235-241.
115. Lichtenstein, P. E., Fuhremann, T. W., Schulz, K. R. 1971. Persistence and Vertical Distribution of DDT, Lindane, and Aldrin Residues, 10 and 15 Years after a Single Soil Application. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 19 (4):718-721.

116. Loch-Caruso, R. K., Criswell, K. A., Grindatti, C. M., Bran, K. A. 2003. Sustained inhibition of rat myometrial gap junctions and contractions by lindane. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (62)
117. Lock, K., De Schamphelaere, K. A., Janssen, R. C. 2002. The effect of lindane on terrestrial invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 42:217-221.
118. Lomax, J. 2005. Get ready to GO! A biologist's guide to the gene ontology. *Briefings in Bioinformatics*. 6 (3):298-304.
119. Loureiro, S., Sousa, J. P., Nogueira, A. J., A. M. Soares. 2002. Assimilation efficiency and toxicokinetics of 14-C lindane in the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus*: The role of isopods in degradation of persistent soil pollutants. *Ecotoxicology*. 11:481-490.
120. Maggioli, J., Hoover, A., Weng, L. 2006. Toxicogenomic analysis methods for predictive toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 53:31-37.
121. Mañosa, S. M., R. Guitart, R. 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environ Monit Assess*. 71 (2):187-205.
122. Martin, F. L., Pearce, T. G., Hewer, A., Phillips, D. H., Semple, K. T. 2005. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution*. 138:301-315.

123. Mattioli, F., Robbiano, L., Adamo, D., Federa, R., Martelli, A. y Brambilla, G. 1996. Genotoxic effects of alpha-hexachlorocyclohexane in primary cultures of rodent and human hepatocytes. *Mutagenesis*. 11 (1):79-83.
124. McDowell, J. 1996. The bioaccumulation and biological effects of lipophilic organic contaminants. En: Kennedy, V. S., Newell, R. I. E., Eble, A. F. *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland sea grant book. Maryland, USA. 539-557
125. McKillen, D. J., Chen, Y. A., Chen, C., Jenny, M. J., Trent III, H.F., Robalino, J., McLean Jr, D. C., Gross, P. S., Chapman, R. W., Warr, G. W., Almeida, J. S. 2005. Marine Genomics: A clearing-house for genomic and transcriptomic data of marine organisms. *MBC Genomics*. 6 (34)
126. McLusky, D. S. 1973. The effect of temperature on the oxygen consumption and filtration rate of *Chlamys (Aequipecten) opercularis* (L.) (Bivalvia). *Ophelia*. 10:145-154.
127. Miao, W., Yu, T., Orias, E., Wan, M., Fu, C. 2006. Identification of differentially expressed genes in *Tetrahymena thermophila* in response to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by suppression subtractive hybridization. *Environmental Microbiology*. 8 (6):1122-1129.
128. Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M. Leboulenger, F. 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*. 54:455-459.

129. Mohn, W. W., Tiedje, J. M. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological reviews*. 56 (3):482-507.
130. Monteclaro, F. S., Vogt, P. K. 1993. A Jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (14):6726-6730.
131. Moraga, D., Tanguy, A. 2000. Genetic indicators of herbicide stress in the pacific oyster *Crassostrea gigas* under experimental conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19 (3):706-711.
132. Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M. 2007. Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied Microbiologic Biotechnology*. 76:741-752.
133. O'Brien, D. J., Kaneene, J. B., Poppenga, R. H. 1993. The Use of Mammals As Sentinels for Human Exposure to Toxic Contaminants in the Environment. *Environmental Health Perspectives*. 99:351-368.
134. Oberdörster, E., McClellan-Green, P. 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Marine Environmental Research*. 54:715-718.
135. Oliver, L. M., Fisher, W. S., Winstead, J. T., Hemmer, B. L., Long, E. R. 2001. Relationships between tissue contaminants and defense-related characteristics of oysters (*Crassostrea virginica*) from five Florida bays. *Aquat Toxicol*. 55 (3-4):203-222.

136. ONU. 2005. World Population Prospect. The 2004 revision. Highlights. Population Division, Department of Economic and Social Affairs. N.Y. 90 pp.
137. Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Solé, M., Porte, C., Cajaraville, M. P. 2002. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquatic Toxicology*. 58:75-98.
138. Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H. Torti S. V., Torti F.M. 2001. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* 357: 241-247
139. Osuna-Flores, I., Riva, M. C. 2002. Organochlorine pesticide residue concentrations in shrimps, sediments, and surface water from bay of Ohuira, Toplobampo, Sinaloa, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68:532-539.
140. Otchere, F. A. 2005. Organochlorines (PCBs and pesticides) in the bivalves *Anadara (Senilis) senilis*, *Crassostrea tulipa* and *Perna perna* from the lagoons of Ghana. *Science of the Total Environment*. 348:102-114.
141. Ozmen, M., Sener, S., Mete, A., Kucukbay, H. 1999. In vitro and in vivo acetylcholinesterase- inhibiting effect of new classes of organophosphorus compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18 (2):241-246.

142. Padilla, S. 1995. Regulatory and research issues related to cholinesterase inhibition. *Toxicology*. 102 ((1-2)):215-220.
143. Páez-Osuna, F., Ruiz-Fernández, A. C., Botello, A. V., Ponce-Vélez, G., Osuna-López, J. I., Frías-Espericueta, M. G., López-López, G., Zazueta-Padilla, H. M. 2002. Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. *Marine Pollution Bulletin*. 44:1296-1313.
144. Pardo, V. T., Waliszewski, K. N., Landin, L. A., Bautista, R. G. 2003. Organochlorine pesticide residues in cow's milk from a tropical region of Mexico. *Food Addit Contam.* 20 (3):259-269.
145. Parmar, D., Yadav, S., Dayal, M., Johri, A., Dhawan, A., Seth, P. K. 2003. Effect of lindane on hepatic and brain cytochrome P450s and influence of P450 modulation in lindane induced neurotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 41:1077-1087.
146. Parries, G. S., Hokin-Neaverson, M. 1985. Inhibition of phosphatidylinositol synthase and other membrane-associated enzymes by stereoisomers of hexachlorocyclohexane. *Journal of Biological Chemistry*. 260 (5):2687-2693.
147. Pennie, W. D., Tugwood, J. D., Oliver, G. J., Kimber, I. 2000. The principles and practice of toxicogenomics: Applications and opportunities. *Toxicological Sciences*. 54:277-283.

148. Peters, C. E., Gassman, N. J., Firman, J. C., Richmonds, R. H., Power, E. A. 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16 (1):12-40.
149. Pfeifer, D. S., Schiedeka, D., Dippner, J. W. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 320:93-103.
150. Phillips, H. J., Terryberry, J.E. 1957. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Experimental Cell Research*. 13:341-347.
151. Phillips, T. M., Seech, A. G., Lee, H., Trevors, J.T. 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. 16:363-392.
152. Pool-Zobel, B. L., Guigas, C., Klein, R., Neudeker, C., Renner, H. W., Schmezer, P. 1993. Assessment of genotoxic effects by lindane. *Food and Chemical Toxicology*. 31:271-283.
153. POPRC. 2005. Risk profile: Lindane. Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC). Stockholm. 24 pp.
154. Printes, L. B., Callaghan, A. 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23 (5):1241-1247.
155. Puntarulo, S. 2005. Iron, oxidative stress and human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 26:299-312.

156. Rajendrana, R. B., Imagawa, T., Tao, H., and Ramesh, R. 2005. Distribution of PCBs, HCHs and DDTs, and their ecotoxicological implications in Bay of Bengal, India. *Environment International*. 31:503-512.
157. Rakocinski, C. F., Brown, S. S., Gaston, G.R., Heard, R. W., Walker, W. W., Summer, J. K. 1997. Macrobenthic responses to natural and contaminant-related gradients in Northern Gulf of Mexico estuaries. *Ecological Applications*. 7 (4):1278-1298.
158. Ramírez, J., Chávez, L., Santillán, J. L., Guzmán, S. 2003. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico*. 27:97-120.
159. Rana, K., Immink, A. 2001. Trends in global aquaculture production: 1984-1996. *Organizacion de la Naciones Unidas para Agricultura y Alimentacion*. Roma. - pp.
160. Rao, M. B. 1981. Effect of gamma-hexacloran and Sevin on the survival of the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Hydrobiologia*. 78:33-37.
161. Rigonato, J., Mantovani, S. M. Jordão, B. Q. 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*. 28 (3):464-468.
162. Rittschof, D., McClellan-Green, P. 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin*. 50:369-373.

163. Rivera, R. L. B. 2007. Determinación de plaguicidas organoclorados y sus efectos en aves terrestres asociadas a zonas de cultivo de Baja California Sur. Programa de Estudios de Posgrado., Doctorado. CIBNOR. La Paz, B.C.S. 316.
164. Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M. Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M. H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J. 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*. 79:65-77.
165. Rodríguez-Ortega, M. J., Alhama, J., Funes, v., Romero-ruiz, A., Rodríguez-Ariza, A., López-Barea, J. 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-spanish littoral. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (3):542-549.
166. Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *J. Chromatogr. B*. 722:225-254.
167. Romero-Ruiz, A., Amezcua, O., Rodríguez-Ortega, M. J., Muñoz, J. L., Alhama, J., Rodríguez-Ariza, A., Gómez-Ariza, J. L., López-Barea, J. 2003. Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after aznalcóllar spill. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (1):92-100.

168. Rosa, R., Rodriguez-Farre, E., Sanfeliu C. 1996. Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278:163-169s.
169. Russo, J., Madec, L. 2007. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell Tissue Res.* 328 (2):431-441.
170. Saleh, F. Y., Dickson, K.L., Rodgers, J. H. 1982. Fate of lindane in the aquatic environment: Rate constants of physical and chemical processes. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1:289-297.
171. Salem, H., Olajos, E.J. 1988. Review of pesticides: Chemistry, uses and toxicology. *Toxicology and Industrial Health.* 4 (3):291-321.
172. Sandhal, J. F., Jenkins, J. J. 2002. Pacific steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to chlorpyrifos: Benchmark concentration estimates for acetylcholinesterase inhibition. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 21 (11):2452-2458.
173. Sang, S., Petrovic, S., Cuddeford, V. 1999. Lindane a review of toxicity and environmental fate. *World Wild Fund.* Toronto. 65 pp.
174. Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N., Sarker, S. 2006. Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 15:333-340.
175. Sauviat, M. P., Colas, A., Pages, N. 2002. Does lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) increase the rapid delayed rectifier outward K⁺ current (I_{Kr}) in frog atrial myocytes? *BMC Pharmacology.* 2 (15)

176. Scandalios, J.C. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 38(7):995-1014.
177. Schlenk, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin.* 39 (1-12):48-53.
178. Siu, W. H., Mak, E., Cao, J., DeLuca-Aabbott, S. B., richarson, B. J., Lam, P. K. 2004. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 23 (5):1317-1325.
179. Smaal, A. C., Wagenvoort, A., Hemelraad, J., Akkerman, I. 1991. Response to stress of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to Dutch tidal waters. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 100:197-200.
180. Smolders, R., Bervoets, L., DeCoen, W., Blust, R. 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution.* 129:99-112.
181. Soengas, J. L., Strong, E.F., Aldegunde, M., Andrés, M.D. 1997. Effects of an acute exposure to lindane (g-Hexachlorocyclohexane) on brain and liver carbohydrate metabolism of rainbow trout. *Toxicology and Environmental Safety.* 38:99-107.
182. Solé, M., Porte, C., Al baigés, J. 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its

- relation with contaminant body burdens. *Aquatic Toxicology*. 30:271-283.
183. Soto, M., Cajaraville, M. P., Marigomez, I. 1996. Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography. *Tissue Cell*. 28 (5):557-568.
184. Straub, P. F., Higham, M. L., Tanguy, A., Landau, B. J., Phoel, W. C., Hales, L. S., Thwing, T. K. 2004. Suppression Subtractive Hybridization cDNA Libraries to Identify Differentially Expressed Genes from Contrasting Fish Habitats. *Marine Biotechnology*. 6:386-698.
185. Sumpter, J. P., Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*. 103 (7):173-178.
186. Tamamoto, H., Yakou, Y., Miyamoto, N., Saito, M., Higashitani, T., Tanaka, H. 2001. Using DNA recombinant yeast, evaluation of estrogen-like activity of river water in Japan. 2nd IWA World Water Congress.
187. Tanabe, S., Subramanian, A. 2003. Bioindicators suitable for monitoring POPs in developing countries. The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries.
188. Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra C., Pina B., Bachere, E, Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat C., Favrel, P., Huvet, A., Jarque S., Jollivet D., Klages, S.,

- Lapegue, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhartdt, R., Samain, J. F., Zouros, E., Canario, A. 2008. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene. In press*
189. Tanguy, A., Boutet, I., Bonhomme, F., Boudry, P., Moraga, D. 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers*. 7 (6):439-450.
190. Tanguy, A., Boutet, I., Boudry, P., Degremont, L., Laroche, J., Moraga, D. 2006. Molecular identification and expression of the phosphoglucomutase (PGM) gene from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene*. 382:20-27.
191. Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D. 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *Febs J*. 272 (2):390-403.
192. Tenenbaum, D. J. 1998. Northern overexposure. *Environ Health Perspect*. 106 (2):A64-69.
193. Thier, R., Brüning, T., Roos, P. H., Rihs, H. P., Golka, K., Kod, Y., Bolt, H. M. 2003. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: The role of selected CYP, NAT and GST

- genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 206:149- 171.
194. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
195. Torti, F. M., Torti, S. V. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 99 (10):3505-3516.
196. Trueman, E. R., Clarke, M. R. 1983. *The Mollusca: Form and Fuction*. Academic press. San Diego. 504 pp.
197. Udoidiong, O. M., Akpan, P. M. 1991. Toxicity of cadmium, lead and lindane to *Egeria radiata* Lamarck (Lamellibranchia Donacidae). *Rev. Hydrobiol Trop*. 24:111-117.
198. Ueno, D., Takahashi, S., Tanaka, H., Subramanian, A. N., Fillmann, G., Nakata, H., Lam, P. K., Zheng, J., Muchtar, M., Prudente, M., Chung, K., Tanabe, S. 2004. Global pollution monitoring of PCBs and organochlorine pesticides using skipjack Tuna as a bioindicator. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 45:378-389.
199. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64:178-189.

200. Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, E. 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *The Science of the Total Environment*. 312:79-88.
201. Vale, C., Fonfría, E., Bujons, J., Messeguer, A., Rodríguez- Farré, E., Suñol, C. 2003. The organochlorine pesticides gamma-Hexachlorocyclohexane (lindane), alfa-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA A and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule. *Neuroscience*. 117:397-403.
202. Vasseur, P., Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*. 28:711-717.
203. Verma, S. P., Rastogi, A., Lin, P.S. 1992. Hexachlorocyclohexane pesticides reduce survival and alter plasma membrane structure of Chinese hamster V79 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 298:587-593.
204. Vijgen, J. 2006. The legacy of lindane HCH isomer production. *International HCH and Pesticides Association*. Holte, Dinamarca. 22 pp.
205. Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., Valavanidis, A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull.* 54 (9):1361-1371.

206. Vrana, K. E., Freemany, W. M., Aschner, M. 2003. Use of microarray technologies in toxicology research. *Neuro Toxicology*. 24:321-332.
207. Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Benitez, A., Infanzon, R. M., Infanzon, R., Rivera, J. 1999. Organochlorine pesticide residues in human blood serum of inhabitants of Veracruz, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:397-402.
208. Waliszewski, S. M., Pardo-Sedas, V. T., Chantiri, J. N., Infanzon, R. M., Rivera, J. 1996. Organochlorine Pesticide Residues in Human Breast Milk from Tropical Areas in Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:22-28.
209. WHO. 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004. World Health Organization. Geneva. 56 pp.
210. Zar, H. J. 1999. *Biostatistical Analysis*. Upper Sadle River. pp.
211. Zelikoff, J. T., Raymond, A., Carlson, E., Li, Y., Beaman, J. R., Anderson, M. 2000. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicol Lett.* 112-113:325-331.
212. Zhang, H. Y., Gao, R. T., Huang, Y. F., Jia, X. H., Jiang, S. R. 2007. Spatial variability of organochlorine pesticides (DDTs and HCHs) in surface soils from the alluvial region of Beijing, China. *J Environ Sci (China)*. 19 (2):194-199.

213. Zhang, Y., Huang, J., Meng, Q., Jiang, T., Xie, L., Wang, Z., Zhang, R.
2004. Molecular cloning and expression of a Pearl oyster (*Pinctada fucata*) homologue of mammalian putative tumor suppressor QM. *Marine Biotechnology*. 6:8-16.