



EVALUACIÓN PRELIMINAR DE BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS EN CARACOLES DE AGUA DULCE (*Pachychilus* sp.) DEL HUMEDAL “CIÉNAGA DE TAMASOPO”, MÉXICO

Preliminary evaluation of enzymatic biomarkers in freshwater snails (*Pachychilus* sp.) of wetland “Ciénaga de Tamasopo”, México

Omar CRUZ-SANTIAGO¹, César Arturo ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ², José de Jesús MEJÍA-SAAVEDRA², Guillermo ESPINOSA-REYES², Ma. Catalina ALFARO-DE LA TORRE³, Donaji Josefina GONZÁLEZ-MILLE^{4*}

¹Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava 201, 2° Piso, Zona Universitaria, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

²Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, CIACyT-Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª Sección, San Luis Potosí, S.L.P., México

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Manuel Nava No.6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., México.

⁴Cátedras Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª Sección, San Luis Potosí, S.L.P., México.

*For correspondence: dgonzalezm@conacyt.mx

Received: 24th September 2018, Returned for revision: 07th February 2019, Accepted: 25th March 2019.

Associate Editor: Sergi Sabater.

Citation/Citar este artículo como: Cruz-Santiago O, Ilizaliturri-Hernández CA, Mejía-Saavedra JJ, Espinosa-Reyes G, Alfaro-de la Torre MC, González-Mille DJ. Evaluación preliminar de biomarcadores enzimáticos en caracoles de agua dulce (*Pachychilus* sp.) del humedal “Ciénaga de Tamasopo”, México. Acta biol. Colomb. 2020;25(2):255-264. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n2.75095>

RESUMEN

Se determinó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), el rango de conjugación de glutatión s-transferasa (GST) y la presencia de malondialdehído (MDA) como biomarcadores de exposición a plaguicidas, durante dos temporadas (secas y post-lluvias), en tejidos de macroinvertebrados acuáticos (caracoles de agua dulce -*Pachychilus* sp.-) residentes del humedal Ciénaga de Tamasopo (San Luis Potosí, México). También se realizó un monitoreo de los parámetros fisicoquímicos en agua del humedal con una sonda multiparamétrica. La actividad de los biomarcadores se determinó en la fracción S12 (fracción post-mitocondrial) de tejidos de *Pachychilus* sp. mediante métodos de espectrofotometría UV-Visible en un lector de microplacas. Se encontró una menor actividad de AChE (39,0 %) y un mayor rango de conjugación de GST (28,5 %), seguido de una menor presencia (25,0 %) de peroxidación lipídica (MDA) en la temporada seca en el tejido de los caracoles. Además, se encontraron asociaciones significativas entre el rango de conjugación de GST con el resto los biomarcadores en ambas temporadas, lo cual es el resultado de procesos de desintoxicación en los caracoles. La actividad de los biomarcadores podría estar modulada por la salinidad, regulando así la producción de enzimas antioxidantes y la toxicidad de los plaguicidas usados en las áreas agrícolas cercanas a este humedal. Los caracoles del género *Pachychilus* sp. pueden utilizarse como bioindicadores del estado de la salud de los humedales, lo cual puede derivar en el diseño de medidas de gestión para la conservación y manejo sustentable de estos ecosistemas.

Palabras clave: Gasterópodos, humedales, marcadores biológicos, plaguicidas, salinidad.

ABSTRACT

The activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), the rate of conjugation of glutathione s-transferase (GST) and the presence of malondialdehyde (MDA), as biomarkers of exposure to pesticides, were determined during two seasons (dry and post-rains) in tissue of aquatic macroinvertebrates (freshwater snails -*Pachychilus* sp.-) residents of the “Ciénaga de Tamasopo” wetland (San Luis Potosí, Mexico). This was accompanied by a monitoring of the physicochemical parameters in the water of the wetland with a

multiparameter probe. The activity of the biomarkers was determined in the S12 fraction (post-mitochondrial fraction) of tissues of *Pachychilus* sp. employing UV-Visible spectrophotometry methods in a microplate reader. We found a lower activity of AChE (39.0 %), a higher ratio of the conjugation of GST (28.5 %), followed by a lower presence (25.0 %) of lipid peroxidation (MDA) in the dry season in the tissue of the snails. Besides, significant associations were found between the ratio of the conjugation of the GST with the rest of the biomarkers in both seasons, which is the result of detoxification processes in the snails. The activity of the biomarkers could be modulated by salinity, thus regulating the production of antioxidant enzymes and the toxicity of the pesticides used in agricultural areas near this wetland. The snails of the genus *Pachychilus* sp. can be used as bioindicators of the health status of wetlands, which can lead to the design of management measures for the conservation and sustainable management of these ecosystems.

Keywords: biological markers, gastropods, pesticides, salinity, wetlands.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, México cuenta con más de 100 sitios reconocidos como humedales de importancia internacional por la Convención de Ramsar. La Ciénaga de Tamasopo o Ciénaga de Tampasquín en San Luis Potosí es un humedal léntico con clima neotropical. Sus características ecológicas le permiten albergar especies de flora y fauna endémicas desde plantas hiperacumuladoras hasta una variedad de anfibios, reptiles, aves e invertebrados (Torres, 2008); el humedal fue declarado por la Convención Ramsar en 2008 como de importancia internacional. En los últimos años, los suelos de este ecosistema se han visto modificados en tierras de uso agrícola, principalmente, para siembra de caña de azúcar (Torres, 2008; Tapia-Goné *et al.*, 2010; Pérez-Castillo *et al.*, 2017. Fig. 1a), donde comúnmente se utilizan herbicidas e insecticidas como glifosato, atrazina, paraquat o clorpirifos, metanoarsonato monosódico, entre otros (Díaz y Labrada, 2016). De acuerdo con información proporcionada (comunicación personal) por la Unión Local de Productores de Caña de Azúcar (CNC) de Ciudad Valles y de Tamasopo, la aplicación de plaguicidas en cultivos de caña de azúcar en la Huasteca Potosina (Fig. 1b) se da a lo largo de todo el año, existiendo dos temporadas de aplicación: una alta, que corresponde a los meses de junio a septiembre y una baja, que corresponde a los meses de noviembre a febrero.

Una de las prácticas que más concierne con esta problemática es la utilización de biocidas para el control de plagas y malezas indeseables en los cultivos, debido a que, ya sea directa o indirectamente, pueden afectar a los organismos no objetivo de los ecosistemas aledaños (Albert y Benítez, 2005; Albert y Loera-Gallardo, 2005; Sánchez-Bayo *et al.*, 2011. Fig. 1c). En este ámbito, en algunas ocasiones es difícil evaluar las concentraciones de plaguicidas debido a que algunos pueden degradarse rápidamente, por lo que sus residuos pueden estar bajo el límite de detección de los aparatos empleados para cuantificarlos (Chitmanat *et al.*, 2008). Ante esto, la evaluación de alteraciones enzimáticas, proteicas, de energía u hormonales (biomarcadores) se ha convertido en una herramienta útil para evidenciar y monitorear la exposición y efectos subletales de plaguicidas en organismos, debido a que funcionan como una señal de alerta temprana para prevenir consecuencias a futuro o en

niveles mayores de organización biológica (Depledge, 1994; Amiard-Triquet *et al.*, 2013).

En algunos estudios, en escenarios reales y de laboratorio, se han utilizado biomarcadores expuestos a plaguicidas; este es el caso de la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE), el aumento de glutatión s-transferasa (GST) y la presencia de malondialdehído (MDA) en organismos como los macroinvertebrados (ej. gasterópodos) (Singh *et al.*, 1993; Chitmanat *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2010; Rivadeneira *et al.*, 2013; Basopo y Naik, 2015). La AChE es una enzima responsable de la señal de sinapsis colinérgicas mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. El resultado de una exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos conlleva por lo general a una inhibición de esta enzima y a efectos que pueden resultar adversos para los organismos (Thompson, 1999). Por su parte, la GST es una enzima perteneciente a los procesos de biotransformación fase II para eliminar xenobióticos de un organismo; se encarga de combinar glutatión reducido con compuestos electrófilos (xenobióticos conjugados) formando tioéteres que pueden ser más fácil de eliminar del organismo. El aumento de esta enzima en tejido o plasma de un organismo es comúnmente indicativo de una exposición a compuestos hidrocarburos, plaguicidas y bifenilos policlorados (Slatinská *et al.*, 2008). Por otra parte, el MDA es un aldehído producto final e indicativo de la peroxidación lipídica, esta última considerada como uno de los mecanismos que ocasionan daño oxidativo a membranas celulares y procesos de toxicidad que conducen a la muerte celular (Repetto *et al.*, 2012). Por último, se ha demostrado que además de la exposición a plaguicidas, existen diversos factores extrínsecos (ej. parámetros fisicoquímicos del agua, temporalidad, etc.) que influyen en la variación de estos biomarcadores en organismos como los moluscos (Amiard-Triquet y Brigitte Berthet, 2014).

Los moluscos tienen un papel muy importante en los ecosistemas de humedal; son componentes clave en la cadena trófica, debido a que vinculan la materia orgánica y los recursos nutritivos con los niveles más altos de la cadena; además, se consideran como bioindicadores de la salud de este tipo de ecosistemas (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Li *et al.*, 2010). Los gasterópodos son un grupo de moluscos que se han utilizado como bioindicadores para



Figura 1. Cultivos de caña de azúcar próximos al humedal (a), aplicación de plaguicidas en los cultivos (b), disposición de recipiente de plaguicidas (-glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético-) próximos a los cuerpos de agua (c), individuos de caracoles de agua dulce (d).

evaluar la exposición a metales pesados, plaguicidas y bifenilos policlorados (Chitmanat *et al.*, 2008; Domingues *et al.*, 2009; Radwan *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011; Grara *et al.*, 2012; Cossi *et al.*, 2015). En México, se destaca la familia Pachychilidae de caracoles de agua dulce (*Pachychilus* sp.), los cuales se han considerado bioindicadores de la contaminación de ecosistemas acuáticos (Naranjo-García y Meza Meneses, 2011. Fig. 1d). La distribución geográfica nativa del género *Pachychilus* se restringe a países como Guatemala, Brasil, Nicaragua, Belice, Cuba y México (Pérez y López de la Fuente, 1993; Vázquez-Perera y Perera-Valderrama, 2010; Gómez-Berning *et al.*, 2012).

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad de biomarcadores de exposición a plaguicidas (AChE, GST y MDA) en dos temporadas (secas y post-lluvias) en tejido de gasterópodos (caracol de agua dulce -*Pachychilus* sp.-) residentes de sitios impactados por la agricultura en la Ciénaga de Tamasopo (S.L.P., México).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y colecta de organismos

La Ciénaga de Tamasopo se ubica en el estado de San Luis Potosí; México (Fig. 2) en las coordenadas 99°19'14,00" E, 99°16'57,00" W, 21°52'03,00" N y 21°45'41,00" S. El muestreo se llevó a cabo en dos temporadas: marzo (secas) y noviembre (post-lluvias) del 2016. Se eligieron tres estaciones de muestreo a lo largo del humedal de acuerdo con estudios previos en la zona (Pérez-Castillo *et al.*, 2017). Cabe resaltar que estas estaciones fueron utilizadas en cada temporada de muestreo. La primera estación de muestreo (Mirador -MIR-) se localizó en las coordenadas 21°49'0,47" N y 99°18'15,58" W, la segunda estación (Capuchinas -CAP-) se ubicó en las coordenadas 21°46'15,14" N y 99°17'46,03" W, y la tercera estación (Ejido Veinte -VEI-) tuvo las coordenadas 21°45'15,14" N y 99°16'48,77" W. La estación MIR se consideró como la de menor influencia

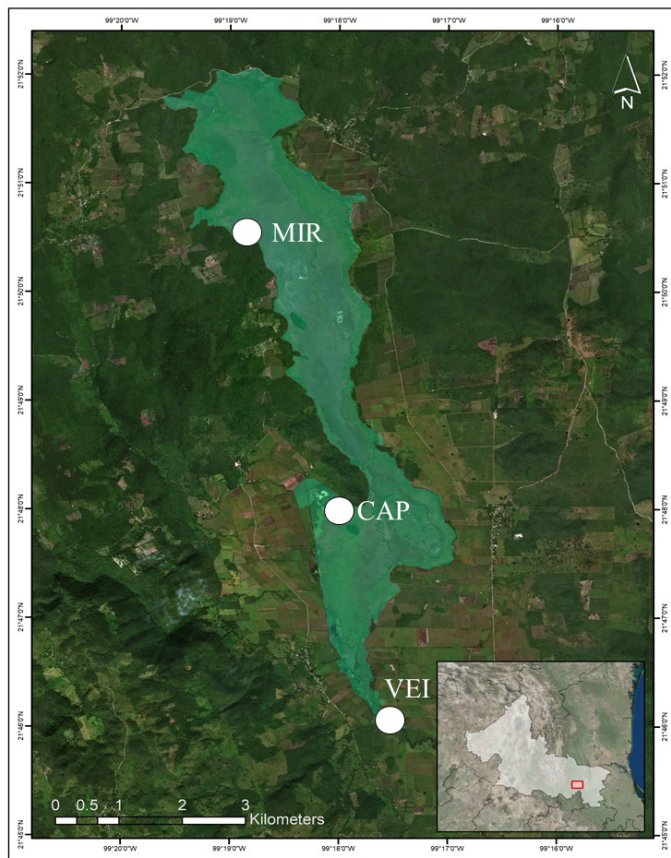


Figura 2. Estaciones de muestreo (círculo blanco) en la Ciénega de Tamasopo (S.L.P., México).

agrícola en comparación con las estaciones CAP y VEI, las cuales tuvieron mayor influencia de cultivos aledaños de caña de azúcar.

Para la colecta de los caracoles de agua dulce, se realizaron trayectos lineales de 200 m recolectando especímenes de *Pachychilus* sp.; posteriormente se seleccionaron de forma aleatoria diez organismos por estación de muestreo, dando un total de 30 organismos por temporada. Se seleccionaron organismos adultos con una talla de $32,6 \pm 2,14$ mm (de 27,9 a 37,4 mm) y un peso de $1,67 \pm 0,58$ g (de 0,6 a 2,8 g), así como de cinco a seis vueltas de la concha y ápices desgastados. Los organismos no se seleccionaron por sexo debido a que existe poca información sobre las características externas dimórficas para la especie (Naranjo-García y Meza-Meneses, 2011). Después de su colecta, los caracoles se sacrificaron y se les extrajo el tejido total de la concha. Debido al pequeño tamaño de los ejemplares, se optó por utilizar todo el tejido del organismo. Los tejidos se conservaron en nitrógeno líquido (-186 °C) para su transporte final al laboratorio. La colecta se realizó bajo el permiso FAUT-0321 otorgado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). La identificación taxonómica se realizó a nivel de género de acuerdo con información documental (Burch y Cruz-

Reyes, 1987; Wong-Argüelles, 2005; Naranjo-García y Meza-Meneses, 2011). La identificación a nivel de especie no se pudo realizar debido a que los caracoles retienen características morfológicas primitivas (Healy *et al.*, 1990); además, hay un gran número de endemismos en la zona que aún no están descritos.

Adicionalmente, en cada sitio de colecta se determinaron la temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica del agua con una sonda multiparamétrica (HANNA® instruments, HI 9828). Las mediciones se realizaron entre 1 y 1,5 m de profundidad en los trayectos de colecta de organismos, con lapsos de medición no mayor de una hora entre estaciones de muestreo.

Determinación de biomarcadores

En el laboratorio, la homogenización de los tejidos totales de caracol se realizó con buffer tris-acetato 10 mM pH 7,4, que contenía aprotinina (como inhibidor de proteasas), 140 mM de NaCl y 1 mM EDTA, a 1000 rpm a 4 °C con un homogenizador Polytron (OMNI International GLH), en una proporción 1:4 (tejido:buffer). Posteriormente, se obtuvo la fracción s12 (sobrenadante) de los homogenizados por centrifugación a $12\ 000\ g \times 20\ min$ a 4 °C.

La determinación de acetilcolinesterasa se basó en el método de Ellman *et al.* (1961) modificada por Gagné (2014) para microplaca de 96 pozos, donde 50 µL de sobrenadante (s12, previamente diluido) se mezclaron con 100 µL de acetiltiocolina (1 mM) y 100 µL de reactivo de Ellman (1 mM) en una microplaca a 30 °C, y se midió la cinética por 10 min a 412 nM en un lector de microplacas UV-Visible (BioTek® Sinergy H1). Para el blanco analítico se utilizó buffer tris-acetato. Lo mismo se realizó con un estándar de tiol con una concentración de 25 mM en un volumen de 250 mL. Para el cálculo de la concentración de AChE se utilizó la siguiente fórmula:

$$AChE(nM \times min \times mL) = \frac{\Delta Abs \times \frac{1}{10min} \times conc. \text{ estándar}}{(A_{412} \text{ estándar} - A_{412} \text{ blanco analítico})} \times FD \quad (1)$$

Donde ΔAbs = cambio de la absorbancia (10 min - 0 min), conc. estándar = 25 nM/mL de tiol, FD = factor de dilución (5).

Para la cuantificación de la GST se utilizó el método propuesto por Habig *et al.* (1974) modificado por Gagné (2014) para microplaca de 96 pozos; se mezclaron 50 µL de sobrenadante (s12, previamente diluido) con 100 µL de glutatión reducido (GSH, 1 mM) y 100 µL de sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB, 1 mM) en una microplaca y se midió la cinética por 10 min a 340 nM en un lector de microplacas UV-Visible (BioTek® Sinergy H1). Como blanco analítico se utilizó buffer fosfato. Para el cálculo del rango de conjugación de GST se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{GST}(\text{abs} \times \text{min} \times \text{mL}) = \Delta \text{Abs} \times \text{FD} \times \frac{1}{10} \text{min} \times \frac{1}{\text{mL}} \text{s12} \quad (2)$$

Donde ΔAbs = cambio de la absorbancia (10 min - 0 min), FD = factor de dilución (5).

La determinación y el cálculo de malondialdehído en el sobrenadante s12 de caracoles se realizó siguiendo las instrucciones del kit comercial "NWLSS™ Malondialdehyde Assay Single Point" (Cat. No. NWK-MDA01, NWLSS, EUA) para espectrofotometría UV-Visible. El sobrenadante s12 se mezcló con soluciones de ácido tiobarbitúrico (TBA), hidroxitolueno butilado (BHT) y ácido fosfórico, y se incubó a 60 ° C para formar el aducto MDA-TBA₂ que absorbe fuertemente a 532 nm. La concentración de MDA para cada muestra se obtuvo a partir de la interpolación de la absorbancia en una curva de calibración hecha con un estándar de tetrametoxipropano (1-4 mM) propia del kit comercial.

Las concentraciones de los biomarcadores se determinaron por triplicado y se normalizaron por la cantidad de tejido húmedo utilizado (g de tejido/mL de buffer de homogenización). Esto último se realizó dividiendo la actividad de las enzimas o la presencia de MDA por el tejido fresco utilizado para la determinación conforme a lo descrito por Gagné (2014).

Todos los reactivos fueron de grado bioquímico y adquiridos de las casas comerciales SIGMA y Northwest Life Science Specialities™.

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos. Dado que los datos no siguieron una distribución normal, se realizaron pruebas no-paramétricas. Para las comparaciones entre los biomarcadores por temporadas (seca y post-lluvias) se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney (U-MW), mientras que las comparaciones entre estaciones de muestreo por temporada se hicieron mediante un análisis de Kruskal-Wallis (KW-H). Además, se hicieron asociaciones entre los biomarcadores por temporada, las cuales se evaluaron con una correlación de Spearman una vez que los datos fueron transformados

logarítmicamente. La significancia estadística se evaluó en 1 % y 5 % con el software Prisma GraphPad 6.0. Los datos se reportaron como la mediana y el rango intercuartil, y se complementaron con los mínimos y máximos.

RESULTADOS

Los parámetros fisicoquímicos determinados en agua de la Ciénaga de Tamasopo fueron similares para ambas temporadas, a excepción de la conductividad eléctrica del agua, que se encontró mayor (51 %) en la temporada de secas con respecto a la temporada de lluvias (Tabla 1).

En cuanto a los biomarcadores no se encontraron diferencias entre las estaciones de muestreo a lo largo del humedal, pero sí entre temporadas. Al respecto, la actividad de AChE en el tejido de los caracoles varió de 23,6 a 210,5 nM x min⁻¹ x g de tejido; en temporada de secas fue mayor (39,0 %) con respecto a la que se obtuvo en post-lluvias (U-MW_{30,30} = 252, p < 0,05, Fig. 3a). A su vez, la actividad de GST varió de 74,1 a 303,5 abs x min⁻¹ x g de tejido, siendo un 28,5 % mayor en la temporada de secas con respecto a la temporada de post-lluvias (U-MW_{30,30} = 113, p < 0,001, Fig. 3b). Los valores de MDA fueron de 3,2 a 41,6 mM x g de tejido; se observó una mayor presencia (25,0 %) de este biomarcador en la temporada de post-lluvias (U-MW_{30,30} = 252, p < 0,05, Fig. 3c).

Por último, se encontraron asociaciones entre biomarcadores en ambas temporadas (Tabla 2). En la temporada de secas se observó una correlación estadísticamente significativa (r = 0,42, p < 0,05, n = 30) entre la actividad de AChE y la de GST (Fig. 4a). En la temporada de post-lluvias se obtuvo una correlación estadísticamente significativa (r = 0,60, p < 0,001, n = 30) entre la concentración de MDA y la actividad de GST (Fig. 4b).

DISCUSIÓN

Los caracoles de agua dulce (*Pachychilus* sp.) de la Ciénaga de Tamasopo presentaron diferencias entre temporadas en los biomarcadores evaluados, lo cual podría deberse a diferentes factores. El primero de estos puede estar relacionado con los parámetros fisicoquímicos en el agua

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos medidos por temporada en la Ciénaga de Tamasopo, S.L.P., México.

Parámetros	Secas (n = 3)	Post-lluvias (n = 3)
Temperatura (°C)	21,57 ± 0,90	21,66 ± 0,33
Oxígeno disuelto (ppm)	7,02 ± 0,37	7,38 ± 0,30
pH	7,79 ± 0,03	7,62 ± 0,07
Conductividad eléctrica (mS/cm)	1261,00 ± 53,69	834,63 ± 33,15

media ± error estándar

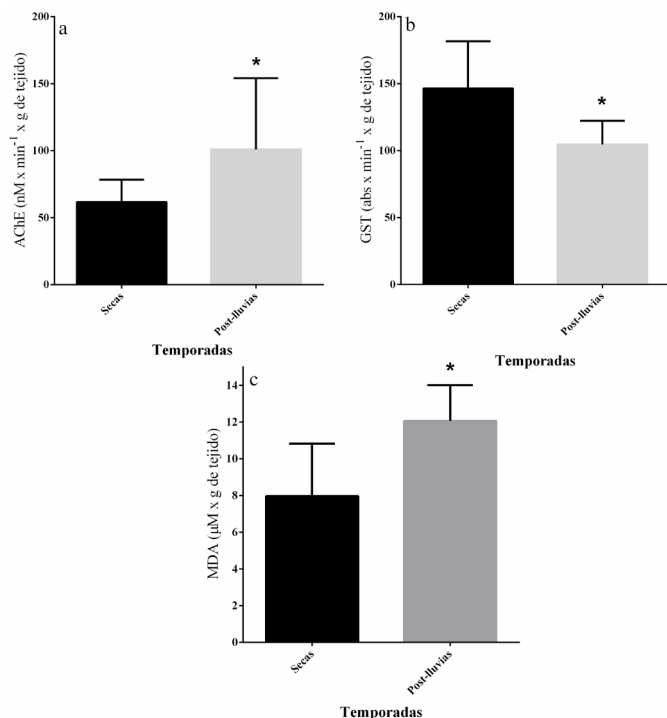


Figura 3. Actividad de AChE (a) y GST (b), y presencia de MDA (c) en tejido de caracoles de agua dulce (*Pachyichilus* sp.) de la Ciénega de Tamasopo por temporadas, prueba de U-Mann-Whitney, * $p < 0,05$. Se presentan la mediana y rango intercuartil. Secas ($n = 30$) y Post-lluvias ($n = 30$).

y el segundo con una exposición a plaguicidas utilizados en los cultivos alrededor del humedal. En cuanto al primer factor, considerando los criterios ecológicos de calidad de agua (CE-CCA-001/89, SEDUE, 1989) para la prevención de la contaminación del agua y la protección de la flora y la fauna acuática de los cuerpos de agua dulce en México, los parámetros fisicoquímicos del agua se encontraron dentro de los valores establecidos como normales; además, la mayoría de estos registros fueron similares en ambas temporadas de muestreo. Los valores de los parámetros en el agua son muy similares a los obtenidos por Pérez-Castillo (2018) en este mismo sitio de estudio, así como, en los de otros humedales intercontinentales en el mundo (Gerla, 2013; Barman *et al.*, 2015). Sobre los efectos de

otros parámetros como el oxígeno disuelto y el pH sobre los biomarcadores, la información es muy limitada y únicamente se ha relacionado en grupos como bivalvos y crustáceos (Amiard-Triquet y Berthet, 2014).

Es importante resaltar que la conductividad eléctrica fue mayor en la temporada seca; este parámetro está relacionado directamente con la salinidad, debido a que una cantidad mayor de iones disueltos en el agua aumenta su capacidad de conducir electricidad. Se ha demostrado que los cambios de temperatura y salinidad pueden influir en la actividad de biomarcadores como AChE, GST y de estrés oxidativo, lo cual se ha documentado mayormente en moluscos bivalvos (Pfeifer *et al.*, 2005; Fossi-Tankoua *et al.*, 2011; Gélinas *et al.*, 2013). De manera general, se ha registrado un decremento de la actividad de AChE y un aumento en la actividad de GST en bivalvos, cuando la salinidad aumenta (Damiens *et al.*, 2004; Pfeifer *et al.*, 2005; Fossi-Tankoua *et al.*, 2011), siendo este patrón similar al obtenido en la presente investigación; otro tanto puede decirse de la asociación encontrada entre estos dos biomarcadores. Por lo anterior, es posible que las alteraciones de los biomarcadores encontrada entre temporadas en *Pachyichilus* sp. de la Ciénega de Tamasopo puedan también ser atribuibles a los cambios de salinidad en el agua del humedal. La disminución de AChE podría estar directamente relacionada con el cambio en la concentración de iones inorgánicos (extra e intracelulares) que ocurre durante la adaptación a las variaciones osmóticas en los organismos osmoconformadores y que afectan con la capacidad de hidrólisis del sustrato (Tomlinson *et al.*, 1981; Pfeifer *et al.*, 2005). Adicionalmente, el incremento de GST podría estar mediado por condiciones moderadas de salinidad y podría tener un efecto protector en el organismo ante el estrés oxidativo al mejorar las condiciones fisiológicas de producción enzimática (Zanette *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha relacionado un incremento en la solubilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en fusión de la salinidad del agua (Zanette *et al.*, 2011).

El segundo factor al que se le puede atribuir las diferencias en los biomarcadores entre temporadas, es la exposición a plaguicidas. Estos pueden ocasionar respuestas en los organismos a los cuales no van dirigidos (Reylea y Hoverman, 2008; Sánchez-Bayo *et al.*, 2011). El hecho de

Tabla 2. Asociaciones entre los biomarcadores por temporada.

Temporada	Asociaciones	r	Valor p	p
Secas (n = 30)	AChE vs GST	0,42	0,0195	$p < 0,05$
	GST vs MDA	-0,01	0,9395	$p > 0,05$
	MDA vs AChE	0,70	0,6869	$p > 0,05$
Post-lluvias (n = 30)	AChE vs GST	0,32	0,0819	$p > 0,05$
	GST vs MDA	0,60	0,0004	$p < 0,001$
	MDA vs AChE	0,00	0,9600	$p > 0,05$

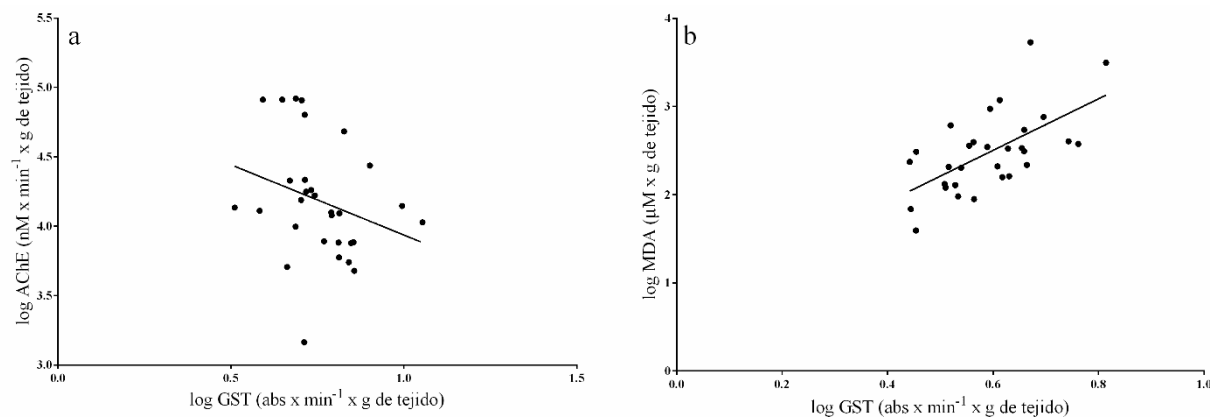


Figura 4. Asociaciones encontradas entre los biomarcadores en diferentes temporadas en tejido de *Pachytilus* sp. a= GST vs AChE secas (n = 30), b= MDA vs GST post-lluvias (n = 30). Prueba de Spearman, $p < 0,05$

encontrar una menor actividad de AChE y un mayor rango de conjugación de GST en temporada seca, inverso a lo ocurrido en la temporada de post-lluvias, puede atribuirse al patrón de aplicación de plaguicidas en los cultivos aledaños al humedal y al proceso de concentración de contaminantes en temporada seca. La GST es una de las enzimas que conforman la segunda fase de biotransformación de xenobióticos, conjugando estos compuestos para que puedan ser eliminados del organismo (Parkinson *et al.*, 2013). El aumento del rango de conjugación de GST y la menor actividad de AChE en la temporada seca parecen asociarse a la exposición a los plaguicidas aplicados en el humedal; adicionalmente, se encontró una asociación entre las dos enzimas lo que evidencia la compensación de los organismos ante este estrés. Al respecto, diferentes estudios en organismos invertebrados han observado el mismo patrón encontrado en este estudio (Moreira y Guilhermino, 2005; Domingues *et al.*, 2009; Vidal-Liñán *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la GST también puede cumplir un papel como antioxidante y como mecanismo de defensa ante la peroxidación de lípidos. En general, la GST puede reducir los radicales peróxidos formados de ácidos grasos insaturados, así como los productos finales (4-HNE, MDA), e interrumpir la cadena que se origina por la peroxidación lipídica (Yang *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2004). En nuestro caso, la dinámica hídrica en temporada de post-lluvias (ej. resuspensión de sedimentos) podría incrementar la cantidad de contaminantes con potencial de generación de radicales libres en el sistema acuático (compuestos orgánicos persistentes, metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.), lo que incrementaría el daño en los organismos.

Algunos estudios en bivalvos han demostrado una mayor peroxidación lipídica y una disminución en los antioxidantes o viceversa, como mecanismos de compensación ante un estrés oxidativo, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en este estudio, sobre todo con la correlación

encontrada entre MDA y GST (Fig. 4b). Muy pocos estudios se han hecho con la peroxidación de lípidos como biomarcador en caracoles de agua dulce. Klobucar *et al.* (1997) demostraron que el pentaclorofenol (compuesto organoclorado, utilizado como plaguicida) inducía la peroxidación lipídica en tejido de caracoles de agua dulce (*Planorbarius corneus* L.). En otros moluscos como los bivalvos se ha demostrado la inducción de peroxidación lipídica cuando se encuentran expuestos a otros xenobióticos (Singh *et al.*, 1993; Géret *et al.*, 2001; Ali, 2014).

Los factores fisicoquímicos y la exposición a plaguicidas podrían estar condicionando los cambios de los biomarcadores por temporada en los caracoles. En este sentido, se ha demostrado que ambos factores podrían tener una interacción importante (Pfeifer *et al.*, 2005; Zanette *et al.*, 2011). Diversos autores consideran que, al evaluar biomarcadores enzimáticos en campo, se deben tomar en cuenta los parámetros fisicoquímicos e incluso considerar otros factores como la disponibilidad del alimento y la masa y tamaño corporales, entre otros, debido a que estos pueden modificar la actividad de biomarcadores como la AChE y de otros asociados al estrés oxidativo en invertebrados (Sheehany Power, 1999; Filho *et al.*, 2001; Damiens *et al.*, 2004; Leiniö y Lehtonen, 2005; Amiard-Triquet y Berthet, 2014).

Al igual que la Ciénaga de Tamasopo, existen diversos humedales intercontinentales de importancia ecológica en México y San Luis Potosí que sufren de grandes presiones ambientales. El género *Pachytilus* se encuentra bien distribuido en México y Centroamérica, por lo que podría ser útil para la generación de un programa monitoreo a largo plazo para evaluar el estado de salud de los humedales. Es importante considerar complementar las mediciones de los diversos efectos biológicos con la exposición a plaguicidas (matrices ambientales y biológicas) para comprender mejor la variabilidad espacio-temporal de estos biomarcadores (Sharma y Rawat, 2009).

CONCLUSIONES

La respuesta de AChE, GST y MDA en *Pachychilus* sp. en diferentes temporadas en la Ciénaga de Tamasopo está relacionado con factores fisicoquímicos del agua y con la exposición a plaguicidas que se usan en los cultivos aledaños a este humedal; a su vez, estos factores modulan de manera conjunta las respuestas fisiológicas de estos organismos. Este es el primer estudio de este tipo que se realiza en la biota de este humedal, el cual podría servir como línea de base para futuras investigaciones. Este estudio demuestra la utilidad de los caracoles de agua dulce (*Pachychilus* sp.) como bioindicadores del estado de la salud de los ecosistemas, toda vez que estos organismos pueden encontrarse en cuerpos de agua como humedales o ríos en esta región.

Es necesario llevar a cabo una evaluación más profunda en el humedal, en la que se incluyan diferentes efectos biológicos y otros organismos de importancia ecológica (anfibios, reptiles o aves), así como la determinación de concentraciones de plaguicidas y otros contaminantes. La información conjunta sería de utilidad para definir las rutas de exposición y establecer los posibles riesgos para la salud humana y para los ecosistemas derivado de la utilización de plaguicidas en los cultivos aledaños al humedal, que deriven en medidas de gestión para su conservación y correcto manejo sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo otorgado por la Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el financiamiento del proyecto A1-S-27598 de Investigación Científica Básica SEP-CONACYT 2017-2018. Además, agradecemos a Cátedras CONACyT-UASLP (Proyecto No. 553). Finalmente, se agradece a los alumnos del curso de Ecosistemas en Riego de la sexta generación de la Licenciatura en Ciencias Ambientales y Salud de la UASLP por el apoyo en las labores de campo, así como al geógrafo Ángel González Canuto por la elaboración del mapa.

CONFLICTO DE INTERES

Los investigadores manifiestan que no existe ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

Albert AL, Benítez JA. Impacto ambiental de los plaguicidas en ecosistemas costeros. En: Botello AV, Rendón von Osten, J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C, editores. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición. Campeche, México: Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología; 2005. p. 157-176.

Albert AL, Loera-Gallardo R. Química y Ecotoxicología de los

Insecticidas. En: Botello AV, Rendón von Osten, J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C, editores. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da. Edición. Campeche, México: Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología; 2005. p. 177-190.

Ali D. Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Silver Nanoparticles in Freshwater Snail *Lymnea luteola* L. Biol Trace Elem Res. 2014;162(1-3):333-341. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-014-0158-6>

Amiard-Triquet C, Amiard JC, Rainbow PS. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. EE. UU: CRC Press/Taylor & Francis; 2013. p. 1-43.

Amiard-Triquet C, Berthet B. Individual Biomarkers. En: Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C, editores. Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. USA: Academic Press-Elsevier; 2014. p. 153-182.

Barman D, Roy B, Roy S. Seasonal variation of physico-chemical characteristics of wetlands in the West Garo Hill, Meghalaya, India. Int Res J Biological Sci. 2015;4(1):60-65.

Basopo N, Naik YS. Toxicological effects of technical grade and formulated pesticides on esterase activity in freshwater snails *H. duryi* and *L. natalensis*. Ann Biol Res. 2015;6(12):37-42.

Burch JB, Cruz-Reyes A. Clave genérica para la identificación de gastrópodos de agua dulce en México. México: Instituto de Biología, UNAM; 1987. p. 1-46.

Chitmanat C, Prakobsin N, Chaibu P, Traichaiyaporn S. The Use of Acetylcholinesterase Inhibition in River Snails (*Sinotaia ingallsiana*) to Determine the Pesticide Contamination in the Upper Ping River. Int J Agric Biol. 2008;10(6):658-660.

Cossi PF, Beverly B, Carlos L, Kristoff G. Recovery study of cholinesterases and neurotoxic signs in the non-target freshwater invertebrate *Chilina gibbosa* after an acute exposure to an environmental concentration of azinphos-methyl. Aquat Toxicol. 2015;167:248-256. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.014>

Damiens G, His E, Gnassia-Barrelli m, Quinou F, Roméo M. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2004;138(2):121-128. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.05.010>

Depledge M. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. En: Fossi MC, Leonzio C, editores. Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. EE. UU: Ed. Lewis Publishers; 1994. p. 271-295.

Díaz JC, Labrada R. Manejo de malezas en caña de azúcar. En: Labrada R, Caseley JC, Parker C. Manejo de Malezas para Países en Desarrollo. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación; 1996. p. 369-371.

Domingues I, Agra AR, Monaghan K, Soares MVMA, Nogueira, AJA. Cholinesterase and glutathione-s-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. Environ Toxicol Chem. 2010;29(1):5-18. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.23>

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7(2):88-95. Doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Filho WD, Tribess T, Gáspari C, Claudio FD, Torres MA, Magalhães ARM. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture.* 2001;203(1-2):149-158. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00599-3)
- Fossi Tankoua O, Buffer PE, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Mouneyrac C, Berthet B. Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2011;18(8):1253-1263. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0479-3>
- Fu J, Wang Y, Zhang A, Zhang Q, Zhao Z, Wang T, Jiang G. Spatial distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyl ethers (PBDEs) in a e-waste dismantling region in Southeast China: Use of apple snail (*Ampullariidae*) as a bioindicator. *Chemosphere.* 2011;82(5):648-655. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.014>
- Gagné F. *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods.* EE. UU: Ed. Elsevier Inc.; 2014. p. 123-165.
- Gélinas M, Lajeunesse A, Gagnon C, Gagné F. Temporal and seasonal variation in acetylcholinesterase activity and glutathione-S-transferase in amphipods collected in mats of *Lyngbya wollei* in the St-Lawrence River (Canada). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;94:54-59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.017>
- Géret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat Living Resour.* 2002;15(1):61-66. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(01\)01147-0](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01147-0)
- Gerla PJ. Can pH and electrical conductivity monitoring reveal spatial and temporal patterns in wetland geochemical processes? *Hydrol Earth Syst Sci Discuss.* 2013;10:699-728. Doi: <https://doi.org/10.5194/hessd-10-699-2013>
- Gómez-Berning M, Köhler F, Glaubrecht M. Catalogue of the nominal taxa of Mesoamerican Pachychilidae (Mollusca: Caenogastropoda). *Zootaxa.* 2012;3381(1):1-44.
- Grara N, Atailia A, Boucenna M, Khaldi F, Berrebbah H, Reda DM. Effects of Heavy Metals on the Snails *Helix aspersa* Bioindicators of the Environment Pollution for Human Health. En: Nejadkoorki F, editores. *International Conference on Applied Life Sciences.* Turquía: IntechOpen; 2012. p. 241-245.
- Habig W, Pabst M, Jakoby WB. Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
- Healy PF, Emery K, Wright LE. Ancient and Modern Maya Exploitation of the Jute Snail (*Pachychilus*). *Lat Am Antiq.* 1990;1(2):170-183. Doi: <https://doi.org/10.2307/971986>
- Klobucar IVG, Lajtner J, Erben R. Lipid Peroxidation and Histopathological Changes in the Digestive Gland of a Freshwater Snail *Planorbis corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) Exposed to Chronic and Sub-Chronic Concentrations of PCP. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1997;58(1):128-134.
- Leiniö S, Lehtonen KK. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2005;140:408-421. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.04.005>
- Li L, Zheng B, Liu L. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends. *Procedia Environ Sci.* 2010;2:1510-1524. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164>
- Moreira SM, Guilhermino L. The Use of *Mytilus Galloprovincialis* Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases Activities as Biomarkers of Environmental Contamination Along the Northwest Portuguese Coast. 2005;105(1-3):309-325. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-005-3854-z>
- Naranjo-García E, Meza-Meneses G. *Moluscos.* En: De la Lanza-Espino GJ, Hernández-Pulido S, Carbajal-Pérez, JL, editores. *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores).* 2ª. Edición. México: Plaza y Valdés; Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología; 2011. p. 336-360
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. Molluscs as bioindicators. En: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, editores. *Bioindicators and biomonitors. Principles, Concepts and Applications.* Países Bajos: Elsevier Science Ltd; 2003. p. 577-635.
- Parkinson A, Ogilve WB, Buckley BD, Kazmi F, Czerwinski M, Parkinson O. Biotransformation of Xenobiotics. En: Klassen DC, editores. *Casarett & Doull's Toxicology The basic Science of poisons.* 8a. Ed. USA: Ed. McGraw Hill Education; 2013. p. 185-366.
- Pérez MA, López de la Fuente A. Estado actual del conocimiento de la malacofauna continental de Nicaragua. *Encuentro.* 1993;40:23-38.
- Pérez-Castillo VF, Alfaro-De la Torre MC, Pérez-Rodríguez RY, Comín-Sebastián AF. Tracing Anthropogenic Disturbances of a Wetland Through Carbon and Nitrogen Isotope Analyses in Sediments. *J Nat Resour Dev.* 2017;7(22):22-29. Doi: <https://doi.org/10.5027/jnrd.v7i0.03>

- Pérez-Castillo VF. Dinámica de C, N, P y Fe en agua y sedimentos en el humedal natural Ciénega de Tamasopo, S.L.P. (Tesis de Doctorado). San Luis Potosí, México: Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina, Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2018.
- Pfeifer S, Schiedek D, Dippner JW. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. From the south-western Baltic Sea. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2005;320(1):93-103. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.020>
- Radwan MA, El-Gendy KS, Gad AF. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere.* 2010;79(1):40-46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.056>
- Repetto M, Semprine J, Boveris A. Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. En: Catala A, editor. *Lipid Peroxidation*, Croacia: IntechOpen; 2012. p. 3-30
- Reylea RA, Hoverman JT. Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities. *Oikos.* 2008;117(11):1647-1658. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.16933.x>
- Rivadeneira PR, Agrelo M, Otero S, Kristoff G. Different effects of subchronic low exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013;90:82-88. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.013>
- Sánchez-Bayo F, Van den Brink P, Mann MR. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, USA: Ed. Bentham e Books; 2011. p. 63-110.
- SEDUE (Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología). Criterios ecológicos de calidad del agua. CE-CCA-001/89. Diario Oficial de la Federación. 01 de diciembre de 1989.
- Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(2):289-300. Doi: <https://doi.org/10.1089/152308604322899350>
- Sharma RC, Rawat JS. Monitoring of aquatic macroinvertebrates as bioindicator for assessing the health of wetlands: A case study in the Central Himalayas, India. *Ecol Indic.* 2009;9(1):118-128. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.02.004>
- Sheehan D, Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999;123(3):193-199. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00033-X)
- Singh A, Singh DK, Agarwal RA. Effect of Cypermethrin, Mexacarbate, and Phorate on Phospholipid and Lipid Peroxidation in the Snail *Lymnaea acuminata*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1993;51(1):68-71.
- Slatinská I, Smutná M, Havelková M, Svobodová Z. Biochemical markers of aquatic pollution in fish-glutathione S-transferase. *Folia Vet.* 2008;52(3-4):129-134.
- Tapia-Goné JJ, Álcala JJ, Rodríguez-Ortiz JC, Aceves AA, García-Hernández JL, Villar MC, *et al.* Uso potencial del suelo del humedal de la Ciénega de Cabezas, San Luis Potosí, México: Multiquina. 2010;19:93-103.
- Thompson HM. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology.* 1999;8(5):369-384. Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008934505370>
- Tomlinson G, Mutus B, McLennan I. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Can J Biochem.* 1981;59(9):728-735.
- Torres G. Ficha Informativa de los Humedales de RAMSAR (FIR)-Ciénega de Tamasopo, 2008. [Fecha de consulta: Febrero, 2018]. Disponible en: www.cofemersimir.gob.mx/expediente/21769/mir/45150/anexo/4408520
- Vázquez Perera AA, Perera Valderrama S. Endemic Freshwater molluscs of Cuba and their conservation status. *Trop Conserv Sci.* 2010;3(2):190-199. Doi: <https://doi.org/10.1177/194008291000300206>
- Vidal-Liñán L, Bellas J, Etxebarria N, Nieto O, Beiras R. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas. *Sci Total Environ.* 2014;470-471:107-116. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.073>
- Wong-Argüelles C. Estudio de organismos acuáticos macrobentónicos como indicadores de la contaminación por metales pesados en ríos de la Huasteca Potosina (Tesis de maestría). San Luis Potosí, México: Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina – Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.; 2005. p. 51-57.
- Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-Hydroxynonal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(2):319-336.
- Zanette J, de Almeida EA, da Silva AZ, Guzinski J, Ferreira, JF, Di Mascio P, *et al.* Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Sci Total Environ.* 2011;409(10):1976-1983. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.048>