CONTRIBUCIONES SELECTAS EN ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL



Editado por:

Leobardo Manuel Gómez Oliván
Hariz Islas Flores
Patricia Ramírez Romero
Marcela Galar Martínez
Juan Carlos Sánchez Meza
Xochitl Guzmán García
Guadalupe Barrera Escorcia
José Luís Zavala Aguirre
Eloy Gasca Pérez
Octavio Dublán García

AMEQA

Contribuciones Selectas en Ecotoxicología y Química Ambiental

Fotografía de portada: Leopoldo I. Flores. 2021.

Primera edición, 2021.

Publicación arbitrada por el Comité Científico de AMEQA.

© AMEQA

www.ameqa.org

Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental.
Rio Parral 65
Paseos de Churubusco
Iztapalapa
CP09030
Ciudad de México, México

ISBN- 978-607-99510-0-9

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción total o parcial de esta obra, ni su incorporación a un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma o por cualquier medio (electrónico, mecánico, fotocopia, grabación u otros) sin autorización previa y por escrito de los titulares del copyright. La infracción de dichos derechos puede constituir un delito contra la propiedad intelectual. Se autoriza la reproducción del contenido de esta obra, siempre y cuando se cite la fuente.

Hecho en México / Made in Mexico

CONTRIBUCIONES SELECTAS EN ECOTOXICOLOGÍA Y QUÍMICA AMBIENTAL

Editado por:
Leobardo Manuel Gómez Oliván
Hariz Islas Flores
Patricia Ramírez Romero
Marcela Galar Martínez
Juan Carlos Sánchez Meza
Xochitl Guzmán García
Guadalupe Barrera Escorcia
José Luís Zavala Aguirre
Eloy Gasca Pérez
Octavio Dublán García



AMEQA

P R Ó L O G O

La Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental (AMEQA) es una asociación civil sin fines de lucro, fundada el 30 de abril de 2003. A partir de 2005 se incorporó a The Society of Environmental Toxicology and Chemistry como un capítulo regional de la denominada unidad geográfica Norteamérica, la cual abarca Canadá, Estados Unidos y México. El objetivo principal de AMEQA es crear y difundir el conocimiento, así como promover la investigación en ecotoxicología y química ambiental. La AMEQA ha organizado 8 congresos, una reunión internacional y un encuentro estudiantil con la finalidad de incentivar actividades académicas, técnicas y científicas. Como parte de la difusión de los resultados de investigación que se han presentado en estos eventos la AMEQA ha publicado dos libros. En 2018, se organizó el VIII congreso de la asociación teniendo como sede el Centro Conjunto de Investigación y Química Sustentable UAEM-UNAM en Toluca, Estado de México. En este evento se lanzó la convocatoria para escribir el tercer libro promovido por la asociación que dio como resultado el libro que hoy presentamos ***"Contribuciones Selectas en Ecotoxicología y Química Ambiental"***, siendo el primero que es formalmente editado por la asociación. El libro cuenta con 30 capítulos, escritos por estudiantes e investigadores de diversas

instituciones de educación superior e investigación de todo el país, con temas íntimamente ligados a la ecotoxicología y química ambiental.

Agradecemos a todos los revisores de capítulos de diferentes instituciones de educación superior de todo el país, sus esfuerzos que favorecieron el mejoramiento de la calidad de la presente obra.

Ahora corresponde al lector hacer los comentarios finales sobre esta edición, esperando contribuir de forma activa en la generación y aplicaciom del conocimiento en el área de la ecotoxicología y química ambiental con aportaciones de interés para el desarrollo de la investigación y educación de estas áreas, en el país y mesoamerica.

Dr.Leobardo Manuel Gómez Oliván

Presidente AMEQA 2020-2022

ÍNDICE

TOMO 1

Foto de Portada por Leopoldo I. Flores. 2021.

	Página
Prólogo	2
Índice	4
Capítulo 1. **EFECTO DE LAS PRECIPITACIONES ATÍPICAS EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN *Thalassia testudinum*.** Dilian Anguas-Cabrera, Karla Camacho-Cruz, Ma. Concepción Ortiz-Hernández, Alberto Sánchez.	7
Capítulo 2. **ACUMULACIÓN DE FÓSFORO EN SEDIMENTOS DE LA ZONA LITORAL DEL LAGO TOCHAC, HIDALGO, MÉXICO**. Agustín de Jesús Quiroz Flores, María Guadalupe Miranda Arce.	26
Capítulo 3. **RESPUESTAS DE LOS OCTOCORALES ANTE LA EUTROFIZACIÓN DE LAS ZONAS MARINO-COSTERAS: REVISIÓN Y SÍNTESIS**. Néstor Rey-Villiers, Alberto Sánchez, Patricia González-Díaz.	39
Capítulo 4. **OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE ANTIBIÓTICOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS**. Edgar David González-González, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Marcela Galar-Martínez, Hariz Islas-Flores, María Dolores Hernández-Navarro.	67
Capítulo 5. **IMPACTO ECOTOXICOLÓGICO DEL 17a-ETINILESTRADIOL (EE2) EN AMBIENTES ACUÁTICOS.** Alejandro Mejía-García, Leobardo Manuel Gómez Oliván.	92
Capítulo 6. **DESTINO, OCURRENCIA Y EFECTOS TÓXICOS DE EDULCORANTES ARTIFICIALES, UN NUEVO TIPO DE CONTAMINANTES EMERGENTES**. Livier Mireya Sánchez Aceves, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Hariz Islas-Flores, Marcela Galar-Martínez.	118
Capítulo 7. **PLAGUICIDAS Y CÁNCER EN BAJA CALIFORNIA: REVISIÓN SISTEMÁTICA (1950-2016)**. María Evarista Arellano García , Olivia Torres Bugarín, Marco Antonio García Zárate, Ana Erika Ruiz Arellano .	151
Capítulo 8. **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE CONTAMINANTES AMBIENTALES MEDIANTE EL ENSAYO FETAX**. Itzayana Pérez-Alvarez, Hariz Islas-Flores, Leobardo Manuel Gomez-Oliván, Germán Chamorro Cevallos.	175
Capítulo 9. **DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CYP1A EN PECES PLANOS EN EL SURESTE DEL GOLFO DE MÉXICO**. Wendy Donaji Nicolás-González, Isajav Rivas-Reyes, Mayra Alejandra Cañizares-Martínez, Mercedes Quintanilla-Mena, Victoria Patiño-Suárez, Marcela Del Río-García, Omar Zapata-Pérez, Carlos Puch-Hau.	206
Capítulo 10. **CAMBIOS EPIGENÉTICOS POSIBLEMENTE ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN PECES DEL NOROESTE DEL GOLFO DE**	230

MÉXICO: NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN. Mercedes Quintanilla-Mena, Isajav Rivas-Reyes, Alejandra Cañizares-Martínez, Victoria Patiño-Suárez, Marcela Del Río-García, Carlos Puch-Hau.

Capítulo 11. **GENES BIOMARCADORES DE CONTAMINANTES: UNA VISIÓN DESDE EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA MOLECULAR, CINVESTAV, MÉRIDA, MÉXICO.** María Victoria Patiño-Suárez, Mayra Alejandra Cañizares-Martínez, Mercedes Quintanilla-Mena, Marcela Del Río-García, Isajav Rivas-Reyes, Omar Zapata-Pérez, Carlos Puch-Hau. 257

Capítulo 12. **LA CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO: EFECTOS EN EL AMBIENTE Y LA SALUD HUMANA.** Alejandro Islas-García, Arely Vergara-Castañeda, Laura Martino-Roaro, Adriana Benitez Rico, Tomás Chávez-Miyauchi. 286

Capítulo 13. **BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS DE LA LAGUNA DE SAN JUAN, ASCENSIÓN, CHIHUAHUA Y SU EVALUACIÓN EN PLANTAs DE *Solanum lycopersicum***. Marisela Yadira Soto-Padilla, Jorge Deciderio Carrillo-Méndez, Edith Flores-Tavizón, Luis Gerardo Bernadac-Villegas, Sergio Saúl-Solís, Miguel Domínguez-Acosta, Felipe Adrián Vázquez Galvez. 317

Capítulo 14. **ESTADO ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN COSTERA DE LATINOAMÉRICA POR COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ESTAÑO**. Russell Giovanni Uc Peraza , Victor Hugo Delgado-Blas ,Gilberto Fillmann. 344

Capítulo 15. **EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA DE FILTROS A BASE DE ARCILLA UTILIZADOS EN LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA.** Luis Bernadac-Villegas, Alba Corral-Avitia, Leobardo Gómez-Oliván, Dora Solís-Casados, Marisela Soto-Padilla. 373

Capítulo 16. **VARIABLES NO CONSIDERADAS EN UNA EXTRACCIÓN CONTINUA Y SU INFLUENCIA EN DIAGNÓSTICOS AMBIENTALES DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS**. Carlos M. Morales-Bautista, José del C. Méndez-Moreno, Alejandra E. Espinoza de los Monteros R., Carolina G. Martínez-Chávez. 491

Capítulo 17. **EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD LISOSOMAL Y NADO CONTRACORRIENTE EN *MACROBRACHIUM SP*. EXPUESTOS A SEDIMENTOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BIODIÉSEL**. Alma Diana Arellano Mondragón, Patricia Ramírez Romero, Guadalupe Barrera Escorcia, Xenia Mena Espino. 512

Capítulo 18. **OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE QUINOLONAS EN AMBIENTES ACUÁTICOS.** Jonathan Ricardo Rosas-Ramírez, Hariz Islas-Flores, Leobardo Manuel Gómez-Oliván. 540

Capítulo 19. **EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL BIODIÉSEL EN RENACUAJOS DE RANA TORO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)**. Claudia Verónica De La Cruz Moreno, Guadalupe Barrera Escorcia, Patricia Ramírez Romero , Xenia Mena Espino, Héctor Barrera Villa Zevallos. 573

Capítulo 20. **DETERMINACIÓN DE UNA CEPA SILVESTRE DE *PLANKTOTHRIX AGARDII* PRODUCTORA DE SAXITOXINA PROCEDENTE DE LA LAGUNA DE ZUMPANGO, ESTADO DE MÉXICO**. Luis A. Rodríguez-Guerrero, Víctor M. Luna-Pabello. 601

Capítulo 21. **EFECTO REPROTÓXICO Y TRANSGENERACIONAL DEL HERBICIDA DICAMBA EN EL MODELO BIOLÓGICO *Drosophila melanogaster*.** Mendoza-Ortiz Eva Daniela, Ramos-Morales Patricia. 619

Capítulo 22. ***Drosophila*, ORGANISMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE DAÑO REPROTOXICO Y TRANSGENERACIONAL**. Evangelista-Casimiro Rubi, Ramos-Morales Patricia. 645

Capítulo 23. **MORFOLOGÍA Y ALTERACIONES EN CÉLULAS SANGUÍNEAS EN PECES DE TECOLUTLA, VER., MANANTLÁN, JAL. Y VALLE DE BRAVO, EDO DE MÉX.** Brian Real-Huescas, José Roberto Jerónimo-Juárez, Misael Hernández-Díaz, Irma Hernández-Calderas, Fernando M. Matadamas-Guzmán, Patricia Ramírez-Romero, Xochitl Guzmán-García. 678

Capítulo 24. **EFECTO REPROTÓXICO Y TRASGENERACIONAL INDUCIDO POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN *Drosophila melanogaster*.** Edgar Alberto Ragde Gutiérrez Álvarez, Patricia Ramos Morales. 704

Capítulo 25. **EFECTOS TÓXICOS Y POTENCIAL DE BIORREMOCION DEL COLORANTE AZO "ROJO CONGO" POR DOS MICROALGAS CLOROFÍCEAS.** Aldo Azael Chávez Vargas, Miriam Azucena Hernández Zamora, Felipe Fernando Martínez Jerónimo. 727

Capítulo 26. **EFECTO REPROTÓXICO DEL TRICLOSAN EN DOS LÍNEAS DE *Drosophila melanogaster*.** Sergio Daniel Parra Barrera, Adriana Muñoz Hernández, Patricia Ramos Morales. 756

Capítulo 27. **ESTRÉS GENOTÓXICO DEL METIL METANO SULFONATO EN HEMBRAS Y MACHOS DE D. MELANOGASTER: UNA RESPUESTA DIFERENCIAL EN BIOMARCADORES REPROTÓXICOS.** Estefania Arroyo Jilote, Patricia Ramos Morales 780

Capítulo 28. **ANOMALÍAS MACROSCÓPICAS POR EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN LARVAS DE ANFIBIOS ANUROS.** David Ramiro Aguillón Gutiérrez 810

Capítulo 29. **EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL DEL CAUCE DEL RÍO BALSAS, REGION TIERRA CALIENTE DE GUERRERO.** Lubybed Escobar Sarabia, Diana Pérez de Jesús, Francisco Zavala Hernández, Maribel Ramírez Orozco 834

Capítulo 30. **CONCENTRACIONES DE METALES EN LA POBLACIÓN DE LA TORTUGA LORA *Lepidochelys kempii* QUE ANIDA EN EL SANTUARIO PLAYA DE RANCHO NUEVO, TAMAULIPAS, MÉXICO.** Alma Delia Nava Montes, Patricia Ramírez Romero 855

Capítulo 1

EFECTO DE LAS PRECIPITACIONES ATÍPICAS EN EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN *Thalassia testudinum*

Dilian Anguas-Cabrera[1]

Karla Camacho-Cruz[1,2]

Ma. Concepción Ortiz-Hernández[2]

Alberto Sánchez[1*]

[1] Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN S/N, Colonia Playa Palo de Sta. Rita, La Paz, Baja California Sur, CP 23096, México.

[2] El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal. Avenida Centenario Km 5.5. C.P.77014. Chetumal, Quintana Roo, México.

*alsanchezg@ipn.mx;
alsanchezg13@gmail.com

Resumen

Las condiciones climáticas en el Caribe mexicano fueron extraordinarias en el año de 2013 con ~2500 mm, mientras que, en los años 2012 y 2014, las precipitaciones fueron de 1300 mm, similares al promedio histórico de 50 años. Las descargas de aguas subterráneas y sus constituyentes disueltos (i.e. nitrato) aumentan considerablemente durante periodos extraordinarios de lluvias hacia las lagunas costeras y de arrecife en el Caribe mexicano. El tiempo de residencia de las especies nitrogenadas en la columna de agua es muy variable, por lo que las mediciones de la concentración de nutrientes reflejan las condiciones instantáneas del ambiente marino. En contraste, el contenido de nitrógeno en hojas del pasto marino *Thalassia testudinum*, es muy homogénea y es probable que refleje los incrementos de nitrógeno por arrastre ante eventos anómalos de lluvia. Por lo que resulta la siguiente pregunta: ¿El contenido de nitrógeno en las hojas del pasto marino *T. testudinum* es exacerbado por el incremento de la descarga de especies nitrogenadas en la época de lluvia? La recolecta de hojas de *T. testudinum* se realizó en cuatro localidades de la laguna Nichupté, Cancún, Quintana Roo, durante la época de lluvias de 2012, 2013 y 2014. El nitrógeno de las hojas fue cuantificado por duplicado en un analizador elemental. El contenido de nitrógeno fue 2.4 ± 0.4 % en 2012 y 2014 (periodo de lluvia típico) y 3.6 ± 0.1 % en 2013 (periodo de lluvia atípico), ambos periodos fueron estadísticamente diferentes. Esto sugiere que la mayor precipitación condujo a una mayor descarga de agua subterránea favoreciendo la incorporación de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* durante la época de lluvias atípicas en la región del Caribe mexicano.

Palabras clave: Nitrógeno, *T. testudinum*, Caribe mexicano, Lluvias atípicas.

1. Introducción

La mayor disponibilidad de especies nitrogenadas ha sido uno de los factores responsables de cambios en la estructura de la comunidad (Haynes et al. 2007), así como en la perdida de la cobertura de pastos marinos por crecimiento de algas epífitas, sucesión de especies, entre otros (Roca et al., 2016). El nitrógeno es un nutriente limitante en sistemas costeros marinos, donde las condiciones oligotróficas han sido alteradas por el incremento significativo en la concentración de especies nitrogenadas disueltas en algunas lagunas costeras y de arrecife del Caribe (Null et al., 2014). El contenido de nitrógeno de 27 especies de pastos marinos en 30 localidades del mundo fue estimado en 1.92 ± 0.05 % (Duarte, 1990). Este valor del contenido de nitrógeno en pastos marinos se ha utilizado como nivel de referencia para sugerir cambios en el aporte de nutrientes hacia los sistemas oligotróficos tropicales (Cambell y Fourqurean, 2009; Carruthers et al., 2005; Sanchez et al., 2013; Darnell et al. 2017).

Los nutrientes disueltos, como el nitrógeno, son críticos para sustentar a los ecosistemas de las praderas de pastos marinos y los arrecifes de coral, la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto es <1 µM. Este nutriente limitante, cuando se suministra en exceso puede ser perjudicial para estas comunidades de aguas oligotróficas (e.g., Waycott et al., 2009). Los períodos prolongados de altas cargas de nutrientes pueden alterar el ecosistema de la laguna arrecifal, de modo que un aumento en el nitrógeno inorgánico disuelto puede propiciar el predominio de las algas y, por lo tanto, la perdida de cobertura y menor abundancia de los pastos marinos y el arrecife de coral (Earp et al., 2018). El aumento de la carga de nutrientes del sistema costero causado por las actividades antropogénicas es el factor principal en la pérdida de pastos marinos (Short et al., 2018) y la amenaza para los arrecifes de coral (Renfro y Chadwick, 2017). La detección temprana de los cambios en la concentración de nutrientes en los ecosistemas costeros tropicales es esencial para mantener sus servicios ecológicos.

El Caribe Mexicano está caracterizado por un complejo sistema de ríos subterráneos que desembocan a lo largo de la costa. La descarga de agua dulce y sus constituyentes disueltos ocurre en mayor proporción durante la época de lluvias con respecto a la época seca (e.g., Hernandez-Terrones et al., 2011). La alta tasa de infiltración y rápida descarga de los sistemas cársticos hace vulnerable a los ecosistemas costeros a una eventual contaminación antropogénica, debido a la disposición directa de las aguas residuales hacia el manto friático, así como a la existencia de innumerables fugas por el mal funcionamiento de fosas sépticas (ArandaCirerol et al., 2011). Sin embargo, la descarga de estos constituyentes disueltos hacia los ecosistemas costeros es irregular con concentraciones de nitrato muy variables a lo largo del tiempo y puntos de muestreo en la laguna de Nichupté (0.23 - 43.2 µM en el periodo 2001-2006: Herrera-Silveira y Morales-Ojeda, 2010; 1 -

193 µM entre 2006-2007: Carbajal-Pérez, 2008 y Carriquiry et al., 2013; 0 - 16 µM en 2013: Null et al., 2014; 1 - 240 µM en el periodo de 2015-2016: Romero-Sierra et al., 2018).

El contenido de nitrógeno en hojas de *T. testudinum* ha sido reportado para la época seca en el Caribe mexicano (2.04 ± 0.14 %, van Tussenbroek, 1996; 2.5 - 2.9 %, Carruthers et al. 2005; 1.7 - 2.9 %, Mutchler et al. 2007, 2010; 2.3 - 4.0 %, Sánchez et al. 2013). Específicamente para la laguna de Nichupté, el contenido de nitrógeno *en T. testudinum* fue 2.04 ± 0.14 % para 1991 (van Tussenbroek, 1996) con un incrementó máximo de 4.0 % en 2011 (Sánchez et al., 2013). Sin embargo, el contenido de nitrógeno en este pasto marino no se ha cuantificado para la época de lluvias cuando la descarga de especies nitrogenadas incrementa hacia las lagunas costeras del Caribe mexicano (Null et al., 2014).

En el Caribe mexicano, las condiciones climáticas mostraron dos escenarios contrastantes en las condiciones de precipitación con 1300 mm en 2012 y 2014 (similar al promedio anual de la precipitación en los últimos 50 años) y lluvias extraordinarias de ~2500 mm en 2013. En el presente trabajo se presentan datos del contenido de nitrógeno en el pasto marino *T. testudinum* con la finalidad de determinar si el contenido de nitrógeno incrementó por las lluvias extraordinarias de 2013 vs. 2012 y 2014, reflejando un mayor aporte de especies nitrogenadas al interior de la laguna de Nichupté, Cancún, Quintana Roo.

1.1 Área de estudio

La laguna de Nichupté está ubicada en la región norte de Quintana Roo. En las inmediaciones de la laguna, la infraestructura hotelera cuenta con ~33 mil habitaciones y una afluencia turística que ha continuamente incrementado en los últimos años (Fig. 1, SEDETUR, 2018). Esto tiene como consecuencia una mayor demanda de bienes y servicios por parte del turismo al sector hotelero de Cancún, que puede ser traducido en una presión extraordinaria a los ecosistemas marinos, entre ellos las praderas de pastos marinos, que se encuentran dentro y en las inmediaciones de la laguna de Nichupté.

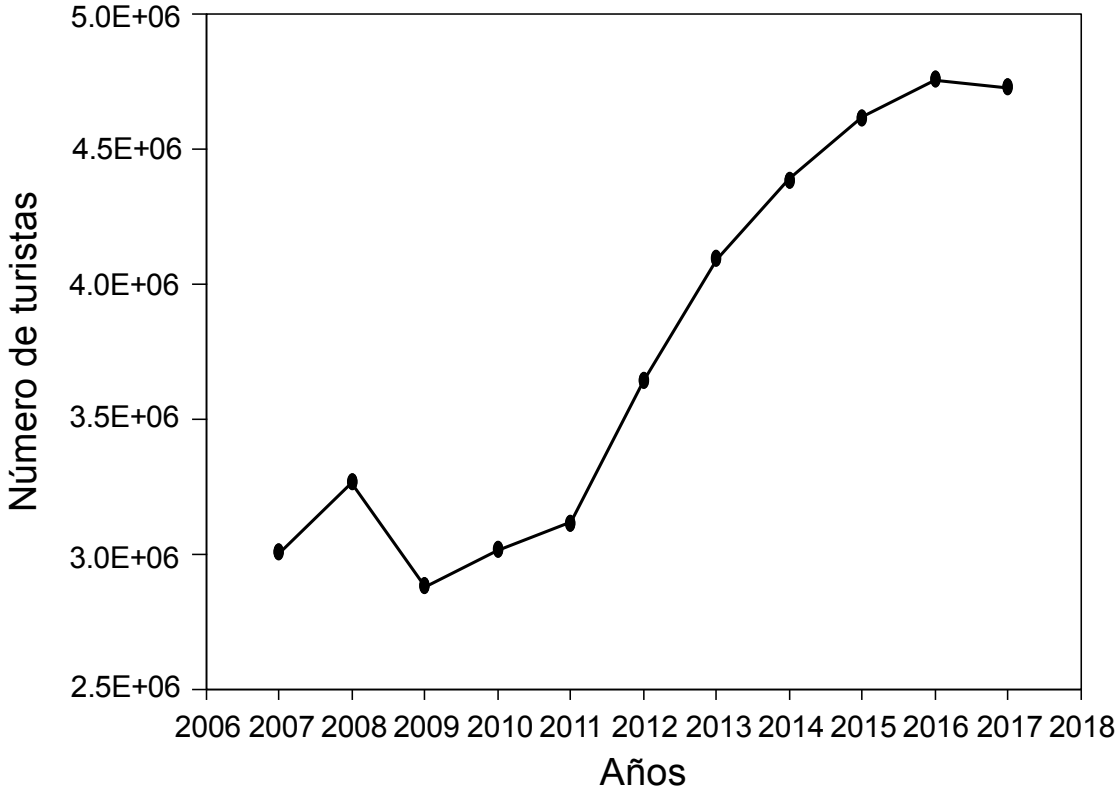


Figura 1. Número de turistas con respecto a los años en Cancún, Quintana Roo. Datos de SEDETUR, 2018. "de elaboración propia"

La península de Yucatán es altamente permeable por su característica cárstica y ríos subterráneos. En la península de Yucatán se describen tres temporadas climáticas: seca (marzo a mayo), lluvias (junio a octubre) y "nortes" (noviembre a febrero). La época de "nortes" no es tan marcada y diferenciada, como en otras regiones del Golfo de México. A final y principio de año (invierno) ocurren algunos frentes fríos y en el verano-otoño, la ocurrencia de tormentas tropicales pueden llegan a la categoría de huracán.

La laguna Nichupté es parte de un sistema de lagunas interconectadas, sus condiciones geomorfológicas son diferentes, la laguna de Nichupté está conectada al Mar Caribe por dos pequeñas entradas artificiales: Punta Cancún y Punta Nizuc, y recibe entradas de agua dulce de manantiales y escorrentía superficial del bosque de manglar circundante (Null et al., 2014). El gradiente de salinidad asemeja un estuario en el interior de la laguna (Sima-Morales, 2004), sin embargo, la evaporación tiene una influencia predominante sobre la salinidad, producto del intercambio de agua con el Mar Caribe (Romero-Sierra et al., 2018). La temperatura superficial de la laguna varia de 22 °C a 34 °C a lo largo del año. La dirección de las corrientes es muy similar entre la época de lluvia y la seca, pero su magnitud es <3

cm s^{-1} en la época de lluvia y de doble en la época de frentes fríos, cuando el viento tiene una mayor intensidad con respecto a la época de lluvia (Romero-Sierra et al., 2018).

El tiempo de residencia promedio del agua es de 1.9 años en la laguna Nichupté (Merino et al., 1990). Sin embargo, recientemente se ha calculado en el orden de semanas a meses para la época de lluvias y frentes fríos (Romero-Sierra et al., 2018). Null et al. (2014) establecieron que el tiempo de residencia dentro de la laguna de Nichupté es modificado por la descarga de agua subterránea en su interior y esta descarga es significativamente mayor en la época de lluvias vs. la época seca.

2. Materiales y métodos

Las muestras de *T. testudinum* se recolectaron durante la época de lluvia del 2012, 2013 y 2014. Las hojas del pasto marino *T. testudinum* fueron recolectadas en cuatro sitios en el interior de la laguna Nichupté (Fig. 2). En cada uno de los sitios, las muestras se recolectaron utilizando un núcleo de PVC de 100 mm de diámetro. Las muestras se colocaron en bolsas etiquetadas individualmente y se almacenaron en hielo para su preservación.

En el laboratorio, las hojas de *T. testudinum* fueron separadas de las vainas y rizomas, se retiraron aquellas hojas con características "marchitas" e incrustaciones de costras de carbonato de calcio. Cada una de las hojas se enjuagaron con H_2O desionizada para eliminar sales. Posteriormente, las plantas epifitas a las hojas fueron eliminadas con las manos o con alguna navaja, con la finalidad de evitar sesgos por la contribución en el contenido de nitrógeno de estas epifitas. Se realizó otro lavado con agua desionizada. Cada una de las hojas de *T. testudinum* se secaron en un horno a 40 °C por 48 horas. Una vez secas, las hojas fueron maceradas individualmente en un mortero de ágata hasta obtener una muestra homogénea. De cada muestra se pesaron dos submuestras de 1 mg para el análisis elemental de nitrógeno en un analizador elemental COSTEH 4010 en el Laboratorio de Espectrometría de Masas (LEsMa), en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional. El porcentaje de recuperación de nitrógeno elemental fue <99.5%, estimado de estándares certificados BBOT-NIST (6.51%) y Urea-NIST (46.62%).

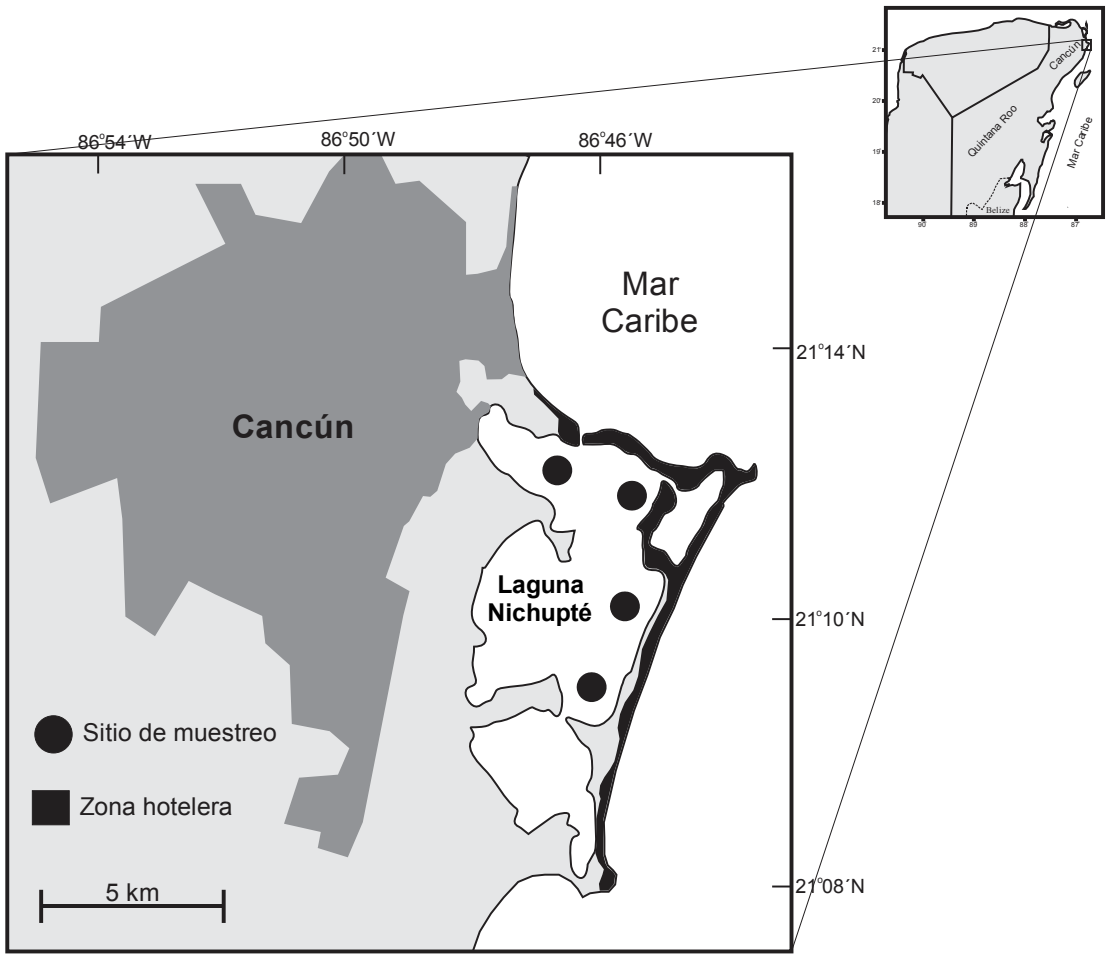


Figura 2. Área de estudio y sitios de colecta del pasto marino *T. testudinum* durante 2012, 2013 y 2014 en el interior de la laguna de Nichupté, Cancún, Quintana Roo. "de elaboración propia"

Los datos reportados de la concentración de nitrato en la columna de agua (Culhuac-Schmidt, 1987; Gonzalez-Hita, 2000; Valdés-Lozano et al., 2006; Carbajal-Pérez, 2008; Carriquiry et al., 2013; Null et al., 2014; Romero-Sierra et al., 2018) y del contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* del presente estudio y Van Tussenbroek et al. (1996) en la laguna de Nichupté fueron contrastados con respecto a la precipitación correspondiente a la época de lluvias utilizando un análisis de regresión, Un análisis de varianza no paramétrico fue aplicado al contenido de nitrógeno para contrastar diferencia entre los años de colecta.

3. Resultados

El contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* para julio y octubre fue de 2.67 % y 2.80 % para 2012, de 3.61 % y 3.68 % para 2013 y de 2.04 % y 2.65 % para 2014 %, respectivamente (Fig. 3). El contenido de nitrógeno en las hojas fue significativamente diferente entre 2012, 2013 y 2014 ($H_{1, \alpha = 0.05} = 4.504$, $P = 0.038$). Específicamente 2012 vs. 2013 y 2013 vs. 2014 fueron significativamente diferentes ($H_{1, \alpha = 0.05} = 7.031$, $P = 0.008$ y $H_{1, \alpha = 0.05} = 7.051$, $P = 0.009$, respectivamente). Mientras que, 2012 vs. 2014 no existieron diferencias estadísticamente significativas ($H_{1, \alpha = 0.05} = 0.000$, $P = 1$). De manera general, el contenido de nitrógeno en las hojas fue ligeramente mayor en octubre que el mes de julio entre los años de muestreo.

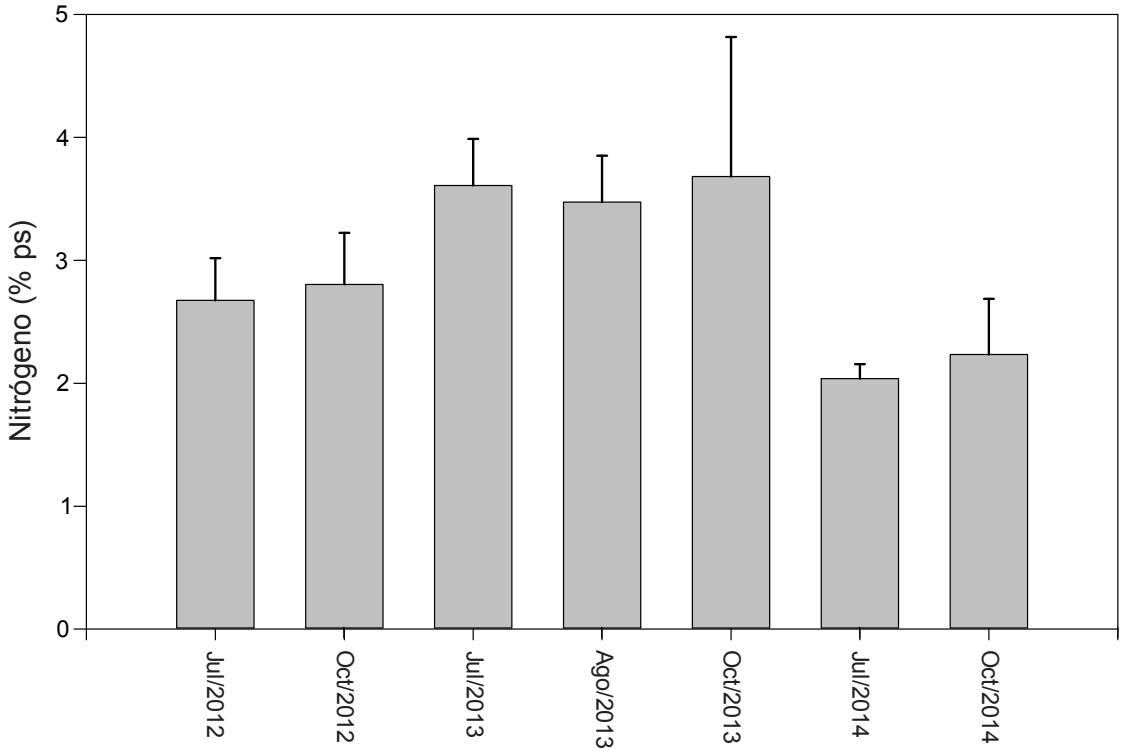


Figura 3. Contenido de nitrógeno (% ps, peso seco) en las hojas de *T. testudinum* colectadas durante julio, agosto y octubre los años de 2012, 2013 y 2014 en la laguna Nichupté."de elaboración propia"

4. Discusión

Las hojas de *T. testudinum* tuvieron un valor promedio de nitrógeno mayor (Fig. 3) con respecto al valor promedio de 1.9 % reportado para 7 localidades del

Atlántico tropical (Duarte 1990). Durante la época de lluvias típicas (1300 mm), el valor promedio del contenido de nitrógeno en las hojas fue de 2.5 % de nitrógeno. Mientras que, las condiciones climáticas extraordinarias en 2013 trajeron consigo que el contenido de nitrógeno promedio fuera de 3.6 % (Fig. 4).

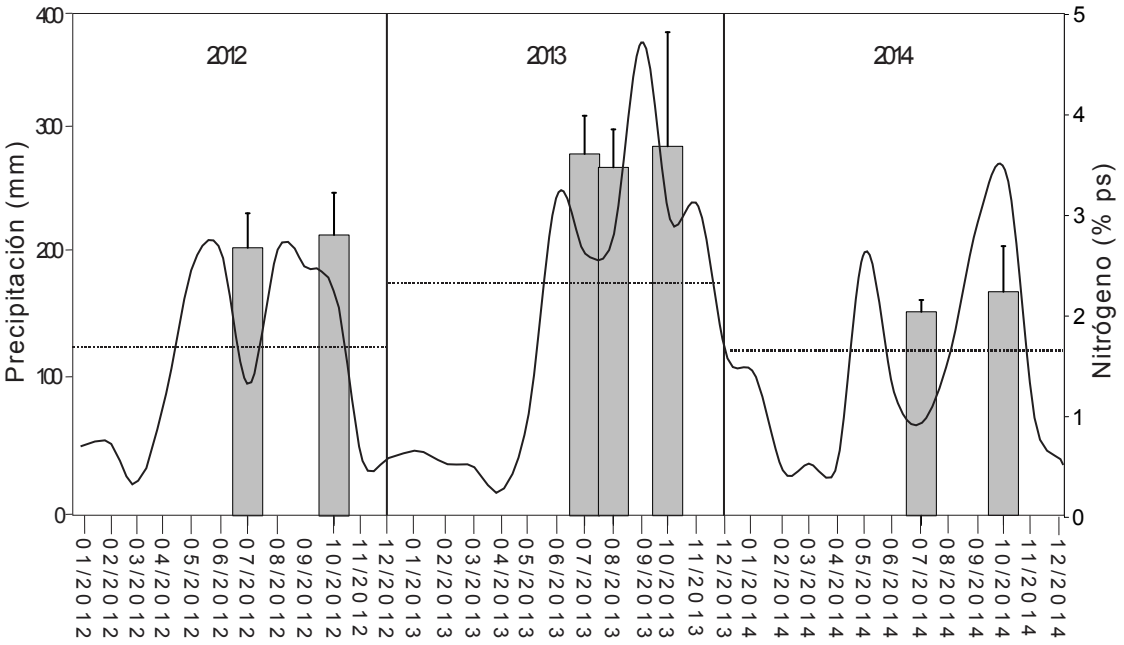


Figura 4. Precipitación mensual (mm, línea continua) y el contenido de nitrógeno (% en peso seco) en las hojas de *T. testudinum* (cajas y bigotes) colectadas durante el periodo de lluvias de 2012, 2013 y 2014 en la laguna de Nichupté. La línea discontinua corresponde con la precipitación mensual promedio de cada año."de elaboración propia"

La descarga de agua dulce y constituyentes disueltos como el nitrato, ocurren en mayor proporción en la época de lluvias en el Caribe mexicano (Hernandez-Terrones et al., 2011). En la laguna de Nichupté, la concentración de nitrato ha sido reportada para la época de lluvia por Culhuac-Schmidt (1987), Gonzalez-Hita (2000), Valdés-Lozano et al. (2006), Carbajal-Pérez (2008), Carriquiry et al. (2013), Null et al. (2014) y Romero-Sierra et al. (2018). La concentración de nitrato vs. la precipitación en el periodo de lluvia es mostrada en la figura 5. El coeficiente de determinación sugiere que ambas variables tienen una misma tendencia de incremento en la concentración de nitrato y la precipitación (R^2 = 0.572). De hecho, la concentración de nitrato ha sido >240 µM durante la época de lluvias, en algunos sitios de la laguna (Null et al., 2014; Romero-Sierra et al., 2018).

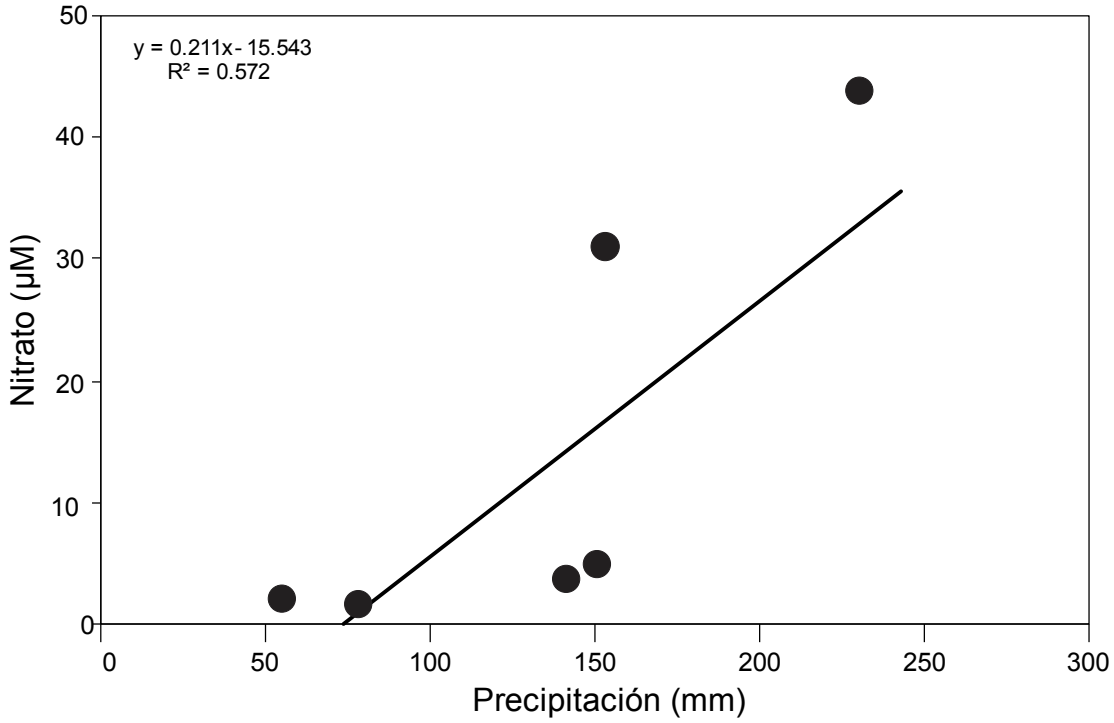


Figura 5. Concentración de nitrato vs. la época de lluvias (precipitación mensual promedio, mm) de octubre de 1986 (Culhuac-Schmidt, 1987), noviembre de 1997 (Gonzalez-Hita, 2000), julio de 2002 (Valdés-Lozano et al., 2006), noviembre de 2006 (Carbajal-Pérez, 2008; Carriquiry et al., 2013) y noviembre de 2009 (Null et al., 2014). La línea continua es la regresión lineal de la precipitación mensual para julio, octubre y noviembre vs. la concentración de nitrato."de elaboración propia".

La concentración de nitrógeno inorgánico disuelto en las aguas subterráneas y manantiales que descargan directamente en la laguna han sido evaluadas por Granel-Castro y Galez-Hita (2002) y Null et al. (2014). Granel-Castro y Galez-Hita (2002) reportaron una concentración de nitrato de 80 µM en aguas subterráneas que afloran en ojos de agua a lo largo del margen este de la laguna, contiguo al desarrollo urbano de Cancún. Posteriormente, las concentraciones de nitrato oscilan entre 70 y 390 µM para ojos de agua con una salinidad de 6 en la misma laguna (Null et al., 2014). Esto sugiere que la concentración de nitrato en aguas subterráneas ha venido incrementada a lo largo del tiempo producto de la actividad de la industria turística (Null et al., 2014).

El contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* vs. la precipitación para la época de lluvias (Fig. 6) denota la misma tendencia de correlación positiva observada para el nitrato (Fig. 5) con el incremento de la precipitación. El coeficiente de determinación (R^2 = 0.923) sugiere que el contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* es explicado por la precipitación en la época de lluvias, esto presupone una mayor descarga de agua dulce con alto contenido de nitrato hacia el interior de la laguna (Romero-Sierra et al., 2018). La carga de nitrógeno hacia el sistema lagunar de Nichupté fue previamente evidenciado para la época

seca por Carruthers et al. (2005) y Sánchez et al. (2013), donde el contenido de nitrógeno tuvo un incremento de 1 % en el periodo de 2001 a 2012. En el caso de la época de lluvia, el contenido de nitrógeno incrementó en 1.1 % entre lluvias típicas y atípicas. Esto pone en evidencia el arrastre de especies nitrogenadas debido a una mayor descarga de agua dulce que es vertida a la zona costera en el Caribe mexicano (Hernandez-Terrones et al., 2011; Null et al., 2014; Romero-Sierra et al., 2018).

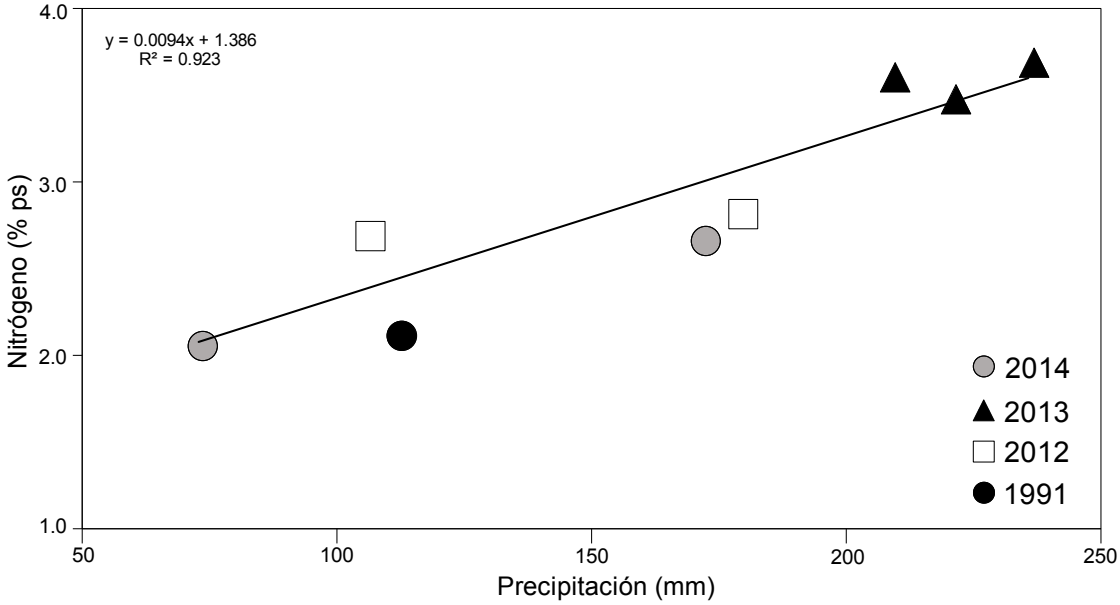


Figura 6. Contenido de nitrógeno en hojas de *T. testudinum* vs. la época de lluvias (precipitación mensual, mm) de 1991 (Van Tussenbroek et al., 1996) y de 2012 a 2014 (este estudio). Los cuadros y círculos corresponden a julio y octubre de 1991, 2012 y 2014 (meses típicos de precipitación) y los triángulos corresponden a julio, agosto y octubre de 2013 (meses atípicos de precipitación) en el Caribe mexicano. La línea continua es la regresión lineal de la precipitación mensual para julio, agosto y octubre vs. el contenido de nitrógeno en hojas de *T. testudinum*. "de elaboración propia"

En la bahía de Florida, el contenido de nitrógeno decreció en las hojas durante la época de lluvias para el periodo de 1996 a 2016 (Fourqurean et al., 2005; Fourqurean 2017). Aunque en el 2012, la precipitación de 2300 mm supero el promedio anual de 1500 mm para los últimos 100 años en la región, el contenido de nitrógeno (~2 %) se mantuvo sin cambio con respecto a los años previos y posteriores (Fourqurean 2017), lo que contrasta con los resultados encontrados para la laguna de Nichupté.

Una posible explicación de esta diferencia puede ser el tiempo de residencia que enmarca unos pocos días en la bahía de Florida (Eller et al., 2014). Mientras

que, el tiempo de residencia dentro de la laguna de Nichupté fue previamente considerado de 1 a 3 años (Merino et al., 1990), en contraste con el tiempo de residencia de semanas a meses para la época de lluvia propuesto por Romero-Sierra et al. (2018). De hecho, el tiempo de residencia puede disminuir en el interior de la laguna bajo condiciones de tormenta (Romero-Sierra et al., 2018) o por una mayor descarga de agua dulce hacia el interior (Null et al., 2014). Independientemente del tiempo de residencia de años o semanas en el intercambio de agua en esta laguna, el impacto del nitrógeno inorgánico disuelto puede llevar a un nivel de eutrofización a la laguna (Herrera–Silveira y Morales-Ojeda, 2010). La tendencia observada en la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto es a incrementar con mayor descarga de agua dulce (Null et al., 2014), esto es consistente con el aumento de nitrógeno en las hojas de *T. testudinum* bajo condiciones de precipitación extraordinaria y mayor descarga de agua dulce en la región de estudio. Durante descargas extremas del río Mississippi, el contenido de nitrógeno incrementó en *T. testudinum*, debido al mayor aporte por arrastre de NID disponible para este pasto marino, a lo largo de la costa de Luisiana, en Estados Unidos de América (Darnell et al. 2017).

La incorporación de nitrógeno por parte de los pastos marinos puede ser, además de la asimilación del nitrato de la columna de agua, a través del agua intersticial, donde se encuentran los rizomas de los pastos marinos (Mutchler y Hoffman 2017). Con la finalidad de determinar si la incorporación de nitrógeno en los pastos marino se lleva a cabo inicialmente a través de los rizomas y posteriormente, es llevado a las hojas, o las hojas incorporan directamente el nitrógeno de la columna de agua, Lee y Dunton (1999a) llevaron a cabo un experimento con enriquecimiento de amonio tanto en la columna de agua como en el intersticial en praderas de pastos marinos. El contenido de nitrógeno en las hojas varió de 1.7 a 3.1 %, mientras que en los rizomas la variación fue de 0.8 a 1.7 % mayor contenido de nitrógeno en las hojas que en los rizomas. Estos resultados parecen indicar que los rizomas asimilan inicialmente el nitrógeno y después es llevado a las hojas de los pastos, sin embargo, solo el carbono mostró evidencia de transporte de los rizomas a las hojas y no el nitrógeno (Lee y Dunton, 1999a). De hecho, la incorporación de nitrógeno es más eficiente y en menor tiempo que los rizomas de los pastos; es decir, a bajas concentraciones de amonio, la tasa de incorporación de nitrógeno por las hojas fue mayor y en menor tiempo que en los rizomas, que requieren de mayor concentración de amonio y la tasa de incorporación requiere de mayor tiempo (Lee y Dunton, 1999b). Mutchler y Hoffman (2017) indican que las hojas de *T. testudinum* responden rápidamente a la adición de nitrato y amonio, ocasionando una mayor palatabilidad de estas hojas a especies herbívoras que se alimentan de este pasto marino.

La incorporación de nitrógeno del rizoma a las hojas o directamente de la columna de agua a la hoja del pasto marino es un tema bajo amplio debate. El efecto de la incorporación de especies nitrogenadas por la descarga de agua

subterránea con una carga elevada en la concentración de nitrato o amonio, da evidencia que las hojas de *T. testudinum* responden tanto en condiciones experimentales como naturales al incremento de nitrógeno y en los eventos extremos de precipitación puede ser un factor adicional de este enriquecimiento de nitrógeno.

5. Conclusiones

Las hojas de *T. testudinum* tienen un contenido de nitrógeno mayor al valor de referencia de 2 % propuesto por Duarte (1990).

En la época de lluvias atípicas, el contenido de nitrógeno en las hojas de *T. testidinum* incremento en 50% con respecto al contenido de nitrógeno en la época de lluvias típicas, resultando significativamente diferentes.

El incremento en el contenido de nitrógeno en el pasto marino tiene una alta correlación (92%) con el incremento de la precipitación, aun mayor que la correlación de la concentración de nitrato del agua con el incremento de la precipitación (52%). Por lo que la medición de nitrógeno en hojas de este pasto marino es un buen indicador del aporte anómalo de nitrógeno durante eventos extraordinarios de lluvia.

Agradecimientos

Agradecemos los comentarios y sugerencias de los revisores anónimos que ayudaron a mejor este manuscrito de investigación. Esta investigación fue financiada en parte por los proyectos SIP20172233 y SIP20180664 de la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional. Alberto Sánchez da las gracias a Comisión de Operaciones y Fomento de las Actividades Académicas y Programa de Estímulos al Desempeño de los Investigadores del Instituto Politécnico Nacional. Dilian Anguas Cabrera y Karla Camacho Cruz dan las gracias por el apoyo del Programa de Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

7. Referencias

ArandaCirerol, N., Comín, F., y Herrera-Silveira, J. (2011). Nitrogen and phosphorus budgets for the Yucatán littoral: an approach for groundwater management. *Environmental monitoring and assessment*, 172(1-4), 493-505. doi:10.1007/s10661-010-1349-z

Bryant, D., Burke, L., McManus, J.W., y Spalding, M. (1998). *Reefs at Risk. A Map-Based Indicator of Potential Threats to the World's Coral Reefs*. Washington, DC, EUA: World Resources Institute.

Campbell, J. E., y Fourqurean, J. W. (2009). Interspecific variation in the elemental and stable isotope content of seagrasses in South Florida. *Marine Ecology Progress Series*, 387, 109-123. doi:10.3354/meps08093

Carbajal-Pérez, N. (2008). *Hidrodinámica y transporte de contaminantes y sedimentos en el Sistema Lagunar de Nichupté-Bojorquez, Quintana Roo*, Proyecto CQ063, Consejo Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, Informe núm. 2, CONABIO, 147 pp.

Carriquiry, J. D., Barranco-Servin, L. M., Villaescusa, J. A., Camacho-Ibar, V. F., Reyes-Bonilla, H., y Cupul-Magaña, A. L. (2013). Conservation and sustainability of Mexican Caribbean coral reefs and the threats of a human-induced phase-shift. En S. Silvern and S. Young (Ed.), *Environmental Change and Sustainability* (pp. 29-51). Londres, Inglaterra: InTech. doi:10.5772/54339

Carruthers, T.J.B., Tussenbroek, B.I., y Dennison, W.C. (2005). Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64(2-3), 191-199. doi: 10.1016/j.ecss.2005.01.015

Culhuac-Schmidt, S.E. (1987). *Importancia ecológica de las algas epifitas de las fanerogamas marinas en la laguna Bojorquez, Quintana Roo* (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Metropolitana, Distrito Federal, México.

Duarte, C. M. (1990). Seagrass nutrient content. *Marine Ecology Progress Series*, 67(2), 201-207.

Earp, H. S., Prinz, N., Cziesielski, M. J., y Andskog, M. (2018). For a World Without Boundaries: Connectivity Between Marine Tropical Ecosystems in Times of Change, En S. Jungblut, V. Liebich, M. Bode (Ed.), *YOUMARES 8 – Oceans Across Boundaries: Learning from each other* (pp. 125-144). Cham, Suiza: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-93284-2_9

Eller, K.T., Burnett, W.C., Fitzhugh, L.M., y Chanton, J.P. (2014). Radium Sampling Methods and Residence Times in St. Andrew Bay, Florida. *Estuaries and Coasts* 37(1), 94–103. doi: 10.1007/s12237-013-9661-9

Fourqurean, J.W., Escorcia, S.P., Anderson, W.T., y Zieman, J.C. (2005). *Spatial and seasonal variability in elemental content, $\delta^{13}C$, and $\delta^{15}N$ of Thalassia testudinum from South Florida and its implications for ecosystem studies. Estuaries* 28(3), 447-461. doi: 10.1007/BF02693926

Gonzalez-Hita, L. (2000). Dinámica de los contaminantes infiltrados en el acuífero kárstico de Cancún, Quintana Roo. *1st Joint World Congress on Groundwater*, Fortaleza, Brasil.

Granel Castro, E., y Gález Hita, L. (2002). Deterioro de la calidad de agua subterránea por el desarrollo poblacional: Cancún, Q. Roo. *Ingeniería*, 6(3), 41-53.

Haynes, D., Brodie, J., Waterhouse, J., Bainbridge, Z., Bass, D., y Hart, B. (2007). Assessment of the water quality and ecosystem health of the Great Barrier Reef (Australia): conceptual models. *Environmental Management*, 40(6), 993-1003. doi: 10.1007/s00267-007-9009-y

Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A., y Monroy-Ríos, E. (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1-4), 517-528. doi:10.1007/s11270-010-0664-x

Herrera-Silveira, J.A. y Morales-Ojeda, S.M. (2010). Subtropical Karstic Coastal Lagoon Assessment, Southeast Mexico. The Yucatan Peninsula Case. En M. J. Kennish. y H. W. Paerl (Ed.), *Coastal lagoons. Critical habitats of environmental change* (pp. 307-333). Boca Ratón, Florida, EUA: CRC.

Lamb, K., y Swart, P.K. (2008). The carbon and nitrogen isotopic values of particulate organic material from the Florida Keys: a temporal and spatial study. *Coral Reefs* 27(2), 351-362. doi: 10.1007/s00338-007-0336-5

Lapointe, B.E. (1997). Nutrient thresholds for bottom-up control of macroalgal blooms on coral reefs in Jamaica and southeast Florida. *Limnology and Oceanography* 42(5), 1119-1131. doi: 10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1119

Lee, K. S., y Dunton, K. H. (1999a). Influence of sediment nitrogen-availability on carbon and nitrogen dynamics in the seagrass Thalassia testudinum. *Marine Biology*, 134(2), 217-226. doi: 10.1007/s002270050540

Lee, K. S., y Dunton, K. H. (1999b). Inorganic nitrogen acquisition in the seagrass Thalassia testudinum: Development of a whole-plant nitrogen budget. *Limnology and Oceanography*, 44(5), 1204-1215. doi: 10.4319/lo.1999.44.5.1204

Merino, S. Czitrom, E. Jordán, E. Martin, P. Thomé, y Moreno, O. (1990). Hidrology and rain flushing of the Nichupté Lagoon System, Cancún, México.

Estuarine, Coastal and Shelf Science 30(3), 223-237. doi: 10.1016/0272-7714(90)90049-W

Molina-Hernández, A. L. M., y van Tussenbroek, B. I. (2014). Patch dynamics and species shifts in seagrass communities under moderate and high grazing pressure by green sea turtles. *Marine Ecology Progress Series*, 517, 143-157. doi: 10.3354/meps11068

Mutchler, T., y Hoffman, D. K. (2017). Response of seagrass (*Thalassia testudinum*) metrics to short-term nutrient enrichment and grazing manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 486, 105-113. doi: 10.1016/j.jembe.2016.09.015

Mutchler, T., Dunton, K. H., Townsend-Small, A., Fredriksen, S., y Rasser, M. K. (2007). Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 74(3), 449-457. doi: 10.1016/j.ecss.2007.04.005

Mutchler, T., Mooney, R.F., Wallace, S., Podsim, L., Fredriksen, S., y Dunton, K.H., (2010). Origins and fate of inorganic-nitrogen from land to coastal ocean on the Yucatan Peninsula, Mexico. En M. J. Kennish y H. W. Paerl (Ed.), *Coastal lagoons. Critical habitats of environmental change* (pp. 285-305), Boca Ratón, Florida, EUA: CRC.

Null, K. A., Knee, K. L., Crook, E. D., de Sieyes, N. R., Rebolledo-Vieyra, M., Hernández-Terrones, L., y Paytan, A. (2014). Composition and fluxes of submarine groundwater along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula. *Continental Shelf Research*, 77, 38-50. doi: 10.1016/j.csr.2014.01.011

O'Brien, K. R., Waycott, M., Maxwell, P., Kendrick, G. A., Udy, J. W., Ferguson, A. J.,

Kieryn Kilminster, Peter Scanes, Len J. McKenzie, McMahon, K., Adams, M.P., Samper-Villarreal, J., Collier, C., Lyons, M., Mumby, J.P., Radke, L., Christianen, M.J.A., y Adams, M. P. (2018). Seagrass ecosystem trajectory depends on the relative timescales of resistance, recovery and disturbance. *Marine Pollution Bulletin*, 134, 166-176. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.09.006

Renfro, B., y Chadwick, N. E. (2017). Benthic community structure on coral reefs exposed to intensive recreational snorkelling. *PloS one*, 12(9), e0184175.

doi: 10.1371/journal.pone.0184175

Roca, G., Alcoverro, T., Krause-Jensen, D., Balsby, T. J., van Katwijk, M. M., Marbà, N., Santos, R., Arthur, R., Mascaró, O., Fernández-Torquemada, Y., Pérez, M., Duarte, C.M., y Romero, J. (2016). Response of seagrass indicators to shifts in environmental stressors: A global review and management synthesis. *Ecological Indicators*, 63, 310-323. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.12.007

Romero-Sierra, P., Rivas, D., Almazán-Becerril, A.,y Hernández-Terrones, L. (2018). *Hydrochemistry and hydrodynamics of a Mexican Caribbean Lagoon: Nichupté Lagoon System. Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 215, 185-198.
doi: 10.1016/j.ecss.2018.10.012

Sánchez, A., Ortiz-Hernández, M.C., Talavera-Sáenz, A., y Aguíñiga-García, S. (2013). Stable nitrogen isotopes in the turtle grass Thalassia testudinum from the Mexican Caribbean: Implications of anthropogenic development. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 135, 86-93. doi: 10.1016/j.ecss.2013.01.021

Secretaria de Turismo (SEDETUR). (2018). *Indicadores turísticos*. Recuperado de https://www.qroo.gob.mx/sedetur/indicadores-turisticos.

Sima-Morales, A. L. (2004*). Hidrología y estado trófico de las lagunas costeras del Caribe mexicano: aporte de nutrientes de diferentes fuentes* (Tesis de Doctorado). CINVESTAV-IPN, Mérida, México.

Short, F.T., y Wyllie-Echeverria, S. (1996). Natural and human-induced disturbance of seagrasses. *Environmental Conservation*, 23(1), 17-27.
doi: 10.1017/S0376892900038212

Short, F. T., Short, C. A., y Novak, A. B. (2018). Seagrasses. En C.M. Finlayson, R. Milton, C. Prentice y N. C. Davidson (Eds.), *The Wetland Book: II: Distribution, Description, and Conservation* (pp. 74-90). Holanda: Springer.
doi: 10.1007/978-94-007-4001-3_262

Valdés-Lozano, D., Chumacero, y M., Real, E. (2006). Sediment oxygen consumption in a developed coastal lagoon of the Mexican Caribbean. *Indian Journal of Marine Sciences*, 35(3), 227-234.

Van Tussenbroek, B.I., Hermus, K.A., y Tahey, T. (1996). Biomass and Growth of the Turtle Grass Thallasia testudinum (Banks ex Koenig) in a Shallow Tropical Lagoon System, in Relation to Tourist Development. *Caribbean Journal of Science*, 32, 357-64.

Waycott, M., Duarte, C. M., Carruthers, T. J., Orth, R. J., Dennison, W. C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, Jr K.L., Randall-Hughes, R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Short, F.T., y Kendrick, G. A. (2009). Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12377-12381.

doi: 10.1073pnas.0905620106

Capítulo 2

ACUMULACIÓN DE FÓSFORO EN SEDIMENTOS DE LA ZONA LITORAL DEL LAGO TOCHAC, HIDALGO, MÉXICO

Agustín de Jesús Quiroz Flores[1*]

María Guadalupe Miranda Arce [2]

[1] Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F

[2] Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología. Apdo. Postal 55-535 C.P. 09640, México, D.F.

* ajquiroz@ib.unam.mx

Resumen

El lago Tochac en el estado de Hidalgo, es un cuerpo de agua que por su extensión se considera como un relicto importante del gran sistema de lagos que antiguamente existían en la Cuenca de México. Durante las últimas décadas diversos factores entre los que sobresalen las actividades antropogénicas, han promovido en el lago cambios significativos, sobresaliendo una contaminación difusa intermitente generada por la entrada de los lixiviados provenientes de las zonas de cultivo que rodean el lago. El presente estudio se condujo con el propósito de cuantificar el contenido de fósforo total y fósforo extractable en sedimentos de la zona litoral durante el periodo de lluvias. Se eligieron ocho estaciones de muestreo. La toma de muestras de sedimentos se efectuó durante la época de lluvias (agosto y octubre); la ubicación de los sitios de muestreo se determinó utilizando un GPS 12 marca Garmin. En cada estación, las muestras por triplicado se colectaron con la ayuda de una barrena para toma de núcleos inalterados hasta una profundidad de 20 centímetros. Los núcleos contenidos en tubos de PVC extraídos de la barrena, se depositaron en una hielera para ser transportados al laboratorio en un lapso de tiempo no mayor a 24 horas. Los resultados obtenidos muestran que los elevados contenidos de fósforo en los sedimentos de la zona litoral, nos sugieren de manera indirecta la eutrofización del lago Tochac.

Palabras clave: fósforo, sedimentos, eutrofización, Tochac, Hidalgo.

1. 1. Introducción

El fósforo, cuyo peso atómico es 30.974, es el décimo segundo elemento más abundante en la litósfera. En condiciones normales, el intemperismo actúa sobre las rocas de la superficie terrestre liberando el fósforo de los minerales primarios, el cual es depositado en la corteza terrestre en la forma de fosfatos de calcio denominados genéricamente como apatitas (Reddy y Delaune, 2008), como por ejemplo la hidroxiapatita, fluoroapatita y en menor proporción cloroapatita. El fósforo es retenido fuertemente en los suelos, debido a que los cationes más comunes del suelo forman junto con el fósforo, compuestos que generalmente son de baja solubilidad (Riuewerts, 2015). En suelos alcalinos, el fósforo se encuentra en forma de fosfato monocálcico, fosfato de calcio dibásico o hidroxiapatita y fosfato tricálcico o apatita; en suelos con tendencia a la acidez, forma fosfato de aluminio dihidratado o variscita y fosfato de hierro dihidratado o estrengita. En suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, el fósforo se presenta como fosfato monobásico o dibásico, que son las formas iónicas disponibles o asimilables para los productores primarios (algas e hidfrófitas), sin embargo, su concentración es baja, (Rieuwerts, 2015).

Cuando una sustancia rebasa los niveles considerados como normales en un organismo o en un ecosistema, se afirma que se ha contaminado, (Rieuwerts, 2015). La contaminación generalmente se ha asociado a la actividad humana, y dependiendo de la naturaleza del contaminante, se tendrá un mayor o menor impacto en alguno de los tres principales componentes de la biosfera (la atmósfera; la hidrósfera; el suelo). Rieuwerts (2015), propone que en los cuerpos de agua dulceacuícolas y marinos (hidrosfera), los principales contaminantes son: nutrientes (nitratos y fosfatos); substancias acidificantes; materia orgánica particulada; elementos traza tóxicos; contaminantes orgánicos refractarios; aceite crudo y petroquímicos; basura, con énfasis en el caso de los plásticos.

Entre las actividades antropogénicas que pueden alterar los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y fósforo, destaca la actividad agrícola (Smith, Tilman y Nekola, 1999; Atalay, 2001), debido a que es altamente dependiente del uso de fertilizantes, abonos, estiércoles y pesticidas organofosfatados, los cuales son utilizados con el objetivo de incrementar la productividad de los cultivos. En la hidrosfera, la contaminación ocurre cuando por efecto de la lluvia o presencia de un riego pesado, los fertilizantes hidrosolubles (nitrato de potasio) pueden ser lixiviados o bien ser transportados como partículas suspendidas (fosfato de calcio) y depositarse en cuerpos de agua dulce o agua marina, induciendo un acelerado crecimiento en las poblaciones de los productores primarios (algas e hidrófitas), dando origen al fenómeno de eutrofización.

En diversos estudios (Sas y Ahlgren, 1989; O'Hare et al., 2010; Quiroz, A., Ramírez-García y Lot, 2014), se señala que el fósforo es un factor clave en el fenómeno de eutrofización y que la liberación de este nutriente desde los sedimentos es un estudio obligado sobre todo en cuerpos de agua someros (Ingall y Jahnke, 1997). Autores como Clavero (Clavero et al., 1999), han estudiado el contenido de fósforo en el sedimento superficial y lo utilizan como un índice de eutrofización progresiva.

Autores como Faulkner (Faulkner y Richardson, 1989) y Reddy (Reddy et al., 1999), han descrito los mecanismos físicos y químicos de retención del fósforo en humedales artificiales y naturales, señalando que el fósforo puede ser retenido en forma de ortofosfatos en el sustrato vía adsorción y precipitación (Gras et al., 2003).

Para el caso de las comunidades de hidrófitas, la eutrofización induce un cambio en la composición florística debido a que las especies originales son reemplazadas por aquellas que se comportan como malezas al aumentar el contenido de nutrimentos en el medio ambiente (Doren et al., 1996; Quiroz, A., Ramírez-García y Lot, 2014).

El lago Tochac es un relicto relativamente conservado del gran sistema de lagos que existían antiguamente en la Cuenca de México (Legorreta, 2009). Junto con el lago de Tecocomulco, representan los últimos cuerpos de agua de la Cuenca que se mantienen de manera natural, gracias a la lluvia y a los afluentes que sobre todo durante la época de lluvias derraman su caudal al interior de ambos lagos, (Lot, 2005).

Actualmente, alrededor del lago Tochac, los terrenos se destinan al cultivo de maíz, cebada, haba y frijol (Legorreta, 2009). Algunos agricultores con el objetivo de ganarle terreno al lago, han construido en las riberas, bordos de hasta tres metros de alto, lo que genera que el nivel de la columna de agua en las zonas litorales ubicadas al Este y Oeste cambie drásticamente a lo largo del año. Por otra parte, en el poblado de Lázaro Cárdenas cercano al lago, existe una cooperativa pesquera que captura carpa (*Cyprinus carpio*) con red agallera durante la temporada aprobada por las autoridades de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA); como complemento de las actividades socioeconómicas, algunos pescadores después de revisar sus redes y colectar los individuos capturados durante la mañana, por la tarde, sacan de los corrales su ganado vacuno y lanar, para pastorear las gramíneas y plantas acuáticas que crecen en la ribera del lago, propiciando con esta actividad el fenómeno de azolvamiento, así como una contaminación difusa intermitente por la entrada de los lixiviados del estiércol que es depositado a la orilla del lago (Collins y McGonigle, 2008). Por lo tanto, es de suma importancia tomar en cuenta la transferencia del fósforo desde las tierras de cultivo hacia el lago, así como los procesos biogeoquímicos que regulan la acumulación y retención de fósforo en la zona litoral del lago Tochac.

El objetivo de este estudio, es cuantificar el contenido de fósforo total y fósforo extractable de los sedimentos en la zona litoral durante la estación de lluvias, para así examinar el papel que tiene la contaminación difusa intermitente por la entrada de los lixiviados y la escorrentía superficial proveniente de las zonas de cultivo que rodean al lago.

2. Material y métodos

2.1 Área de estudio.

El lago Tochac se localiza en la parte sur del municipio de Apan, en el estado de Hidalgo, México (Fig. 1). Entre los 19°32'50 " de latitud Norte y 98°12'10 " de longitud Oeste, a una altitud de 2,480 msnm. Tiene una forma alargada con una extensión aproximada que varía de dos mil hectáreas en lluvias a mil en secas, se forma con diversos afluentes de los ríos Rosario, Chimalpa y Masapa, además por pequeñas lagunas como Palo Dulce, Metlapil, El Águila, Zoquiapilla, Guadalupe, El Gigante y la Presa (Legorreta, 2009); con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Temperatura media anual de 10 a 16 °C y una precipitación total anual de 500 a 800 mm (INEGI, 2009). Las topoformas que rodean el área de estudio son el cerro de Zotoluca y Tompeatillo (Legorreta, 2009). Las rocas ígneas extrusivas del periodo Neógeno y Cuaternario son de tipo toba ácida, basalto, andesita, brecha volcánica básica, riolita y riodacita. En la zona, dominan cinco tipos de suelos: Feozem, Vertisol, Leptosol, Durisol y Umbrisol (INEGI, 2009). La vegetación acuática estricta presente en el lago, se establece principalmente en la zona litoral, sobre todo durante la época de secas en la parte Este y Oeste de la laguna, y está representada por seis familias y las siguientes especies: Eleocharis macrostachya, Hydrocotyle ranunculoides, Lemna gibba, Lilaeopsis schaffneriana, Ludwigia peploides, Marsilea ancylopoda, Nymphoides fallax, Schoenoplectus americanus (Quiroz-Flores et al., 2018).

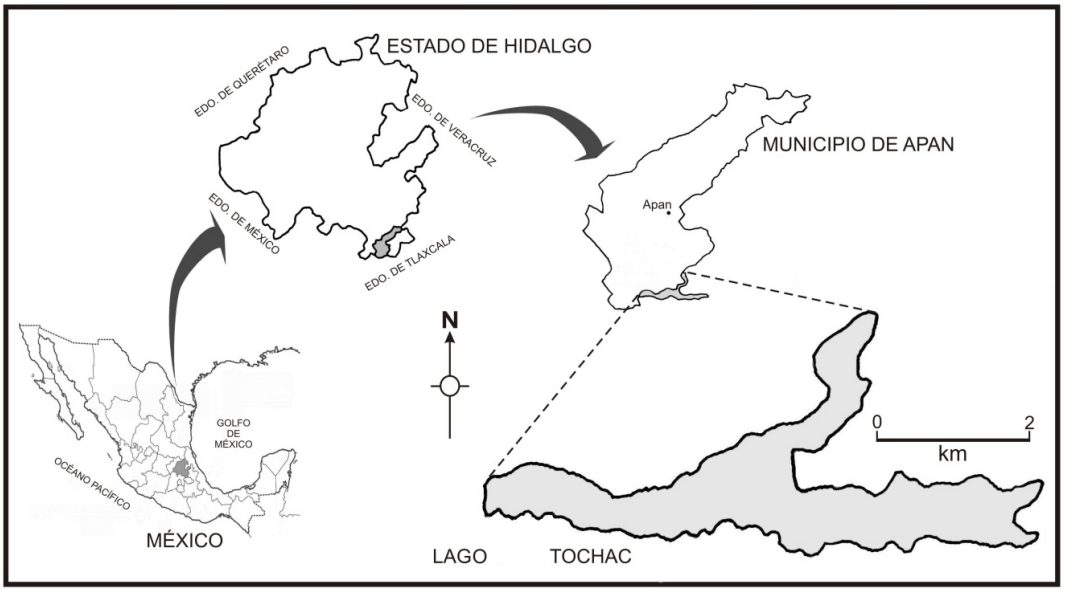


Fig. 1. Lago Tochac en el Estado de Hidalgo.

2.2 Sedimentos.

Se eligieron ocho estaciones de muestreo en la zona litoral del lago Tochac, cuatro en el sector Oeste y cuatro en el sector Este; la toma de muestras de sedimentos se efectuó durante la época de lluvias (agosto y octubre de 2015). La ubicación de los sitios de muestreo se determinó utilizando un GPS 12 marca Garmin. En cada estación, las muestras por triplicado (Doren et al., 1996) se colectaron con la ayuda de una barrena para toma de núcleos inalterados hasta una profundidad de 20 centímetros, (Richardson et al., 1978). Los núcleos contenidos en tubos de PVC extraídos de la barrena, se depositaron en una hielera para ser transportados al laboratorio en un lapso de tiempo no mayor a 24 horas.

Una vez en el laboratorio, las muestras se secaron a 70 °C durante 48 horas (Doren et al., 1996), se molieron y tamizaron a través de una malla de 2 mm de abertura (Richardson et al., 1978) y se les practicaron los siguientes análisis: fósforo total por el método de digestión por vía húmeda (O'Halloran y Cade-Menun, 2008) con un bloque digestor marca Tecator modelo 1007 y cuantificación colorimétrica por la técnica del ácido ascórbico; fósforo extractable por el método de Mehlich-3 y cuantificación colorimétrica por la técnica del ácido ascórbico (Mehlich, 1984).

2.3 Análisis estadísticos.

A los resultados obtenidos de los análisis de fósforo total y fósforo extractable, se les aplicó un análisis estadístico ANOVA de Kruskal Wallis para observar las diferencias significativas entre los sedimentos de la zona litoral colectados en el sector Este y el sector Oeste del lago Tochac. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa Statistica 7.0. (NCSS, 2004)

3. Resultados

En la tabla 1, se muestran los valores promedio e intervalo del fósforo total y fósforo extractable de los sedimentos analizados en este estudio. El lago Tochac tuvo un promedio de fósforo total en la zona Oeste de 0.0982%, con un máximo de 0.2070% y un mínimo de 0.0077%. En la zona Este tuvo un promedio de 0.0966%, con un máximo de 0.1730% y un mínimo de 0.0246%. Se determinó que no existen diferencias significativas del contenido de fósforo total de los sedimentos superficiales en la zona litoral Oeste y Este del lago Tochac ($H (1;48) = 0.04$; $P = 0.8366$.

El lago Tochac tuvo un promedio de ortofosfato extractable en la zona Oeste de 195.9 mg/Kg, con un máximo de 315.4 mg/Kg y un mínimo de 115.4 mg/Kg. En la zona Este tuvo un promedio de 181.1 mg/Kg, con un máximo de 325.4 mg/Kg y un mínimo de 102 mg/Kg. Se determinó que no existen diferencias significativas del contenido de fósforo extractable de los sedimentos superficiales en la zona litoral Oeste y Este del lago Tochac ($H (1;48) = 1.43$; $P = 0.2317$

Tabla 1. Promedio ± desviación estándar, e intervalo de los parámetros analizados en las muestras de sedimento.

Lago	Sitio	Fósforo total %	Fósforo extractable
Tochac	Oeste	0.0982 ± 0.049	195.9 ± 50.7
		0.0077 – 0.2070	115.4 – 315.4
	Este	0.0966 ± 0.038	181.1 ± 55.0
		0.0246 – 0.1730	102.0 – 325.4

4. Discusión

Los valores de fósforo total y fósforo extractable en los sedimentos son altos si los comparamos con otros estudios similares (Doren et al., 1996; Clavero et al., 1999) y de acuerdo al criterio de Malstrom citado por Richardson (Richardson et al., 1978), el nivel de fósforo total en los sedimentos está por arriba (≥ 0.04%) de la cantidad necesaria para sostener la producción vegetal. Sin embargo, si los comparamos con los datos que han sido reportados por Hernández (Hernández et al., 2007) para la cantera oriente de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM (> 0.2 % fósforo total) y por Quiroz (datos no publicados) para el lago de Tecocomulco en zonas litorales con vegetación acuática (0.2395 % fósforo total y 308.8 mg/Kg fósforo extractable), los valores son menores. Suponemos que la diferencia se debe a que tanto en la cantera oriente como en el lago de Tecocomulco existe una mayor extensión y diversidad de hidrófitas (Lot, 2005), las cuales al aportar materia orgánica fácilmente biodegradable, contribuye a la acumulación de fósforo en los sedimentos, (Xie, Yu y Ren, 2004; Wang et al., 2012; Quiroz-Flores et al., 2018).

No existen diferencias significativas entre los sitios de muestreo ubicados en la zona litoral Este y Oeste del lago, lo que nos permite suponer que debido a la ausencia de hidrófitas y de especies leñosas que toleran la inundación o manto freático superficial, no se disminuye la velocidad de las escorrentías superficiales provenientes de las zonas agrícolas que rodean a la laguna las cuales se caracterizan por sus elevados contenidos de fertilizantes fosfatados; tal escenario facilita que los sólidos suspendidos ricos en fósforo sean depositados sobre todo en el sedimento de la zona litoral (Cronk y Siobhan, 2001). De acuerdo a Reddy (2008), las zonas inundables y los humedales con presencia de vegetación acuática, pueden servir como sumideros de nutrientes minerales, debido a que las hidrófitas pueden obtener (absorber) el fósforo de los sedimentos `y de la columna de agua, tal posibilidad para el caso del lago Tochac mitigaría la entrada de fósforo al sistema lagunar. Así mismo, las comunidades de hidrófitas una vez concluido el ciclo vital del órgano (hojas) o del organismo vegetal, aportaran materia orgánica a los sedimentos anaeróbicos, tal condición físico química del sedimento facilitará la acumulación temporal del fósforo ya que la mineralización de la materia orgánica en un medio anaerobio es muy lenta (Kirk, 2004).

En el lago Tochac, las plantas acuáticas con formas de vida enraizada emergente y de hojas flotantes espontáneamente se establecen durante la época de secas en los sectores Oeste y Este de la zona litoral. Sin embargo, durante la estación de lluvias desaparecen en un lapso de dos meses debido a que el nivel de la columna de agua se eleva hasta dos metros de altura en un plazo de tiempo muy corto (Quiroz-Flores et al., 2018). La situación anterior propicia que solamente las

comunidades con forma de vida libre flotadora sobrevivan al interior de los canales y que en la zona abierta de la laguna permanezca exclusivamente el tular de Schoenoplectus americanus en forma de pequeños manchones aislados, los cuales ocupan áreas no mayores a dos metros cuadrados. En el resto de la zona ribereña en donde no hay presencia de bordos, durante todo el año los agricultores y los pescadores continuamente se encargan de eliminar manualmente a las plantas acuáticas que se establecen en las orillas del lago.

5. Conclusiones

Los contenidos de fósforo en los sedimentos de la zona litoral Este y Oeste, no muestran diferencias significativas, lo que permite suponer que la ausencia de hidrófitas con forma de vida enraizada emergente o de hojas flotantes, así como de especies leñosas que forman los llamados bosques de galería como el ahuehuete (Taxodium mucronatum), el ahuejote (Salix bonplandiana) o el sauce (Salix babylonica), contribuye a que la escorrentía superficial provenientes de las tierras de cultivo junto con los lixiviados intermitentes, eleven los niveles de fósforo que están siendo descargados en el lago, ya que como lo señala Reddy (2005), la descarga de fósforo que recibe el sistema acuático depende de la capacidad de retención de los componentes paisajísticos de la cuenca.

Los elevados contenidos de fósforo en los sedimentos de la zona litoral, nos sugieren de manera indirecta la eutrofización del lago de Tochac (Clavero et al., 1999).

Es necesario mitigar el proceso de eutrofización generado por los fertilizantes utilizados en los cultivos agrícolas que rodean la ribera del lago de Tochac, una alternativa sería el permitir que especies de hidrófitas como Hydrocotyle ranunculoides, Lemna gibba, Ludwigia peploides ,Nymphoides fallax y Schoenoplectus americanus, se establezcan espontáneamente de forma permanente durante la época de secas en los canales del sector Oeste y Este del lago, y que durante la época de lluvias que es cuando se eleva drásticamente la columna de agua y se induce la desaparición de las formas de vida enraizada emergente y de hoja flotantes, se aproveche la comunidad de Lemnáceas (L. gibba), que es la única forma de vida que sobrevive en tal condición, cosechándola cada 25 días para ser utilizada como abono verde para los campos de cultivo. En el resto de la zona ribereña, en donde la fluctuación en la elevación de la columna de agua no es tan drástica, los agricultores y pescadores deben permitir que las comunidades de hidrófitas con forma de vida enraizada emergente y de hojas flotantes que se establecen espontáneamente de acuerdo al gradiente de humedad de la zona litoral, permanezcan durante todo el año, situación que actualmente no prospera debido a que los pobladores de la región continuamente eliminan a las comunidades de hidrófitas.

Considerando la lista de especies de plantas acuáticas reportadas para la zona y de acuerdo al gradiente de humedad de la zona litoral, la hidroserie o sucesión de comunidades de hidrófitas que deberían permanecer en la zona litoral durante todo el año es la siguiente: Hydrocotyle ranunculoides, Ludwigia peploides, Nymphoides fallax, y Schoenoplectus americanus. Las cuatro especies sugeridas, se caracterizan por tener la capacidad de contener elevadas concentraciones de fosforo (1-5 g kg-1), y además las hojas de Nymphoides fallax, son ramoneadas (consumidas) por el ganado vacuno (observación de campo que los autores presenciaron durante sus investigaciones llevadas a cabo en el lago de Tecocomulco, estado de Hidalgo, y en el lago de Atlangatepec estado de Tlaxcala, México).

Agradecimientos

Los autores agradecen a Felipe Villanueva quien preparó la Figura 1 y a Erick de Jesús Quiroz Miranda por la traducción del inglés al español de los textos consultados en las citas originales.

6. Referencias

Atalay, A. (2001) 'Variation in Phosphorus Sorption with Soil Particle Size', Soil and Sediment Contamination, 10(3), pp. 317–335.

Clavero, V., Izquierdo, J. J., Palomo, L., Fernández, J. A. and Niell, F. X. (1999) 'Water management and climate changes increases the phosphorus accumulation in the small shallow estuary of the Palmones River (southern Spain)', Science of the Total Environment, 228(2–3), pp. 193–202. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00045-5.

Collins, A. L. and McGonigle, D. F. (2008) 'Monitoring and modeling diffuse pollution from agriculture for policy support: UK and European experience.', Environmental Science and Policy, 11, pp. 97–101.

Cronk, J. K. and Siobhan, M. (2001) Wetland Plants, Biology and Ecology. USA: Lewis Publishers.

Doren, R., Armentano, T., Whiteaker, L. and Jones, R. (1996) 'Marsh vegetation patterns and soil phosphorus gradients in the Everglades ecosystem', Aquatic Borany, 56, pp. 145–163.

Faulkner, S. and Richardson, C. (1989) Physical and chemical characteristics of freshwater wetland soils. Tennessee: Lewis Pjublishers.

Gras, A., Koch, Marguerite and Madden, C. (2003) 'Phosphorus uptake kinetics of a dominant tropical seagrass Thalassia testudinum', Aquatic Botany, 76, pp. 299–315.

Hernández, O., Quiroz, A., Ramírez-García, P. and Lot, A. (2007) 'Paisaje lacustre: ecología de la vegetación acuática.', en Lot, A. (ed.) Guía ilustrada de la Cantera Oriente: caracterización ambiental e inventario biológico. Mexico: Coordinación de la Investigación Científica, Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM., pp. 45–59.

INEGI (2009) Prontuario de Información geográfica municipa de los Estados Unidos Mexicanos. Apan, Hidalgo.

Ingall, E. and Jahnke, R. (1997) 'Influence of water-column anoxia on the elemental fractionation of carbon and phosphorus during sediment diagenesis', Marine Geology, 139(1–4), pp. 219–229. doi: 10.1016/S0025-3227(96)00112-0.

Kirk, G. (2004) The Biogeochemistry of Submerged Soils. New York, NY: John Wiley & Sons.

Legorreta, J. (2009) Ríos, lagos y manantiales del Valle de México. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco.

Lot, A. (2005) 'Vegetación Acuática de la Laguna de Tecocomulco', en Huízar, R., Jiménez, E., and Juárez, C. (eds) La Laguna de Tecocomulco, Geo-Ecología de un Desastre. México: Instituto de Geología, UNAM, pp. 141–147.

Mehlich, A. (1984) 'Mehlich 3 soil test extractant: A modification of Mehlich 2 extractant', Communications in Soil Science and Plant Analysis, 15(12), pp. 1409–1416. doi: 10.1080/00103628409367568.

NCSS (2004) 'Statistical Software'.

O'Halloran, I. P. and Cade-Menun, B. J. (2008) 'Total and Organic Phosphorus', in Carter, M. R. and Gregorich, E. G. (eds) Soil Sampling and Methods of Analysis. Second Edi. Boca Raton, Fla. U.S.A.: CRC Press, pp. 271–273.

O'Hare, M., Clarke, R., Bowes, M., Cailes, C., Henville, P., Bissett, N., McGahey, C. and Neal, M. (2010) 'Eutrophication impacts on a river macrophyte', Aquatic Borany, 92, pp. 173–178.

Quiroz-Flores, A., Miranda-Arce, M., Ramírez-García Armora, P. and Lot-Helgueras, A. (2018) 'Acumulación de fósforo en sedimentos por comunidades de hidrófitas en el lago Tochac, Hidalgo, México', Polibotánica, 46, pp. 233–240.

Quiroz, A., Ramírez-García, P. and Lot, A. (2014) 'Variación anual de la biomasa de Nymphoides fallax Ornduff en la laguna de Tecocomulco, Hidalgo, México.', Polibotánica, 37, pp. 93–108.

Reddy, K. R., Kadlec, R. H., Flaig, E. and Gale, P. M. (1999) 'Phosphorus Retention in Streams and Wetlands: A Review', Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 29(1), pp. 83–146. doi: 10.1080/10643389991259182.

Reddy, R. and Delaune, R. (2008) Biogeochemistry of Wetlands. Boca Raton, Fla. U.S.A.: CRC Press.

Richardson, C. J., Tilton, D. L., Kadlec, J. A., Chamie, J. P. and Wentz, W. A. (1978) 'Nutrient Dynamics of Northern Wetland Ecosystem.', in Good, R. E., Whigham, D. F., and Simpson, R. L. (eds) Freshwater Wetlands, ecological processes and management potential. New York: Academic Press,Inc., pp. 217–241.

Rieuwerts, J. (2015) The Elements of Environmental Pollution. New York: Routlegde.

Riuewerts, J. (2015) The Elements of Environmental Pollution. New York: Routledge.

Sas, H. and Ahlgren, I. (1989) Lake restoration by reduction of nutrient loading: expectations, experiences, extrapolations. 6a ed. Sankt Augustin: Academia Verlag Richarz.

Smith, V., Tilman, G. and Nekola, J. (1999) 'Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems', Environmental Pollution, 100, pp. 179–196.

Wang, L., Wang, G., Xuguang, G., Yu, Z., Gu, X., Cheng, Z., Xu, W. and Zhang, F. (2012) 'Influence of Submerged Plants on Phosphorus Fractions and Profiles of Sediments in Guchenh Lake', Soil and Sediment Contamination, 21, pp. 640–645.

Xie, Y., Yu, D. and Ren, B. (2004) 'Effects of nitrogen and phosphorus availability on the decomposition of aquatic plants', Aquatic Botany, 80, pp. 29–37.

Capítulo 3

RESPUESTAS DE LOS OCTOCORALES ANTE LA EUTROFIZACIÓN DE LAS ZONAS MARINO-COSTERAS: REVISIÓN Y SÍNTESIS

Néstor Rey-Villiers[1*]

Alberto Sánchez[1]

Patricia González-Díaz[2]

[1] Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN S/N, Col. Playa Palo de Sta. Rita, Apdo. Postal #592, 23096, La Paz, Baja California Sur, México.

[2] Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, calle 16 No. 114, Playa, CP 11300, La Habana, Cuba.

* nestorrvilliers@gmail.com

Resumen

Los octocorales son cnidarios bentónicos que tienen una importancia estructural y funcional en los arrecifes coralinos, y por ser sésiles, no pueden emigrar de los arrecifes eutrofizados, por lo que reflejan las condiciones ambientales que han existido durante su desarrollo. Este trabajo sintetiza las respuestas de los octocorales en el nivel de comunidad, población e individuo ante la eutrofización de las zonas marino-costeras. Las descargas de cuencas fluviales contaminadas deterioran la calidad del agua y provocan eutrofización en muchos arrecifes, lo que disminuye la abundancia, cobertura, riqueza y diversidad de octocorales, y cambia la composición cuantitativa (%) de sus asociaciones. En arrecifes cercanos a cuencas fluviales contaminadas aumenta la abundancia relativa (%) de octocorales tolerantes a la contaminación, mientras que en arrecifes alejados se incrementa el de otras especies que no toleran ese factor. En el nivel de población, la eutrofización disminuye la densidad y cobertura de diferentes especies, y también tiene un efecto negativo en distintos indicadores morfométricos. Sin embargo, los resultados de varias investigaciones evidencian que la tasa de crecimiento de los octocorales aumenta con un mayor aporte de materia orgánica, microorganismos y nutrientes proporcionados por las descargas de cuencas fluviales, difusores submarinos y escurrimientos terrestres. En el nivel de individuo, se afecta la fisiología de las colonias, ya que adquieren una pigmentación parda muy oscura por el incremento en la densidad de las zooxantelas, y aumenta el $\delta^{15}N$ en el tejido y eje de varios octocorales como consecuencia del aporte de aguas residuales.

Palabras claves: octocorales, $\delta^{15}N$, eutrofización, actividades antropogénicas.

1. Introducción

Los octocorales son cnidarios bentónicos sésiles exclusivamente marinos que habitan desde el Ártico a la Antártica y desde la zona intermareal hasta la abisal (hasta 6000 m de profundidad) (Bayer, 1961; Cairns y Bayer, 2009; Fabricius, 2011a). Estos cnidarios son uno de los organismos bentónicos con mayor abundancia y biomasa en las plataformas marinas, y constituyen el segundo grupo más común de los animales macrobentónicos sésiles en los arrecifes coralinos en el Mar Caribe y en el Indo-Pacífico (Humann, 1993; Fabricius, 2011a).

Los octocorales son conocidos comúnmente como gorgonias y corales blandos, y pertenecen al Phylum Cnidaria, Clase Anthozoa y Subclase Octocorallia. Son organismos coloniales que crecen a partir de la replicación iterativa de sus ramas y pólipos (Lasker y Sánchez, 2002). Estos cnidarios tienen una importancia estructural y funcional en los arrecifes de coral, ya que aportan carbonato de calcio en forma de espículas calcáreas (una tonelada/año de caliza por 4047 m^2) (Bayer, 1961; Opresko, 1973), contribuyen a la complejidad del hábitat y biomasa de los arrecifes (Glynn y Enochs, 2011), proporcionan refugio, alimento y sustrato a invertebrados y peces (Lasker y Coffroth, 1988; Glynn y Enochs, 2011), y pueden participar en la transferencia de energía entre las comunidades planctónicas y bentónicas (Risk et al., 2002; Orejas et al., 2003).

La eutrofización en las zonas marino-costeras y el incremento de la sedimentación han degradado severamente muchos arrecifes de coral en el mundo (Fabricius, 2005; Fabricius, 2011b), y hasta un 64% de estos ecosistemas se encuentran amenazados por las actividades antropogénicas (Wilkinson y Souter, 2008). En la actualidad, el 45% de la población humana vive en áreas costeras con un crecimiento acelerado a lo largo de las costas y una intensificación de la explotación de los recursos costeros (Crossland et al., 2005). Esto ha provocado que los ecosistemas marino-costeros, incluyendo los arrecifes coralinos, reciban un incremento de fertilizantes y pesticidas (Smith et al., 2003), y un aumento en la concentración de nutrientes, sedimentos, materia orgánica y descargas de otros contaminantes (Fabricius, 2005). Muchos taxa de octocorales se han considerado sensibles a la eutrofización, la turbidez y la sedimentación (Fabricius, 2011a). Estos organismos, por ser sésiles, no pueden emigrar de las áreas contaminadas, y responden de manera integrada a lo largo del tiempo a las condiciones ambientales que han existido durante su desarrollo en diferentes niveles de organización biológica. En este trabajo se sintetiza la información que existe en la literatura sobre las respuestas de los octocorales en el nivel de comunidad, población e individuo ante la eutrofización de las zonas marino-costeras como consecuencia de las actividades antropogénicas en diferentes regiones del mundo.

1.1 Eutrofización de las zonas marino-costeras

¿Qué se entiende por eutrofización?

La eutrofización es un proceso ecológico que ocurre cuando se incrementan las concentraciones de los nutrientes en un cuerpo de agua (EPA, 2001; Fabricius, 2011b), y aumenta de manera desproporcionada la materia orgánica (por ejemplo: enriquecimiento de carbono orgánico, Szmant y Forrester, 1996). Este enriquecimiento de nutrientes y materia orgánica estimula la producción primaria (crecimiento acelerado de fitoplancton y algas) y se deteriora la calidad del agua pudiendo llegar a ocurrir condiciones de hipoxia y anoxia. De manera general, este proceso es inducido por actividades antropogénicas (por ejemplo: descargas de aguas residuales), cuyas consecuencias son el enriquecimiento de nutrientes en las aguas superficiales y el incremento de la sedimentación, pero también puede ocurrir de manera natural cuando la sedimentación aumenta los niveles de nutrientes y disminuye la profundidad en un cuerpo de agua (EPA, 2001).

1.2 Respuestas de los octocorales ante la eutrofización de las zonas marino-costeras como consecuencia de las actividades antropogénicas

1.2.1 En el nivel de comunidad

La principal fuente de entrada de nutrientes a los ecosistemas marino-costeros son los ríos (Fabricius, 2011b). Existen diferentes trabajos que han mostrado que las descargas de las cuencas fluviales contaminadas afectan las asociaciones de octocorales (Tabla 1). En Hong Kong, la abundancia y distribución de los octocorales están relacionados con el movimiento del agua, la salinidad, la turbidez, los nutrientes, las variables microbiológicas y los sedimentos suspendidos en un gradiente de calidad del agua generado por el río Pearl (Yeung et al., 2014). Estos autores encontraron que el aumento en la salinidad y la reducción en las concentraciones de los nutrientes pueden explicar el incremento en la riqueza de especies de octocorales al alejarse de la influencia del río Pearl.

La turbidez influye en la composición y la riqueza de especies de octocorales en la Gran Barrera de Coral de Australia (Fabricius y De´ath, 2001; De´ath y Fabricius, 2010) y en Hong Kong (Tabla 1) (Fabricius y McCorry, 2006; Yeung et al., 2014). Los géneros *Xenia*, *Nephthea*, *Lemnalia* y *Tubipora* son abundantes en aguas claras (Fabricius y Alderslade, 2001), y son afectados por la turbidez (Fabricius y Alderslade, 2001; Fabricius y McCorry, 2006). Según Fabricius y McCorry (2006) las asociaciones de octocorales en Hong Kong están compuestas principalmente por especies azooxanteladas, y su riqueza de especies aumenta con la profundidad, y en sitios con moderada y elevada sedimentación.

En la región noroccidental de Cuba (Mar Caribe), la Bahía de La Habana y los ríos Quibú, Almendares y Cojímar vierten a los ecosistemas marinos costeros una gran cantidad de contaminantes. La Bahía de La Habana ha sido considerada un ecosistema eutrofizado y fuertemente contaminado por hidrocarburos, metales pesados y pesticidas (Armenteros et al., 2009). La desembocadura del río Almendares está eutrofizada y presenta residuales industriales tóxicos (Olivares-

Rieumont et al., 2005) y la del río Quibú está eutrofizada como consecuencia de la elevada contaminación por materia orgánica y nutrientes (Cano, 2008).

Las descargas de esas cuencas fluviales en el litoral de La Habana afectan la densidad (colonias/m^2) de los octocorales como mínimo desde hace dos décadas, cuando se iniciaron las investigaciones en el tema (Tabla 1) (Herrera y Alcolado, 1986; Guardia y González-Sansón, 2000; Rey-Villiers, 2009; González-Díaz et al., 2018). Existen trabajos que documentan que la densidad de los octocorales aumenta con la distancia a dichas cuencas (Tabla 1) (González-Díaz et al., 2003; Rey-Villiers, 2009). Por ejemplo, la contaminación proveniente de la Bahía de La Habana y el río Almendares provocan que la densidad de octocorales en los arrecifes cercanos sea baja (menor que 1 colonias/m^2) a 10 m de profundidad, en comparación con los arrecifes Playa del Salado (30 Km al oeste de la bahía) y Boca de Calderas (35 Km al este de la bahía) (Tabla 1). A una mayor escala espacial (a nivel de Cuba), González-Díaz et al. (2018) encontraron la menor densidad de octocorales (0.1 colonias/m^2) en los arrecifes del litoral de La Habana, cercanos a áreas muy urbanizadas, en comparación con arrecifes alejados a la costa como Jardines de la Reina (12.4 colonias/m^2).

Existen varias investigaciones que evidencian que la composición cuantitativa (%), riqueza y diversidad de octocorales, también son afectadas por la contaminación de esas cuencas fluviales (Tabla 1) (Herrera y Alcolado, 1983; Herrera, 1990; Guardia et al., 2001; Rey-Villiers, 2009). Al oeste de la Bahía de La Habana, la turbidez, la sedimentación, la presencia de sustancias tóxicas o de bacterias patógenas son factores que parecen influir de forma selectiva en las especies que componen las asociaciones de octocorales (Tabla 1) (Herrera y Alcolado, 1983). Las especies *Plexaura kuekenthali, Eunicea flexuosa*, *Eunicea calyculata* forma *coronata, Eunicea calyculata* forma *typica, Eunicea tourneforti*, *Pseudoplexaura flagellosa*, *Eunicea mammosa*, *Pterogorgia citrina*, *Pterogorgia guadalupensis*, *Pterogorgia anceps*, y *Muricea muricata*, presentan una mayor abundancia relativa (%), en diferentes combinaciones, en los arrecifes aledaños a la Bahía de La Habana y los ríos Almendares, Quibú y Cojímar, mientras que en los arrecifes alejados a esas cuencas la composición cuantitativa de los octocorales cambia hacia otras especies (Tabla 1). En correspondencia con esto, existen tres grupos de especies de octocorales con diferente tolerancia a la contaminación: en primer lugar, están *P. kuekenthali, E. flexuosa* y *P. flagellosa*; en segundo, *E. tourneforti* y *E. calyculata* forma *typica*; y en tercero, *E. calyculata* forma *coronata* (Herrera y Alcolado, 1983). Además de estas 6 especies, Herrera (1990) adiciona a *E. mammosa* como tolerante a la contaminación orgánica; y Rey-Villiers (2009) propone a *P. citrina*.

Por otra parte, *Gorgonia ventalina*, *Gorgonia mariae*, *Antillogorgia elisabethae* y *A. rigida* se han considerado sensibles a la contaminación (Herrera y Alcolado, 1983), y *Briareum asbestinum* y *Eunicea clavigera* como poco resistentes a ese factor (Hernández-Muñoz et al., 2008). Según Herrera (1990) la abundancia

relativa de *Antillogorgia americana*, *Plexaurella dichotoma*, *M. muricata*, *G. ventalina*, *Muriceopsis flavida* y *Muricea pinnata* varía entre muy alto y moderado en ambientes limpios y disminuyen en los arrecifes contaminados, mientras que las especies *A. elisabethae*, *A. rigida*, *E. clavigera*, *Muriceopsis petila*, *Plexaura homomalla*, *B. asbestinum*, *Antillogorgia crucis* y *Gorgonia flabellum* están ausentes en los ambientes contaminados.

La riqueza de especies de octocorales en los arrecifes al oeste de la Bahía de La Habana presentó una disminución de 12 especies tanto a 10 y 15 m de profundidad en comparación con los arrecifes al oeste de la Bahía de Mariel (considerada como referencia) (Tabla 1) (Herrera y Alcolado, 1986). En la región noroccidental de Cuba, la diversidad de los octocorales es menor en los arrecifes que están afectados por la contaminación de los ríos Quibú, Almendares, Cojímar, la Bahía de La Habana y los vertimientos albañales de Playa del Chivo y Habana del Este en comparación con los arrecifes alejados a esas fuentes (Herrera, 1990). Estos autores señalaron que la riqueza de especies de octocorales varía entre 9 y 13 especies en arrecifes cercanos a esas fuentes, mientras que en arrecifes de referencia la riqueza de especies fluctúa de 17 a 24.

En un estudio de caso sobre los efectos de un difusor submarino en el litoral de La Habana en las asociaciones de octocorales, Hernández-Muñoz et al. (2008) detectaron que después de que comenzó a funcionar este difusor el predominio de *P. kuekenthali* a 10 m de profundidad pasó a una codominancia entre especies consideradas como resistentes (*P. kuekenthali* y *E. calyculata* forma *typica*) y no resistentes a la contaminación (*E. clavigera* y *B. asbestinum*); y una disminución en la abundancia relativa de especies resistentes a la contaminación como *E. mammosa*, *E. calyculata* forma *typica* y *E. tourneforti*, lo cual sugiere que las condiciones ambientales mejoraron en esa profundidad. Sin embargo, a 20 m de profundidad, donde están más cercanas las descargas del difusor ocurre lo contrario, ya que la diversidad de octocorales ha disminuido, la abundancia relativa de *P. kuekenthali* y *E. calyculata* forma *typica* han aumentado, y ha disminuido el de *E. clavigera* (Hernández-Muñoz et al., 2008), a pesar de existir intercambio con aguas oceánicas.

La contaminación de la Bahía de La Habana también afecta la altura de los octocorales en el nivel de comunidad (Guardia y González-Sansón, 2000). Estos autores encontraron que la altura media de los octocorales fue menor (27.5 cm) en los arrecifes cercanos al oeste de la bahía en comparación con un arrecife menos impactado (Calle 30, Reparto Miramar, altura media de los octocorales de 38.7 cm). Estos resultados coincidieron con las observaciones de Herrera y Alcolado (1983) quienes señalaron que el tamaño de las colonias al oeste de la Bahía de La Habana fue más pequeño que en sitios menos impactados.

1.2.2 En el nivel de población

Uno de los principales efectos adversos de la eutrofización en las poblaciones de los octocorales es la disminución en la abundancia (colonias/m^2) de sus especies. De 17 especies que conformaron más del 90% las asociaciones de octocorales en el litoral de La Habana, la abundancia de 14 especies, durante 7 años, fue menor en el arrecife cercano (PAM) a la Bahía de La Habana, en comparación con los arrecifes de Playa del Salado (Sa) y Boca de Calderas (Ca) localizados aproximadamente entre 30 Km y 35 Km al oeste y este de esa bahía, respectivamente (Tabla 2). La cobertura de los octocorales también se afecta con la eutrofización (Fabricius y McCorry, 2006; Parsons et al., 2008). Según Parsons et al. (2008) la cobertura del octocoral *Anthelia edmondsoni*, en Hawai, se correlacionó de manera negativa con la concentración de amonio, silicatos y con el $\delta^{15}N$ en las algas, lo que sugiere que las fuentes de nitrógeno terrestres constituyen un estrés para los octocorales.

Tabla 1. Evaluaciones ecológicas que documentan los efectos de diferentes fuentes de contaminación en las asociaciones de octocorales. GBA: Gran Barrera Australiana, RNC: Región Noroccidental de Cuba, PAM: Parque Antonio Maceo y Pu: La Puntilla.

Localidades	Fuentes de contaminación	Respuestas	Referencias
Hong Kong	Descargas del río Pearl, eutrofización y turbidez	-Disminuye cobertura, abundancia y riqueza de especies -Desaparecen los géneros *Xenia*, *Nephthea*, *Lemnalia* y *Tubipora*. -Sólo 6 especies zooxanteladas de las 42 reportadas	Fabricius y McCorry (2006)
Hong Kong	Bahías eutrofizadas y turbias	-En las bahías: no se observaron octocorales -Exterior de las bahías: la riqueza aumentó entre 10 y 14 especies. -Sitios expuestos al océano: aumentó la riqueza de especies.	Yeung et al. (2014)
GBA	Turbidez	-Disminuye la riqueza de octocorales zooxantelados	Fabricius y De´ath (2001); Fabricius et al. (2005)
GBA	Turbidez	-Disminuye 1 género por metro de reducción en la visibilidad	Fabricius y De´ath (2001)
GBA	Aumento de la turbidez	-Desaparecen los géneros *Xenia* y *Nephthea*	Fabricius et al. (2005)
GBA	Aumento de la turbidez	-Disminuye un 60% la riqueza de octocorales zooxantelados	De´ath y Fabricius (2010)
Samoa Americana	Aguas residuales en el puerto de Pago Pago	Disminución drástica en la cobertura de octocorales (99%)	Cornish y DiDonato (2004)
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana	1) Afecta la composición cuantitativa (%) de los octocorales: • Más abundantes: *P. kuekenthali, E. flexuosa, P. flagellosa, E. calyculata* forma *typica, E. tourneforti* y *E. calyculata* forma *coronata*. Estas 6 especies se consideran tolerantes a la contaminación. • Baja abundancia: *A. americana* y *M. flavida* • Ausentes: *G. ventalina*, *G. mariae*, *A. elisabethae* y *A. rigida*	Herrera y Alcolado (1983)
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana y el río Almendares	1) Aumentó el porcentaje de 6 especies resistentes a la contaminación. Grupo formado por: *P. kuekenthali, E. flexuosa, E. calyculata* forma *coronata, E. calyculata* forma *typica, E. tourneforti* y *P. flagellosa*	Herrera (1984)

Tabla 1. Continuación.

Localidades	Fuentes de contaminación	Respuestas	Referencias
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana. Al este de la bahía los arrecifes también están impactados por vertimientos albañales	1) Modifica la composición cuantitativa (%) de los octocorales: • Al oeste de la bahía predominaron a 10 m de profundidad: *P. kuekenthali*, *E. flexuosa* y *E. calyculata* forma *coronata* • Al este de la bahía predominaron a 10 m de profundidad: *P. citrina* y *E. flexuosa* 2) Disminuyó la riqueza de especies: detectaron al oeste de la bahía a 10 m de profundidad 10 especies, y a 15 m, 11 especies Comparación con la Bahía de Mariel (área de referencia): 3) Al oeste de la bahía predominaron a 10 m de profundidad: *P. dichotoma* y *A. americana*. La riqueza aumentó a 22 especies, y a 15 m de profundidad a 23 especies 4) Al este de la bahía predominaron a 10 m de profundidad: *E. flexuosa*, *P. dichotoma* y *M. pinnata*	Herrera y Alcolado (1986)
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana	1) Disminuye la densidad y la riqueza de octocorales: • Al oeste de la bahía (Caleta de San Lázaro) la densidad fue 0.7 colonias/m^2 , la riqueza de 8 especies y la diversidad de especies (H´) de 1.31 natios • Arrecife alejado a la bahía (entre calle 30 y 28, Miramar, considerado como área de referencia) la densidad fue 6.0 colonias/m^2 , la riqueza de 15 especies y la diversidad de especies (H´) de 2.22 natios	Guardia y González-Sansón (2000)
RNC	Descargas del río Almendares	1) Disminuye la densidad de octocorales: • Al oeste del río (sitio La Puntilla) la densidad fue de 0.4 colonias/m^2 • Al este del río (sitio Calle 12) la densidad fue de 0.2 colonias/m^2 2) Modifica la composición cuantitativa (%) de los octocorales: • Al oeste del río (sitio La Puntilla) predominaron: *P. guadalupensis*, *E. flexuosa* y *E. mammosa* • Al este del río (sitio Calle 12) predominaron: *M. muricata*, *P. anceps* y *Eunicea* sp.	Guardia et al. (2001)

Fuente: elaboración propia

Tabla 1. Continuación.

Localidades	Fuentes de contaminación	Respuestas	Referencias
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana y el río Almendares	1) Disminuye la densidad de octocorales: Al oeste de la Bahía de La Habana: • 1997: 0.3 colonias/m^2 • 2000: 0.8 colonias/m^2 • 2002: 0.9 colonias/m^2 En arrecifes aledaños al río Almendares: • 1999: 0.5 colonias/m^2 • 2000: 0.6 colonias/m^2 • 2002: 0.4 colonias/m^2 En arrecifes de referencia alejados de ambas fuentes: • 1997: 5.2 colonias/m^2 • 1999: 3.1 colonias/m^2 • 2000: 3.5 colonias/m^2 • 2002: 2.3 colonias/m^2	González-Díaz et al. (2003)
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana y los ríos Almendares y Quibú	1) Disminuye la densidad de octocorales: • Al oeste de la Bahía de La Habana: 0.3 colonias/m^2, y al este no se observaron colonias • Al oeste del río Almendares: 0.2 colonias/m^2, y al este 0.03 colonias/m^2 • En un arrecife cercano al río Quibú: 0.6 colonias/m^2	González (2010)
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana y los ríos Almendares, Cojímar y Quibú	1) Disminuye la densidad de octocorales: Al oeste de la Bahía de La Habana (PAM): • 2008: 0.6 colonias/m^2 • 2012: 1.1 colonias/m^2 • 2015: 0.9 colonias/m^2	Rey-Villiers (2009); Este estudio

Fuente: elaboración propia

Tabla 1. Continuación.

Localidades	Fuentes de contaminación	Respuestas	Referencias
RNC	Descargas de la Bahía de La Habana y los ríos Almendares, Cojímar y Quibú	Al oeste del río Almendares (Pu): • 2010: 0.4 colonias/m^2 • 2014: 1.2 colonias/m^2 • 2015: 0.9 colonias/m^2 Al oeste del río Cojímar: • 2014: 3.6 colonias/m^2 2) Modifica la composición cuantitativa (%) en las asociaciones de octocorales: Al oeste de la Bahía de La Habana (PAM): • Especies que predominaron entre 2008-2015: *E. flexuosa*, *P. kuekenthali* y *P. citrina* Al oeste del río Almendares (Pu): • Especies que predominaron entre 2010-2015: *E. mammosa*, *E. flexuosa* y *P. dichotoma* Al oeste del río Cojímar: • Especies que predominaron en el 2014: *P. kuekenthali*, *E. flexuosa* y *E. mammosa* Al oeste del río Quibú: • Especies que predominaron entre 2008-2010: *P. kuekenthali*, *E. flexuosa* y *E. calyculata* forma *typica* Comparación con arrecifes alejados a esas cuencas fluviales: 3) Playa del Salado a 30 Km al oeste de la bahía: • 2010: 7.4 colonias/m^2 • 2015: 6.8 colonias/m^2 • Especies que predominaron entre 2010-2015: *A. americana*, *M. flavida* y *E. flexuosa* 4) Boca de Calderas a 35 Km al este de la bahía: • 2010: 10.2 colonias/m^2 • 2015: 11.0 colonias/m^2 • Especies que predominaron entre 2010-2015: *A. americana*, *G. ventalina* y *E. flexuosa*	Rey-Villiers (2009); Este estudio

Fuente: elaboración propia

Tabla 2. Densidad promedio (colonias/m^2) y desviación estándar (DS) de 17 especies de octocorales en la región noroccidental de Cuba entre 2008-2015. Se muestran las especies que conformaron más del 90% las asociaciones de octocorales. Sa: Playa del Salado; PAM: Parque Antonio Maceo y Ca: Boca de Calderas.

Especies	Sa De	PAM De	Ca De
Antillogorgia acerosa	0.	0.	0.
Antillogorgia	1.	0.	1.
Antillogorgia	0.	0.	0.
Eunicea calyculata	0.	0.	0.
Eunicea calyculata	0.	0.	0.
Eunicea flexuosa	0.	0.	1.
Eunicea mammosa	0.	0.	0.
Eunicea tourneforti	0.	0.	0.
Gorgonia flabellum	0.	0.	0.
Gorgonia mariae	0.	0.	0.
Gorgonia ventalina	0.	0.	1.
Muricea pinnata	0.	0.	0.
Muriceopsis flavida	1.	0.	0.
Plexaura kuekenthali	0.	0.	0.
Pseudoplexaura	0.	0.	1.
Pterogorgia citrina	0.	0.	0.
Pterogorgia	0.	0.	0.

Fuente: elaboración propia

El tamaño de los octocorales es una característica importante ya que los procesos en su historia de vida están relacionados con su talla (Lasker y Sánchez, 2002). Existen pocas investigaciones que demuestren cómo la eutrofización influye en la morfometría de los octocorales (Grigg, 1974; Guardia y González-Sansón, 2000; Rey-Villiers y Sánchez, 2018a). La tendencia observada es que la contaminación orgánica interviene de manera específica en los octocorales. Por ejemplo, la talla de las colonias de *Muricea* sp. al parecer se favorecen por las descargas de un difusor submarino en California (Grigg, 1974), y la segunda mayor talla media de *P. kuekenthali* fue detectada en un arrecife que recibe los vertimientos de la Bahía de La Habana, probablemente debido a mecanismos heterotróficos y/o fototrópicos en el crecimiento (Rey-Villiers y Sánchez, 2018a). Sin embargo, la distribución por tallas de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali* en el litoral de La Habana son afectadas por la contaminación orgánica, ya que como tendencia se detectó un mayor porcentaje de colonias en los menores intervalos (0-10 cm, 10-20 cm y 20-30 cm) en los arrecifes más contaminados (Rey-Villiers y Sánchez, 2018a). Estos autores registraron la mayor talla media de ambas especies en los sitios alejados de las descargas de la Bahía de La Habana. Rey-Villiers (2014) concluyó que la contaminación orgánica proveniente de la Bahía de La Habana tiene un efecto negativo en diferentes indicadores morfométricos como la altura, diámetro mayor,

número de ramas, índice de cobertura y relación altura/diámetro en las especies *E. flexuosa* y *P. kuekenthali*.

Las investigaciones en la tasa de crecimiento de los octocorales que habitan arrecifes cercanos a fuentes de contaminación son escasas. Los resultados parecen indicar que la tasa de crecimiento de los octocorales se favorece con las descargas de cuencas fluviales, escurrimientos y difusores submarinos. Por ejemplo, la talla de *Muricea* sp. reportada cerca de las descargas del difusor submarino de la planta nuclear de San Onofre, California, indicó que la tasa de crecimiento de esta especie fue al menos el doble que las colonias en el arrecife La Jolla (ausencia de difusor) (Grigg, 1974). La tasa de crecimiento del octocoral *Clavularia inflata* aumentó cuando fue trasladado desde un arrecife exterior a uno cerca de la costa con mayores niveles de nutrientes en la Gran Barrera de Coral de Australia (Aliño et al., 1992). También, la tasa de crecimiento elevada (varió de: 7.6 a 8.1 cm/año en altura, y de 6.9 a 8.3 cm/año en ancho) de *G. ventalina* en Santa Marta, Colombia, pudo estar relacionada con la disponibilidad de partículas suspendidas y microorganismos del plancton proporcionados por el escurrimiento y las aguas residuales (Manrique-Rodríguez et al., 2006).

Por su parte, Rey-Villiers y Sánchez (2018b) concluyeron que la tasa de crecimiento de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali* aumenta con un mayor aporte de materia orgánica, microorganismos y nutrientes. Estos autores plantean que es posible que la heterotrofía de esas especies constituya una fuente de energía adicional a la obtenida por fotosíntesis para su crecimiento, ya que encontraron que la tasa de crecimiento de ambas especies fue significativamente mayor en un arrecife cercano (PAM) a la Bahía de La Habana en comparación con los arrecifes de Playa del Salado (Sa) y Boca de Calderas (Ca) (Fig. 1); y que la tasa de crecimiento de ambas especies presentó una correlación positiva y significativa con las bacterias coliformes fecales, coliformes totales, bacterias heterótrofas, sulfato-reductoras, estreptococos fecales, NH_4^+, PO_4^{3-}, y una correlación negativa y significativa con la visibilidad en el agua y la concentración de NO_3^-+NO_2^-.

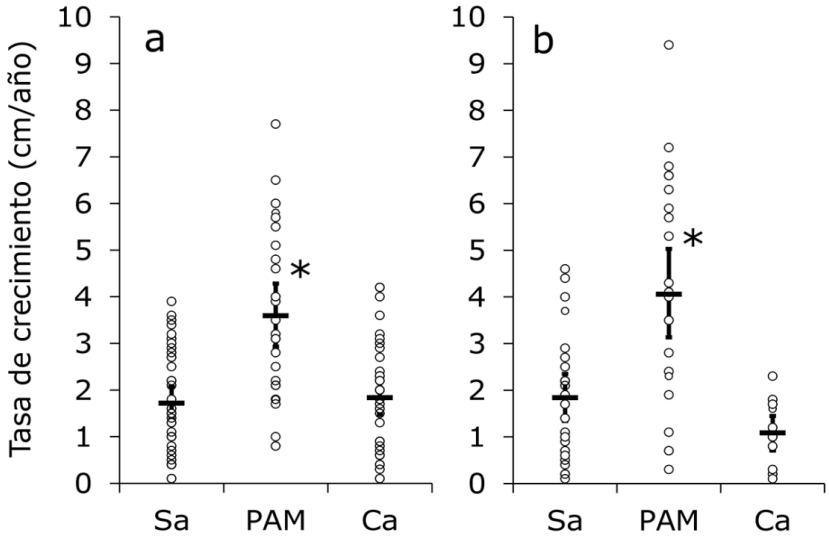


Figura 1. Tasa de crecimiento anual (media, 95% IC y valores observados) de *E. flexuosa* (a) y *P. kuekenthali* (b) en tres arrecifes de la región noroccidental de Cuba. Sa: Playa del Salado (30 Km al oeste de la Bahía de La Habana), PAM: Parque Antonio Maceo (1.4 Km al oeste de la Bahía de La Habana), Ca: Boca de Calderas (35 Km al este de la Bahía de La Habana). * Indica significación estadística entre pares de sitios. Fuente: Rey-Villiers y Sánchez (2018b)

1.2.3 En el nivel de individuo

El interés principal en este nivel de organización biológica está en las respuestas de los individuos ante factores abióticos, y las adaptaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de los procesos evolutivos. Algunas investigaciones han encontrado que los octocorales zooxantelados en aguas turbias y enriquecidas con nutrientes en Hong Kong, usualmente tienen una morfología más aplanada y una pigmentación parda muy oscura, reflejando la elevada densidad de zooxantelas (Fabricius y McCorry, 2006; Yeung et al., 2014). El enriquecimiento con nitrógeno (N) en la Gran Barrera de Coral de Australia aumentó la proporción de metabolitos bioactivos o de estrés (terpenos) con respecto a los metabolitos de almacenamiento de energía (lípidos) en el octocoral *Sarcophyton ehrenbergi* en comparación con el tratamiento control (Fleury et al., 2000).

Los organismos como los octocorales que utilizan el agua del medio para formar sus tejidos retienen las señales isotópicas del agua por determinados períodos (Ward-Paige et al., 2005; Risk et al., 2009), en dependencia de la tasa de crecimiento y recambio de sus tejidos. El N proveniente de las aguas residuales que es asimilado por los octocorales, se puede rastrear con el isótopo estable de nitrógeno ($\delta^{15}N$) (Baker et al., 2010; Sherwood et al., 2010; Risk et al., 2014). El $\delta^{15}N$ representa una medida de las fuentes de N asimilado entre 6 y 12 meses (Baker et al., 2011), por lo que constituye un integrador ideal de los cambios anuales en las fuentes de N (Baker et al., 2013). Según Baker et al. (2010) un $\delta^{15}N$ en el tejido de

los octocorales mayor a 4 ‰ puede ser usado como un indicador de la contaminación por aguas residuales en ambientes marinos tropicales.

Existen diferentes trabajos que han determinado las respuestas en el $\delta^{15}N$ en los octocorales ante el aporte de N desde aguas residuales (Tabla 3). La elevada carga de N proveniente de tres difusores submarinos al sureste de la Florida (9.9 toneladas de N/día) provocan un aumento en el $\delta^{15}N$ en los octocorales *Eunicea* sp., *Plexaura* sp., *Pseudoplexaura* sp. y *Antillogorgia* sp. (Tabla 3). Con la disminución en la carga de N aportada por otros dos difusores (1.6 toneladas de N/día) disminuye el $\delta^{15}N$ en esas especies (Tabla 3). Por otra parte, en los arrecifes de Bahamas, la concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) fue de 0.87 µM, y el $\delta^{15}N$ en esos octocorales disminuyó hasta 2 ‰ (Tabla 3). Sobre la base de estos resultados, Sherwood et al. (2010) concluyeron que las variaciones espaciales en el $\delta^{15}N$ en los octocorales reflejan la dispersión de las aguas residuales, con los valores más elevados al sureste de la Florida, mostrando el impacto de una mayor densidad poblacional y volumen de aguas residuales en comparación con Bahamas.

En los arrecifes de los cayos de la Florida, el $\delta^{15}N$ en el eje y tejido de *G. ventalina* (Tabla 3), también evidencian que las colonias están expuestas a N proveniente de aguas residuales (Baker et al., 2007). Los arrecifes que tuvieron menor concentración de nitrógeno total (NT entre 8.9 a 10.6 µM) no mostraron un cambio significativo en el $\delta^{15}N$ en el eje de *Plexaura* spp. (entre 2 a 3 ‰, media: 2.9 ± 0.1 ‰) desde 1974 al 2001, mientras que los sitios con mayor concentración de NT (entre 11.4 a 14.8 µM) tuvieron una tendencia significativa a incrementar el $\delta^{15}N$ (de 2.9 a más de 5 ‰; media: 3.9 ± 0.2 ‰). Lo anterior, refleja que el N derivado de las aguas residuales ha existido en los arrecifes de los cayos de la Florida (en los de mayor concentración de NT) desde 1978 (Ward-Paige et al., 2005). La concentración de NT entre 1995-2002 en los cayos de la Florida se correlacionó de manera positiva y significativa con el $\delta^{15}N$ en *P. homomalla* y *E. flexuosa* (Ward-Paige et al., 2005). En correspondencia con esto, Mutchler et al. (2007) detectaron un $\delta^{15}N$ de 7.6 ‰ en los NO_3^- de la laguna de Yal-kú, en el Caribe Mexicano, valor muy cercano al $\delta^{15}N$ en el tejido de *G. ventalina* en el sitio más cercano a las descargas de aguas subterráneas (DAS) en esa laguna (7.7 ‰), indicando que las colonias están asimilando NO_3^- provenientes de aguas residuales enriquecidos en ^{15}N (Baker et al., 2010).

El desarrollo turístico en Akumal, Caribe Mexicano, tiene como consecuencia que el tejido de *G. ventalina* tenga un enriquecimiento en ^{15}N en comparación con un área de referencia (Mahahual) (Tabla 3) (Baker et al., 2010; Baker et al., 2013). Los mayores $\delta^{15}N$ en *G. ventalina* se detectaron a 1 m de profundidad en la laguna de Yal-kú (Tabla 3), y en tres arrecifes cercanos a la costa de Akumal (mayor que 6 ‰), con una diferencia aproximada de 3.5 ‰ con respecto a las colonias cercanas a las costas de Mahahual (Baker et al., 2010). Los elevados $\delta^{15}N$ en el tejido de *G. ventalina* en Akumal en comparación con Mahahual (Tabla 3) están asociados a la entrada de N proveniente de aguas residuales, ya que el $\delta^{15}N$

tuvo una correlación positiva y significativa con la abundancia de las bacterias fecales *Enterococcus* (Baker et al., 2010), y con el número de turistas (Baker et al., 2013). Estos autores plantearon que hasta un 42% del N en el tejido de *G. ventalina* en Akumal fue proveniente de aguas residuales comparado con un 15.8% en Mahahual.

Los octocorales que habitan en arrecifes cercanos a bahías, costas, difusores submarinos y ríos presentan un mayor $\delta^{15}N$ en sus tejidos que los alejados a esas fuentes (Tabla 3) (Risk et al., 2014; Baker et al., 2017). En la Bahía de Guantánamo, al sureste de Cuba, los mayores $\delta^{15}N$ en el tejido de *P. homomalla* fueron encontrados en un arrecife localizado en la pluma de un río que desemboca en esa bahía, y cercano a las descargas de un difusor submarino (Risk et al., 2014). De manera similar, el $\delta^{15}N$ en el tejido de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali* en un arrecife cercano a la Bahía de La Habana (PAM) fue significativamente mayor que en los arrecifes alejados a la bahía como Playa del Salado y Boca de Calderas (Fig. 2).

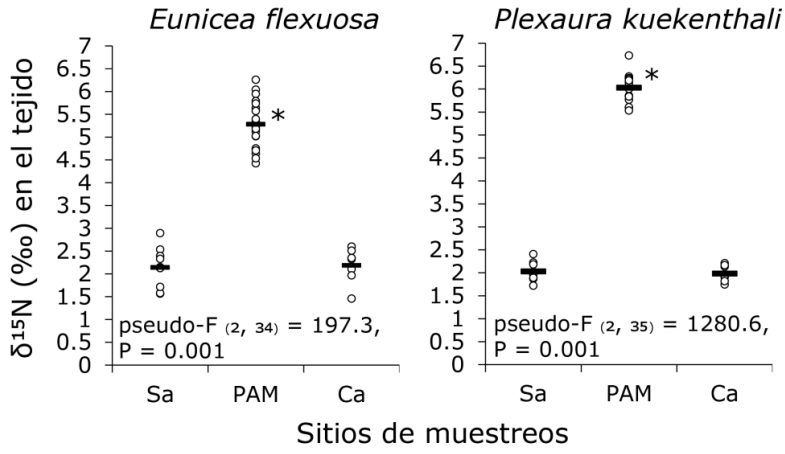


Figura 2. $\delta^{15}N$ (‰) (media y valores observados) en el tejido de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali* en tres arrecifes de la región noroccidental de Cuba. Sa: Playa del Salado (30 Km al oeste de la Bahía de La Habana), PAM: Parque Antonio Maceo (1.4 Km al oeste de la Bahía de La Habana) y Ca: Boca de Calderas (35 Km al este de la Bahía de La Habana). * Indica significación estadística entre pares de sitios.
Fuente: elaboración propia

El $\delta^{15}N$ en el tejido de *G. ventalina* estuvo enriquecido en ^{15}N en arrecifes cercanos a los puertos y costas de Bermudas, en comparación con la laguna arrecifal y su borde exterior (Tabla 3), lo que evidencia el impacto de la contaminación proveniente desde tierra (Baker et al., 2017). Ellos concluyeron que en la laguna arrecifal, a más de 1 km de la costa, probablemente las colonias no están afectadas por N de aguas residuales, ya que detectaron un $\delta^{15}N < 4$ ‰. Estos resultados coincidieron con Sherwood et al. (2010), quienes encontraron en los arrecifes de

Bahamas que el $\delta^{15}N$ en 4 especies de octocorales disminuyó con la distancia a la costa, y tomaron los valores de 2 ‰ como línea base de condiciones prístinas. En un arrecife a 75 km de las costas de Belice, el $\delta^{15}N$ de *P. homomalla* y *E. flexuosa* fue aproximadamente 1.9 ‰ (Ward-Paige et al., 2005). A diferencia de los arrecifes de Bermudas, Bahamas y Belice, el $\delta^{15}N$ en el tejido de *G. ventalina* en Akumal refleja que la contaminación por N proveniente desde tierra está afectando los arrecifes hasta 1 km alejado a la costa (Baker et al., 2010).

De manera general, los trabajos anteriores coinciden en que el enriquecimiento en ^{15}N en el tejido y eje de los octocorales se debe al aporte de aguas residuales. Al comparar el $\delta^{15}N$ de los octocorales entre arrecifes del Mar Caribe y el Atlántico Oeste, los mayores promedios fluctuaron entre 7.3 a 7.7 ‰, y en todos los casos los arrecifes estuvieron cercanos a fuentes de contaminación como DAS con presencia de residuales, difusores submarinos con una elevada carga de N y bahías y ríos eutrofizados (Tabla 3). Los menores $\delta^{15}N$ variaron entre 1.9 a 2.2 ‰ en arrecifes alejados a la costa y/o en aguas oligotróficas (Tabla 3), característico de ambientes prístinos donde predomina la fijación de N.

Tabla 3. $\delta^{15}N$ (‰) en el tejido y eje de diferentes especies de octocorales en el Caribe y Atlántico Oeste. N = nitrógeno, NT = nitrógeno total, NID = nitrógeno inorgánico disuelto, NO_3^- = nitratos, DAS = descargas de aguas subterráneas y ND = no se reportan datos.

Localidades	Sitios	Especies	$\delta^{15}N$ (‰)	Nutrientes	Características de los sitios	Referencias
Caribe Mexicano	Laguna de Yal-kú	*G. ventalina*	6.9 a 7.7	> 25 µmol/L de NO_3^-	$\delta^{15}N$ = 7.7 ‰ a menos de 50 m de distancia a la DAS en la laguna de Yal-Kú, y a 1 m de profundidad	Baker et al. (2010); Mutchler et al. (2007) determinaron los NO_3^-
Caribe Mexicano	Mahahual	*G. ventalina*	1.5 a 3.6	ND	Profundidad de 15 a 2 m, respectivamente	Baker et al. (2010)
Caribe Mexicano	Akumal	*G. ventalina*	Media = 3.3 Rango de 2.2 a 4.3	ND	A 500 m de la boca de la laguna de Yal-kú a 10 m de profundidad	Baker et al. (2013)
Caribe Mexicano	Mahahual	*G. ventalina*	Media = 2.2 Rango de 1.8 a 2.8	ND	A 10 m de profundidad	Baker et al. (2013)
Caribe Mexicano	Xel-Ha	*P. homomalla* y *E. flexuosa*	~ 6 a 7	ND	A menos de 200 m de distancia a la costa	Ward-Paige et al. (2005)
Belice	Cerca de Lighthouse	*P. homomalla* y *E. flexuosa*	~ 1.9	ND	~ 75 Km a las costas de Belice	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Turtle Patch	*P. homomalla* y *E. flexuosa*	2.7	8.9 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Carysfort Reef	*P. homomalla* y *E. flexuosa*	3.2	9.2 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Carysfort	*G. ventalina*	3.3 en eje, 3.4 en tejido	8.8 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la	Admiral Patch	*P. homomalla* y *E.*	3.0	10.0 µM de	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al.

Tabla 3. Continuación.

Localidades	Sitios	Especies	$\delta^{15}N$ (‰)	Nutrientes	Distancia a la costa y características de los sitios	Referencias
Cayos de la Florida	Molasses	*G. ventalina*	3.7 en eje, 3.8 en tejido	8.5 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	West Turtle Shoal	*P. homomalla, E. flexuosa*	3.4	10.0 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Long Key	*P. homomalla, E. flexuosa*	4.6	14.8 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Dustan Rocks	*P. homomalla, E. flexuosa*	3.8	14.4 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Jaap Reef	*P. homomalla, E. flexuosa*	4.7	13.2 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	West Washerwoman	*P. homomalla, E. flexuosa*	3.9	11.4 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Cliff Green	*P. homomalla, E. flexuosa*	3.8	12.3 µM de NT	Entre 3 y 10 m de profundidad	Ward-Paige et al. (2005)
Cayos de la Florida	Little Grecian	*G. ventalina*	3.7 en eje, 3.8 en tejido	8.6 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Conch	*G. ventalina*	3.2 en eje y tejido	8.5 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Alligator	*G. ventalina*	3.4 en eje, 3.5 en tejido	10.8 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Sombrero	*G. ventalina*	4.3 en eje, 3.8 en tejido	10.6 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Looe	*G. ventalina*	4.2 en eje y tejido	9.9 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Western Dry Rocks	*G. ventalina*	3.8 en eje, 4.1 en tejido	11.0 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)
Cayos de la Florida	Marquesas	*G. ventalina*	4.1 en eje, 4.2 en tejido	7.6 µM de NT	~ 5 m de profundidad	Baker et al. (2007)

Fuente: elaboración propia

Tabla 3. Continuación.

Localidades	Sitios	Especies	$\delta^{15}N$ (‰)	Nutrientes	Distancia a la costa y características de los sitios	Referencias
Sureste de Florida	Broward County	*Eunicea* sp. *Plexaura* sp. *Pseudoplexaura* sp. *Antillogorgia* sp.	Media = 7.5 Rango de 6 a 10	9.9 toneladas de N/día	Entre 5 y 30 m de profundidad	Sherwood et al. (2010)
Sureste de Florida	Palm Beach	*Eunicea* sp. *Plexaura* sp. *Pseudoplexaura* sp. *Antillogorgia* sp.	Media = 4.9 Rango de 4.5 a 5.4	1.6 toneladas de N/día	Entre 5 y 30 m de profundidad	Sherwood et al. (2010)
Bahamas	Green Turtle Cay	*Eunicea* sp. *Plexaura* sp. *Pseudoplexaura* sp. *Antillogorgia* sp.	Media = 2 Rango de 2 a 3	0.87 µM de NID	Entre 3 y 6 m de profundidad. Aguas oligotróficas	Sherwood et al. (2010)
Región suroriental de Cuba	Arrecifes cercanos a la Bahía de Guantánamo	*P. homomalla*	Mediana = ~ 5 a 5.5	ND	~ 10 m de profundidad. El mayor $\delta^{15}N$ se reportó en un arrecife localizado en la pluma de un río que desemboca en esa bahía	Risk et al. (2014)
Bermudas	Arrecifes cercanos a los puertos	*G. ventalina* y *P. porosa*	Media = 7.3 Máximo = 9.3	ND	Los arrecifes cercanos a los puertos, a las costas y en la zona media de la laguna arrecifal están entre 1 y 3 m de profundidad	Baker et al. (2017)
	Arrecifes cercanos a las costas	*G. ventalina* y *P. porosa*	Media = 5.4 Máximo = 6.2			
	Zona media de la laguna arrecifal	*G. ventalina* y *P. porosa*	Media = 3.4 Mínimo = 3.3			
	Borde exterior de la laguna arrecifal	*G. ventalina* y *P. porosa*	Media = 3.1 Mínimo = 2.9		Entre 5 y 10 m de profundidad	

Fuente: elaboración propia

1. Conclusiones

➢ En el nivel de comunidad:

1) La eutrofización y la turbidez afectan las asociaciones de octocorales ya que disminuyen la riqueza y diversidad de especies, la densidad, cobertura, altura de sus colonias y cambia la composición cuantitativa (%) de sus especies.

2) Las especies *P. kuekenthali*, *E. flexuosa*, *P. flagellosa*, *E. tourneforti*, *E. calyculata* forma *typica*, *E. calyculata* forma *coronata*, *E. mammosa* y *P. citrina* son tolerantes a la contaminación orgánica. Las especies *G. ventalina*, *G. mariae*, *G. flabellum, A. elisabethae*, *A. rigida, A. crucis, B. asbestinum, E. clavigera, M. petila, P. homomalla* son sensibles a la contaminación orgánica.

3) En los arrecifes alejados de fuentes de contaminación y considerados como referencia, *A. americana*, *P. dichotoma*, *M. muricata*, *G. ventalina*, *M. flavida* y *M. pinnata* presentan una abundancia relativa entre muy alta y moderada.

➢ En el nivel de población:

4) La eutrofización disminuye la densidad y cobertura de diferentes especies de octocorales.

5) La contaminación orgánica afecta la distribución por tallas de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali*, ya que en arrecifes cercanos a fuentes de contaminación se detectan mayores porcentajes de colonias en los menores intervalos de tallas.

6) La contaminación orgánica tiene un efecto negativo en diferentes indicadores morfométricos de *E. flexuosa* y *P. kuekenthali*, ya que disminuye la altura, el diámetro mayor, el número de ramas, el índice de cobertura y aumenta la relación altura/diámetro en ambas especies.

7) La tasa de crecimiento de los octocorales se favorece con la entrada de materia orgánica, microorganismos y nutrientes provenientes desde bahías eutrofizadas, difusores submarinos y escurrimientos terrestres, y es posible que la heterotrofía sea una fuente de energía adicional a la obtenida por fotosíntesis para el crecimiento.

➢ En el nivel de individuo:

8) La eutrofización y la turbidez inducen un cambio en la pigmentación de los tejidos de las colonias hacia un pardo muy oscuro debido al incremento en la densidad de las zooxantelas, y provocan un aumento en la proporción de metabolitos de estrés (terpenos) con respecto a los metabolitos de almacenamiento de energía (lípidos).

9) Las descargas de cuencas fluviales contaminadas (bahías y ríos), DAS con residuales, difusores submarinos y escurrimientos desde costas con elevado desarrollo turístico e industrial provocan un enriquecimiento en ^{15}N en el tejido y eje de los octocorales.

2. Referencias

Aliño, P. M., Sammarco, P. W., & Coll, J. C. (1992). Competitive strategies in soft corals (Coelenterata, Octocorallia). IV. Environmentally induced reversals in competitive superiority. *Marine Ecology Progress Series*, *81*, 129-145.

Armenteros, M., Pérez-Angulo, A., Regadera, R., Beltrán, J., Vincx, M., & Decraemer, W. (2009). Effects of chronic and heavy pollution on macro-and meiobenthos of Havana Bay, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas, 30*(3), 203-214.

Baker, D. M., MacAvoy, S. E., & Kim, K. (2007). Relationship between water quality, $\delta^{15}N$, and aspergillosis of Caribbean sea fan corals. *Marine Ecology Progress Series*, *343*, 123-130.

Baker, D., Jordán-Dahlgren, E., Maldonado, M. A., & Harvell, C. D. (2010). Sea fan corals provide a stable isotope baseline for assessing sewage pollution in the Mexican Caribbean. *Limnology and Oceanography*, *55*(5), 2139-2149.

Baker, D. M., Kim, K., Andras, J. P., & Sparks, J. P. (2011). Light-mediated ^{15}N fractionation in Caribbean gorgonian octocorals: implications for pollution monitoring. *Coral Reefs*, *30*(3), 709–717.

Baker, D. M., Rodríguez-Martínez, R. E., & Fogel, M. L. (2013). Tourism's nitrogen footprint on a Mesoamerican coral reef. *Coral Reefs*, *32*(3), 691-699.

Baker, D. M., Murdoch, T. J., Conti-Jerpe, I., & Fogel, M. (2017). Investigating Bermuda's pollution history through stable isotope analyses of modern and museum-held gorgonian corals. *Marine Pollution Bulletin*, *114*(1), 169-175.

Bayer, F. M. (1961). *The shallow water Octocorallia of the West Indian region*. Martinus Nijhoff: *The Hague*, *373*.

Cairns, S. D., & Bayer, F. M. (2009). Octocorallia (Cnidaria) of the Gulf of Mexico. En D. L. Felder and D. K. Camp (Eds.), *Gulf of Mexico origins, waters, and biota. Biodiversity* (pp. 321-331). Texas, Estados Unidos: Texas A&M University Press, College Station.

Cano, M. (2008). *Bases biológicas de Ulva fasciata Delile, (Chlorophyta) para su posible explotación, al oeste de La Habana, Cuba* (Tesis de Doctorado). Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

Cornish, A. S., & DiDonato, E. M. (2004). Resurvey of a reef flat in American Samoa after 85 years reveals devastation to a soft coral (Alcyonacea) community. *Marine Pollution Bulletin*, *48*(7-8), 768-777.

Crossland, C. J., Bairn, D., & Ducrotoy, J. P. (2005). The coastal zone: a domain of global interactions. En C. J. Crossland, H. H. Kremer, H. J. Lindeboom, J. I. Marshall Crossland and M. D. Le Tissier (Eds.), *Coastal fluxes in the anthropocene* (pp. 1-37). Berlín, Alemania: Berlin Springer Heidelberg.

De'ath, G., & Fabricius, K. (2010). Water quality as a regional driver of coral biodiversity and macroalgae on the Great Barrier Reef. *Ecological Application, 20*(3), 840-850.

Fabricius, K. E. (2005). Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin, 50*(2), 125-146.

Fabricius, K. (2011a). Octocorallia. En D. Hopley (Ed.), *Encyclopedia of earth sciencies series. Encyclopedia of modern coral reefs. Structure, form and process*, (pp. 740-745). Townsville, Australia: Springer Science & Business Media.

Fabricius, K. (2011b). Factors determining the resilience of coral reefs to eutrophication: a review and conceptual model. En Z. Dubinsky and N. Stambler (Eds.), *Coral reefs: an ecosystem in transition*, (pp. 493-505). Ramat Gan, Israel: Springer Science & Business Media.

Fabricius, K., & Alderslade, P. (2001). *Soft corals and sea fans: a comprehensive guide to the tropical shallow water genera of the central-west Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Science.

Fabricius, K. E., & De'ath, G. (2001). Biodiversity on the Great Barrier Reef: large-scale patterns and turbidity-related local loss of soft coral taxa. En E. Wolanski (Ed.), *Oceanographic Processes of Coral Reefs: Physical and Biological Links in the Great Barrier Reef* (pp. 127-144). London, England: CRC Press.

Fabricius, K., De´ath, G., McCook, L., Turak, E., & Williams, D. M. (2005). Changes in algal, coral and fish assemblages along water quality gradients on the inshore Great Barrier Reef. *Marine Pollution Bulletin*, *51*(1-4), 384-398.

Fabricius, K., & McCorry, D. (2006). Changes in octocoral communities and benthic cover along a water quality gradient in the reefs of Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin, 52*(1), 22-33.

Fleury, B. G., Coll, J. C., Tentori, E., Duquesne, S., & Figueiredo, L. (2000). Effect of nutrient enrichment on the soft coral *Sarcophyton ehrenbergi* (Cnidaria: Octocorallia: Alcyonaceae) of the Great Barrier Reef. *Marine Biology, 136*(1), 63-68.

Glynn, P. W., & Enochs, I. C. (2011): Invertebrates and their roles in coral reef ecosystems. En Z. Dubinsky and N. Stambler (Eds.), *Coral reefs: an Ecosystem in transition* (pp. 273-325). Ramat Gan, Israel: Springer Science & Business Media.

González, P. D. (2010). *Efecto acumulativo de agentes estresantes múltiples sobre los corales hermatípicos de la región noroccidental de Cuba* (Tesis de Doctorado). Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

González-Díaz, P., Guardia, E., & González-Sansón, G. (2003). Efectos de efluentes terrestres sobre las comunidades bentónicas de arrecifes coralinos de Ciudad de La Habana, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas, 24*(3), 193-204.

González-Díaz, P., González-Sansón, G., Aguilar, C. B., Álvarez, S. F., Perera, O. P., Hernández-Fernández, L., … & Guardia, E. (2018). Status of Cuban coral reefs. *Bulletin of Marine Science*, *94*(2), 229-247.

Grigg, R. W. (1974). Growth rings: annual periodicity in two gorgonian corals. *Ecology, 55*(4), 876-881.

Guardia, E., & González-Sansón, G. (2000). Asociaciones de corales, gorgonias y esponjas del sublitoral habanero al oeste de la bahía de La Habana, II. Índices Ecológicos. *Revista de Investigaciones Marinas, 21*(1-3), 9-16.

Guardia, E., González-Díaz, P., & Trelles, J. (2001). Macrobentos del arrecife coralino adyacente al Río Almendares, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas, 22*(3), 167-178.

Hernández-Muñoz, D., Alcolado, P. M., & Hernández-González, M. (2008). Efecto de un emisario submarino de residuos urbanos sobre comunidades de octocorales (Octocorallia: Alcyonacea) en Cuba. *Revista de Biología Tropical, 56*(1), 65-75.

Herrera, A. (1984). Clasificación numérica de las comunidades de gorgonáceos al Oeste de la Bahía de la Habana. *Ciencias Biológicas*, *12*, 105-124.

Herrera, A. M. (1990). *Efectos de la contaminación sobre la estructura ecológica de los arrecifes coralinos en el litoral habanero* (Tesis de Doctorado). Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

Herrera, A., & Alcolado, P. M. (1983). Efectos de la contaminación sobre las comunidades de octocorales al Oeste de la Bahía de La Habana. *Ciencias Biológicas, 10*, 69-85.

Herrera, A., & Alcolado, P. M. (1986). Estructura ecológica de las comunidades de octocorales en el litoral de Mariel y su comparación con el litoral habanero. *Ciencias Biológicas, 15*, 55-75.

Humann, P. (1993). *Reef Coral Identification*. Jacksonville, USA: New World Publications, INC.

Lasker, H. R., & Coffroth, M. A. (1988). Temporal and spatial variability among grazers, variability in the distribution of the gastropod *Cyphoma gibbosum* on Octocoral. *Marine Ecology Progress Series, 43*(3), 285-295.

Lasker, H. R., & Sánchez, J. A. (2002). Allometry and astogeny of modular organisms. En R. N. Hughes (Ed.), *Reproductive biology of invertebrates. Progress in asexual reproduction* (pp. 207-253). New York, USA: John Wiley & Sons.

Manrique-Rodríguez, N., Bejarano-Chavarro, S., & Garzón-Ferreira, J. (2006). Crecimiento del abanico de mar *Gorgonia ventalina* (Linnaeus, 1758) (Cnidaria: Gorgoniidae) en el área de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, 35*, 77-90.

Mutchler, T., Dunton, K. H., Townsend-Small, A., Fredriksen, S., & Rasser, M. K. (2007). Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuarine, coastal and shelf science*, *74*(3), 449-457.

Olivares-Rieumont, S., De la Lanza, D., Lima, L., Graham, D. W., D´Alessandro, K., Borroto, J., … & Sánchez, J. (2005). Assessment of heavy metal levels in Almendares River sediments Havana City, Cuba. *Water Research*, *39*(16), 3945-3953.

Opresko, D. (1973). Abundance and distribution of shallow-water gorgonians in the area of Miami, Florida. *Bulletin of Marine Science, 23*(3), 535-558.

Orejas, C., Gili, J. M., & Arntz, W. (2003). The role of the small planktonic communities in the diet of two Antarctic octocorals (*Primnoisis antarctica* and *Primnoella* sp.). *Marine Ecology Progress Series*, *250*, 105-116.

Parsons, M. L., Walsh, W. J., Settlemier, C. J., White, D. J., Ballauer, J. M., Ayotte, P. M., … & Carmen, B. (2008). A multivariate assessment of the coral ecosystem health of two embayments on the lee of the island of Hawai'i. *Marine Pollution Bulletin*, *56*(6), 1138-1149.

Rey-Villiers, N. (2009). *Características de las comunidades de octocorales y ensayo de su uso como bioindicadores en un gradiente de contaminación en el oeste de La Ciudad de La Habana, Cuba* (Tesis de pregrado). Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

Rey-Villiers, N., & Sánchez, A. (2018a). Variación de la talla de dos especies de octocorales en la región noroccidental de Cuba. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, *9*(21), 1-14.

Rey-Villiers, N., & Sánchez, A. (2018b): ¿Puede la contaminación orgánica afectar la tasa de crecimiento de los octocorales en el Caribe? *Gayana*, *82*(2), 166-170.

Risk, M. J., Heikoop, J. M., Snow, M. G., & Beukens, R. (2002). Lifespans and growth patterns of two deep-sea corals: *Primnoa resedaeformis* and *Desmophyllum cristagalli*. *Hydrobiologia*, *471*(1-3), 125-131.

Risk, M. J., Lapointe, B. E., Sherwood, O. A., & Bedford, B. J. (2009). The use of $\delta^{15}N$ in assessing sewage stress on coral reefs. *Marine Pollution Bulletin*, *58*(6), 793-802.

Risk, M. J., Burchell, M., Brunton, D. A., & McCordd, M. R. (2014). Health of the coral reefs at the US Navy Base, Guantánamo Bay, Cuba: A preliminary report based on isotopic records from gorgonians. *Marine Pollution Bulletin*, *83*(1), 282-289.

Sherwood, O. A., Lapointe, B. E., Risk, M. J., & Jamieson, R. E. (2010). Nitrogen isotopic records of terrestrial pollution encoded in Floridian and Bahamian gorgonian corals. *Environmental science & technology*, *44*(3), 874-880.

Smith, S. V., Swaney, D. P., Talaue-Mcmanus, L., Bartley, J. D., Sandhei, P. T., McLaughlin, C. J., … & Wulff, F. (2003). Humans, hydrology and the distribution of inorganic nutrient loading to the ocean. *Bioscience*, *53*(3), 235-245.

Szmant, A. M., & Forrester, A. (1996). Water column and sediment nitrogen and phosphorus distribution patterns in the Florida Keys, USA. *Coral Reefs*, *15*(1), 21-41.

EPA, U. (2001). Nutrient Criteria Technical Guidance Manual: Estuarine and Coastal Marine Waters.

Ward-Paige, Ch., Risk, M. J., & Sherwood, O. A. (2005). Reconstruction of nitrogen sources on coral reefs: $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ in gorgonians from Florida Reef Tract. *Marine Ecology Progress Series*, *296*, 155-163.

Wilkinson, C., & Souter, D. (2008). *Status of Caribbean coral reefs after bleaching and hurricanes in 2005*. Townsville, Australia: Global Coral Reef Monitoring Network and Rainforest Research Center.

Yeung, C. W., Cheang, C. C., Lee, M. W., Fung, H. L., Chow, W. K., & Ang, P. (2014). Environmental variabilities and the distribution of octocorals and black corals in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, *85*(2), 774-782.

Capítulo 4

OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE ANTIBIÓTICOS EN AMBIENTES ACUÁTICOS

Edgar David González-González[1*]

Leobardo Manuel Gómez-Oliván[1]

Marcela Galar-Martínez[2]

Hariz Islas-Flores[1]

María Dolores Hernández-Navarro[1]

[1] Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

[2] Laboratorio de Toxicología Acuática. Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, C.P. 11340, Ciudad de México, México

* ed.gonzalezg@hotmail.com

Resumen

Los antibióticos son un grupo importante de productos farmacéuticos en la medicina actual. Además de utilizarse en el tratamiento de infecciones humanas, también se usan en medicina veterinaria. Los residuos de antibióticos representan un grave problema medioambiental por su consumo excesivo e introducción continua. La presencia de antibióticos y sus metabolitos en los ecosistemas acuáticos, en concentraciones que van desde ng/L hasta mg/L, afecta a los hidrobiontes. Los efectos ecotoxicológicos varían en función del tipo de fármaco, la sensibilidad de las especies, la concentración del tóxico y el tiempo de exposición. Estos efectos los producen los residuos de antibióticos, los metabolitos formados y/o los productos de degradación que, en algunas ocasiones, generan sustancias más tóxicas que el compuesto original. Este trabajo revisa y recopila la información sobre los principales ensayos de ecotoxicidad de los antibióticos, considerando las diferentes vías de entrada en el ambiente acuático, su destino y la toxicidad que producen en las especies más relevantes de los ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: antibióticos, ecotoxicidad, ambientes acuáticos

1. Antibióticos

Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos. Una propiedad común de todos los antibióticos es la toxicidad selectiva; presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos. En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para referirse a lo compuestos orgánicos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias u hongos, que resultan tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos, los producidos exclusivamente por síntesis química, o semisintéticos, cuando a partir de un núcleo básico del antibiótico producido por el microorganismo, se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o su espectro o, incluso, para disminuir su toxicidad (Lorenzo et al., 2008).

Su clasificación puede realizarse con base a diferentes criterios. Según la presencia de grupos químicos particulares se dividen en (Mestres & Duran, 2012):

b-lactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica ya que presentan características favorables, tales como: una buena absorción oral, buena difusión, escasos efectos adversos, así como el amplio y diferente espectro de acción alcanzado por los diversos fármacos. Forman parte de este grupo: a) penicilinas: destacan aquellas que son naturales, como penicilina G, aquellas con actividad antiestafilocócica como cloxacilina, las de espectro amplio como amoxicilina o ampicilina, o las antipseudomonas como piperacilina y b) cefalosporinas: las cuatro generaciones diferentes que existen se diferencian en el espectro antibacteriano. De 1ª generación destacan cefalexina, cefalotina o cefadroxilo; de 2ª generación: cefuroxima o cefoxitina; de 3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, cefixima o ceftazidima y de 4ª generación: cefepima. Inhiben la síntesis de la pared bacteriana y promueven la activación de enzimas autolíticas que producen la lisis de la bacteria (Seija & Vignoli, 2016).

Aminoglucósidos

Este grupo de antibióticos contienen dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria. Forman parte de este grupo: estreptomicina, neomicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, tobramicina y netilmicina. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. Son antibióticos que no se absorben por vía oral por lo que se administran vía intravenosa o intramuscular. Son antibióticos muy activos contra bacilos gramnegativos y generalmente se suelen asociar a otro antibiótico. Las reacciones adversas más importantes son: ototoxicidad y nefrotoxicidad (Seija & Vignoli, 2016).

Macrólidos

Se caracterizan por tener como núcleo un anillo macrocíclico de lactona multimembrado al cual se unen desoxiazúcares aminados. Se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación. Forman parte de este grupo: eritromicina, claritromicina, azitromicina y espiramicina. Actúan por inhibición de la síntesis de proteínas. Se pueden administrar por vía oral o parenteral para tratar infecciones por bacterias poco sensibles a otros antibióticos. Entre los efectos adversos más frecuentes se encuentra el dolor abdominal, principalmente por eritromicina, debido a su efecto sobre la motilidad gastrointestinal, así como hepatotoxicidad (Lucas et al., 2007).

Quinolonas

Las quinolonas de uso clínico tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3. La potencia y espectro aumenta cuando lleva un átomo de flúor normalmente en la posición 6, dando lugar a las fluoroquinolonas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Forman parte de este grupo: norfloxacino, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino. Actúan inhibiendo la síntesis de ADN bacteriano. Existen formas de administración por vía parenteral o vía oral. Tienen un espectro de acción amplio y variado, así norfloxacino y ciprofloxacino presentan actividad especialmente frente a gramnegativos. Otros como levofloxacino y moxifloxacino presentan un espectro más amplio cubriendo incluso *Streptococcus*, *Moraxella* o *Haemophillus* sp. Son antibióticos bien tolerados y con baja incidencia de efectos adversos, destacando como más grave la toxicidad articular (a nivel de cartílago) (Alós, 2009).

Tetraciclinas

Estos compuestos se derivan de las sustituciones de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno, son derivados análogos de la naftaceno-carboxaneda policíclica. Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias. Forman parte de este grupo: tetraciclina, clortetraciclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tigeciclina. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Presentan un amplio espectro antibacteriano (gramnegativos, grampositivos, y otras bacterias poco frecuentes) (Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

Sulfonamidas

Su estructura química contiene azufre, oxígeno y nitrógeno que forman el núcleo de la molécula de las sulfamidas. Su estructura es similar al ácido paraaminobenzoico, un factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico. Forman parte de este grupo: sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfadiazina. Actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico necesario para la replicación del ADN. Relacionado con el grupo está el trimetoprim que también inhibe esta síntesis, aunque en un paso diferente. Generalmente se suelen utilizar asociados. Poseen un amplio espectro de acción si bien se suelen utilizar para el tratamiento de *Nocardia* sp, la enfermedad inflamatoria intestinal (sulfasalazina), quemaduras y úlceras (sulfadiazina) o en la profilaxis de neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes inmunodeprimidos (Vicente & Pérez-Trallero, 2010).

1.2. Uso y consumo de antibióticos

Los patrones de uso pueden ser distintos en diferentes países (Kümmerer, 2009b). Wise (2002) estima que el consumo de antibióticos en todo el mundo se encuentra entre 100,000 y 200,000 toneladas por año. El consumo humano total, per cápita y la proporción individual de cada compuesto, así como las tasas de prescripción de antibióticos y la ingesta sin receta varían notablemente entre países (Mölstad et al., 2002).

Los antibióticos ß-lactámicos, incluidos los subgrupos de penicilinas, cefalosporinas y, como fracciones marginales, carbapenémicos y otros, constituyen la mayor parte de los antibióticos de uso humano en la mayoría de los países. Representan aproximadamente el 50-70% del uso total de antibióticos. En la mayoría de los países, las sulfonamidas, los macrólidos y las fluoroquinolonas siguen un orden decreciente de uso (Goossens et al., 2005; Kümmerer, 2003).

Si los antibióticos se venden en el mostrador, es decir, sin receta, el consumo podría ser aún mayor. De acuerdo con las diferentes legislaciones y los diferentes grados de importancia atribuidos al uso de antibióticos, existen datos

confiables que brindan información sobre el uso total y los patrones de uso de antibióticos y el consumo per cápita para solo unos pocos países (Kümmerer, 2003).

Debido a que los datos internacionales se basan únicamente en estimaciones, se desconoce el verdadero volumen de uso de antimicrobianos en el sector agroalimentario. Las cantidades de antibióticos utilizadas están sujetas a confusión; para la mayoría de los países no hay datos o sólo se dispone de valores aproximados (Kümmerer, 2009b).

Existen reportes de la contribución de la agricultura, el ganado y, en general, de los animales destinados al consumo, en la contaminación por antibióticos en el ambiente (estos compuestos son administrados en grandes cantidades a dichos animales para promover su crecimiento), provocando una preocupación creciente en todo el mundo, debido al hecho de que tales antibióticos pertenecen a la misma clase de los utilizados en los seres humanos (como tetraciclinas y aminoglucósidos). En respuesta a este problema, la Unión Europea ha prohibido el uso de antibióticos como aditivos en forrajes para estimular el crecimiento de estos animales, ya que existe evidencia de resistencia cruzada a los agentes antimicrobianos utilizados en tratamientos en humanos (Cromwell, 2002; Gaskins et al., 2002; Heuer et al., 2006).

Los antibióticos son utilizados de diversas formas en medicina veterinaria. Lo que surge como obvio es su utilización en forma terapéutica, para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas, de la misma manera que en la medicina humana. Sin embargo, existen otras formas de utilización: La metafilaxia es una forma de uso que implica el control de ciertas variables clínicas de grupos de animales, hasta que una de ellas, la temperatura, por ejemplo, aumenta por encima de determinado valor límite, fijado de antemano. En este caso, todo el lote de animales es tratado para evitar un brote de la enfermedad. La profilaxia, por su parte, implica la utilización de medicamentos para la prevención de enfermedad en animales individuales o grupos de ellos. Finalmente, el uso de antimicrobianos a concentraciones subterapéuticas, se puede utilizar con objetivos profilácticos y/o de promoción del crecimiento (Errecalde, 2004).

Algunos compuestos pueden emplearse para fines distintos a la medicina humana o veterinaria: los antibióticos, como las estreptomicinas, se usan en el cultivo de frutas, mientras que otros se utilizan en la apicultura (Kümmerer, 2009a).

Los antibióticos se han usado desde la década de 1950 para controlar ciertas enfermedades bacterianas de frutas, vegetales y plantas ornamentales de alto valor. Hoy en día, los antibióticos más comúnmente usados en las plantas son la estreptomicina y, en menor medida, la oxitetraciclina. Los usos principales son en cultivo de manzanas, peras y árboles ornamentales para el control de la niebla del peral y del manzano causados por *Erwinia amylovora* (Mcmanus et al., 2002).

Para ser un candidato viable para el control de la enfermedad, el antibiótico debe estar activo en la planta o dentro de ella, y tolerar la oxidación, la radiación UV, la lluvia y las altas temperaturas. Estas propiedades son exactamente las que causan problemas en el ambiente. Sin embargo, faltan datos sobre las concentraciones de estreptomicina en el suelo para el cultivo de la fruta. Nuevamente, debido a las diferentes regulaciones, la situación es distinta en diferentes países (Kümmerer, 2009a).

Otra fuente potencial de antibióticos contaminantes en el ambiente es la acuicultura que, de manera similar a la industria ganadera, utiliza antibióticos para promover el stock de peces saludables (Pruden et al., 2013).

La definición actual de acuicultura, según la FAO, es "el cultivo de organismos acuáticos, incluidos peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas". El cultivo implica algún tipo de intervención durante el proceso para aumentar la producción. En acuicultura, los antibióticos se han utilizado principalmente con fines terapéuticos y como agentes profilácticos (Hernández-Serrano, 2005).

1.3. Ocurrencia y destino de antibióticos en ambientes acuáticos

Durante las últimas décadas, la presencia de antibióticos en el medio acuático ha despertado una preocupación cada vez mayor en todo el mundo. Los antibióticos, utilizados con mayor frecuencia en medicina humana y veterinaria, pueden tomar varias rutas hacia el ambiente (ver Figura 1). Los antibióticos consumidos se descargan continuamente en los ecosistemas naturales a través de la excreción (orina y heces) después de un corto período de residencia en los organismos humanos y animales. Estos medicamentos pueden llegar al ambiente acuático mediante descargas directas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) al agua superficial o subterránea, lixiviados, alcantarillas y tanques de almacenamiento de estiércol o lagunas, escorrentías y lixiviación de tierras agrícolas fertilizadas con estiércol, o por disposición de aguas residuales en áreas agrícolas, entre otras descargas (Heberer, 2002; Kemper, 2008; Li et al., 2014).

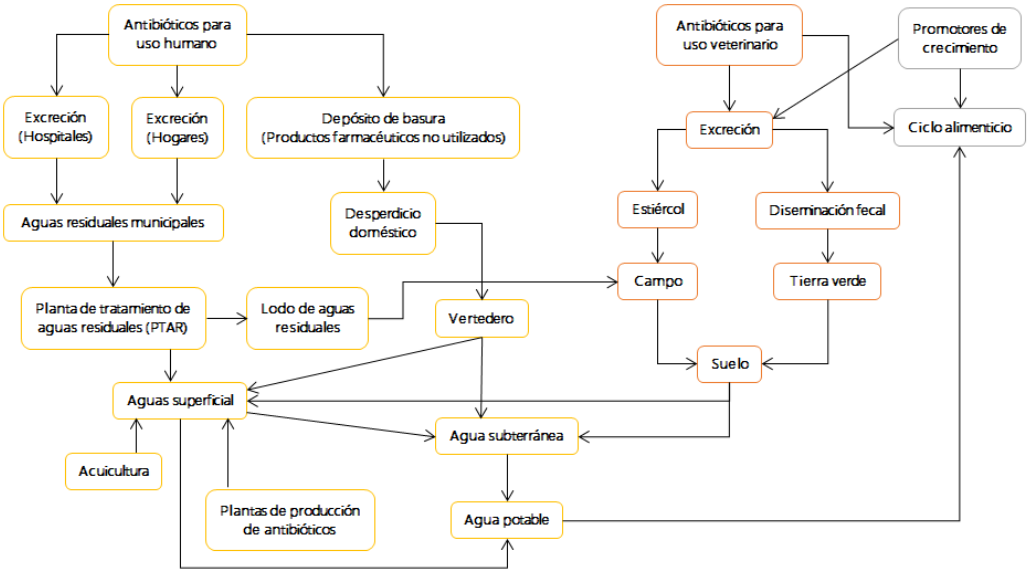


Figura 1. Fuentes y vías para la presencia de antibióticos en el ambiente. Fuente: (Milić et al., 2013)

La presencia en el ambiente de antibióticos utilizados en medicina humana se atribuye principalmente a la descarga de aguas residuales tratadas (en PTAR) y no tratadas, debido a que los procesos convencionales de tratamiento no eliminan eficazmente estos compuestos (Homem & Santos, 2011; Watkinson et al., 2007).

La práctica de la aplicación de estiércol en la tierra con fines de fertilización del suelo es la mayor contribución de la medicina veterinaria para la contaminación del ambiente por antibióticos. Una vez en el suelo, estos compuestos pueden ingresar al medio acuático indirectamente a través de la escorrentía superficial hacia las aguas superficiales y/o lixiviarse a las aguas subterráneas y al agua potable (Blackwell et al., 2009; Chee-Sanford et al., 2009; Sarmah et al., 2006).

Una vía alternativa de aportes al medio acuático se deriva de la aplicación de antibióticos para la acuicultura. Se espera que los derrames o las descargas derivadas de incidentes durante la fabricación, la eliminación de los medicamentos y contenedores no utilizados, y la dispersión atmosférica de polvo de piensos y estiércol que contienen antibióticos sean mínimos (Gothwal & Shashidhar, 2015).

Los antibióticos experimentan un cambio estructural en el organismo humano y animal antes de su excreción, lo cual genera metabolitos. Después de la excreción, ambos compuestos, principales y metabolitos, pueden sufrir modificaciones estructurales adicionales por procesos bióticos y abióticos en instalaciones técnicas, tales como PTAR y plantas de tratamiento de agua, y en el entorno natural, resultando en productos de transformación. Los subproductos

difieren en propiedades fisicoquímicas y farmacológicas en comparación con sus compuestos originales (Carvalho & Santos, 2016).

Los antibióticos y sus subproductos en el ambiente pueden persistir a través de un ciclo de transformación parcial, bioacumulación y deposición gradual en el suelo, el agua superficial y el agua subterránea. El ciclo de vida de estos compuestos se rige por una serie de procesos biológicos y fisicoquímicos en los sistemas suelo-agua, particularmente estabilidad, sorción, lixiviación y degradación, los cuales dependen de las propiedades fisicoquímicas de los antibióticos, las propiedades del suelo, y las condiciones climáticas (Manzetti & Ghisi, 2014; Zhao et al., 2015).

Los antibióticos y sus subproductos en ambientes acuáticos pueden ser absorbidos por animales (animales productores de alimentos y peces) o alcanzar el agua potable, lo que también induce posibles efectos a largo plazo en los seres humanos como parte continua de su dieta a través del agua o alimentos en bajas concentraciones (Manzetti & Ghisi, 2014; Thiele-Bruhn, 2003).

Todavía no hay evidencia científica sobre la absorción sistemática y la entrada de bajas dosis de antibióticos y su impacto en los humanos y el ambiente. Las matrices biótica y abiótica del ambiente se encuentran en un equilibrio dinámico frágil y la presencia de contaminantes emergentes, que son tóxicos, peligrosos, potencialmente mutagénicos y carcinogénicos, afectan poderosamente el estado del ambiente y la salud humana (Vojinović-Miloradov et al., 2011a; Vojinović-Miloradov et al., 2011b).

En contraste con la expectativa general, los hospitales no son la principal fuente de productos farmacéuticos en las aguas residuales municipales (Kümmerer, 2009b; Schuster et al., 2008). Son la principal fuente de antibióticos sólo para el grupo de las cefalosporinas.

En cuanto al metabolismo de los compuestos activos en humanos, existe un amplio intervalo en el grado en que estos se biotransforman. Algunos agentes se metabolizan en un 90% o más, mientras que otros lo hacen sólo en un 10%, o incluso menos. (Kümmerer, 2003; Lorian, 2005).

Se ha encontrado que las concentraciones de antibióticos medidas en diferentes países se encuentran en el mismo intervalo de concentraciones en los diferentes compartimentos, como aguas residuales y aguas superficiales, respectivamente (Batt & Aga, 2005; Botitsi et al., 2007; Chang et al., 2008; Duong et al., 2008; Hernández et al., 2007; Martins et al., 2008; Peng et al., 2008).

En general, las concentraciones se encuentran en mg por litro en el efluente hospitalario; en µg por litro, en las aguas residuales municipales y en diferentes aguas superficiales, subterráneas y agua de mar (Xu et al., 2007).

Los antibióticos humanos y veterinarios están presentes en los sedimentos. Kim & Carlson (2007) detectaron tetraciclinas, sulfonamidas y macrólidos. La concentración de sedimento medida en un río influenciado por la agricultura fue mucho más alta que en la matriz de agua suprayacente, lo que indica la entrada de antibióticos con la escorrentía superficial de los campos agrícolas. En la acuacultura intensiva, las infecciones se tratan mediante la adición de agentes antimicrobianos al agua. Los fármacos empleados pueden ingresar a los sedimentos directamente desde el agua sin someterse a ningún tipo de proceso de purificación. Esto resulta en altas concentraciones locales en el compartimento de agua y en los sedimentos adyacentes. Este fenómeno ya había sido investigado hace más de 20 años, y los resultados habían demostrado la presencia de antibióticos aplicados extensamente en la acuacultura en sedimentos debajo de granjas de peces (Björklund et al., 1990; Coyne et al., 1994; Jacobsen & Berglind, 1988; Migliore et al., 1993).

Las penicilinas forman una de las familias más importantes de antibióticos usados en medicina veterinaria y humana. Su presencia en las muestras ambientales es baja debido a su rápida transformación en el ambiente (hidrólisis relativamente fácil del anillo ß-lactámico). A pesar del amplio uso de estos compuestos, algunos investigadores informan la ausencia de residuos de penicilina en muestras de agua, probablemente debido a la falta de métodos sofisticados y equipos analíticos (Christian et al., 2003).

Los macrólidos se eliminan principalmente después de la administración en una forma inalterada. Algunos de estos (como la claritromicina y la deshidroeritromicina), y las sulfonamidas (como el sulfametoxazol, la sulfadimetoxina, la sulfametazina y el sulfatiazol) son los antibióticos más prevalentes detectados en el ambiente acuático en concentraciones de µg/L (Halling-Sørensen et al., 1998; Hirsch et al., 1999).

Las sulfonamidas son antibióticos ampliamente utilizados en la cría de animales como aditivos para piensos. No se metabolizan por completo en el hígado y los riñones y se excretan en forma inalterada y como metabolitos. El sulfametoxazol es la sulfonamida más detectada en las aguas residuales y sus concentraciones varían según el proceso aplicado de tratamiento de aguas residuales y el consumo de antibióticos (Le-Minh et al., 2010; Tong et al., 2009).

Las fluoroquinolonas se han usado principalmente en medicina humana, pero más recientemente el enrofloxacino, la sarafloxacina y el ciprofloxacino también se han aplicado en medicina veterinaria, convirtiéndose en una gran preocupación debido a su amplio espectro de influencia y la posible resistencia bacteriana (Angulo et al., 2004; Karthikeyan & Meyer, 2006).

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro con actividad contra las bacterias grampositivas y gramnegativas que se usan ampliamente para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en medicina veterinaria y humana, así como aditivos en los alimentos para animales. Las tetraciclinas son uno de los grupos de antibióticos más prevalentes en las aguas residuales. Por lo general, no se detectan a niveles elevados en el medio acuático, puesto que precipitan con cationes como el calcio y se acumulan en los lodos o sedimentos de las aguas residuales (Halling-Sørensen et al., 1998; Kolpin et al., 2002).

1.4. Detección de antibióticos en ambientes acuáticos

En los últimos años, la creciente preocupación sobre la aparición de contaminantes emergentes, como los antibióticos, en diferentes matrices ambientales ha dado lugar a un enorme progreso en el desarrollo de técnicas para la detección de trazas de estos compuestos. Los nuevos métodos analíticos son cruciales para la evaluación de su impacto ambiental y su efecto en la salud humana a través de planes de monitoreo, que requieren datos precisos y confiables (Buchberger, 2011).

Los antibióticos incluyen un amplio grupo de sustancias químicas caracterizadas por diferentes propiedades fisicoquímicas. Los contaminantes considerados pseudopersistentes, los antibióticos y sus subproductos se han detectado en el ambiente en baja concentración (ng/L) (Seifrtová et al., 2009). El análisis de antibióticos en matrices ambientales acuosas generalmente se lleva a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC-MS/MS) después de la limpieza de la muestra y la preconcentración de los analitos por extracción en fase sólida (SPE) (Buchberger, 2007).

Dado que las matrices de muestras ambientales son complejas y a menudo contienen elementos interferentes, que pueden enmascarar los compuestos de interés, el análisis directo puede no ser posible (Pavlović et al., 2007). Por lo tanto, las técnicas de limpieza y extracción, permiten obtener extractos con precisión para el análisis sensible, siendo estos procedimientos importantes previos al análisis (Kostopoulou & Nikolaou, 2008).

La detección de antibióticos en el medio acuático presenta un verdadero desafío analítico debido a sus bajas concentraciones (ppb, ppt o inferior), sus diversas propiedades fisicoquímicas y biomatrices complejas. Hoy en día, debido al gran progreso en la química analítica instrumental, es posible detectar varios tipos de antibióticos en concentraciones de µg/L a ng/L usando la cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*) y la cromatografía de gases (GC, Gas Chromatography) junto con la espectrometría de masas (MS, Mass Spectrometry), espectrometría infrarroja o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High*

Performance Liquid Chromatography) acoplada a ultravioleta (UV, *Ultraviolet*), arreglo de diodos (DA, *Diode Array*) y fluorescencia (FL, *Fluorescence*) o MS después de la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) de la matriz de agua (Samanidou et al., 2007).

Los antibióticos a menudo poseen núcleos no polares y grupos funcionales polares, por lo que se disocian o protonan dependiendo del pH del medio. Las fases muy polares y no polares pueden causar una extracción incompleta de antibióticos y presentar un problema analítico grave (Juhel-Gaugain et al., 2000). Diversos compuestos orgánicos pueden interferir significativamente con los resultados del análisis (Baquero et al., 2008; Petrović et al., 2003; Tong et al., 2009).

El desarrollo de los métodos de extracción simultánea en cartuchos de balance hidrófilo-lipófilo (HLB, *Hydrophilic-Lipophilic Balance*) presenta una mejora significativa en la extracción de diferentes antibióticos con menor tiempo y consumo de material (Pailler et al., 2009; Terzić et al., 2008).

Se pueden utilizar métodos inmunoquímicos, voltamperometría y detección amperométrica, cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) y kits comerciales para monitorear los antibióticos en concentraciones más altas (ppb) en diferentes biomatrices (huesos, leche, carne, sangre, etc.), pero no en las muestras de agua. Sólo el radioinmunoensayo, como técnica inmunoquímica, muestra su eficacia para la detección de antibióticos en la matriz de agua. Los métodos LC-MS/MS han ganado popularidad y se han convertido en una de las técnicas favoritas para analizar productos farmacéuticos como antibióticos y productos de transformación de las reacciones que ocurren en el medio acuático, entre otros métodos analíticos (LC-UV/FL y GC-MS). La especificidad, la precisión, la estabilidad, la recuperación, la linealidad, la reproducibilidad, el límite de decisión y el límite de detección son algunos de los criterios de rendimiento que deben examinarse (Radjenović et al., 2007).

Los métodos analíticos basados en LC se han utilizado para la identificación y cuantificación sensible y selectiva de antibióticos como contaminantes ambientales. En la mayoría de los estudios la detección por MS se usa para identificar, cuantificar o confirmar inequívocamente el analito objetivo; este método que implica la ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Ionization*), así como la ionización por electropulverización (ESI, *Electrospray Ionization*), representan actualmente el estado del arte. El análisis cuantitativo de los analitos presentes en matrices simples, como el agua potable, puede realizarse utilizando cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas (LC-MS). Sin embargo, en matrices complejas, como las aguas residuales, se requiere de LC-MS/MS para la cuantificación y la confirmación inequívoca de los compuestos. La LC-MS/MS adicional permite límites de detección en el rango de ng/L, lo que hace

que su aplicación en la detección de antibióticos presente en matrices ambientales sea muy común. Además, los detectores de masas más sofisticados que los de cuadrupolo simple; por ejemplo, de tiempo de vuelo (TOF, *Time of Flight*) o cuadripolar se emplean con frecuencia en el análisis multirresiduo, ya que ofrecen mayor sensibilidad y selectividad (Pozo et al., 2006).

1.5. Efectos tóxicos de antibióticos en organismos acuáticos

Los antibióticos se usan especialmente para combatir bacterias patógenas. Sin embargo, en el ambiente los organismos no objetivo están inevitablemente expuestos a sus residuos y subproductos. Los productores primarios y los descomponedores, que son esenciales para el funcionamiento sostenible de los ecosistemas, pueden ser vulnerables a los antibióticos. En consecuencia, estos fármacos y sus subproductos pueden alterar los procesos vitales del ecosistema acuático. Estos potenciales efectos ecotoxicológicos son difíciles de predecir, especialmente en matrices complejas. La ecotoxicidad aguda o crónica de los antibióticos y sus subproductos se ha evaluado mediante ensayos de ecotoxicidad estándar en organismos de diferentes niveles tróficos, como bacterias, algas, invertebrados y peces (Carvalho & Santos, 2016).

Lanzky & Halting-Sørensen (1997) probaron la toxicidad aguda del metronidazol en organismos de agua dulce y marinos (las algas verdes *Chlorella* y *Selenastrum capricornutum*, el copépodo *Acartia tonsa* y el pez cebra *Brachydanio rerio*). Las pruebas mostraron efecto sobre *Chlorella* y *S. capricornutum*, pero no se observó efecto letal agudo en los organismos acuáticos *A. tonsa* y *B. rerio*. Reportaron valores de concentración efectiva media (CE_{50}) para este fármaco de 12.5 mg/L y 40.4 mg/L sobre *Chlorella* y *S. capricornutum*, respectivamente. El estudio demostró el potencial ecotóxico del metronidazol.

Isidori et al. (2005) investigaron la ecotoxicidad de seis antibióticos (eritromicina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, ofloxacina, lincomicina y claritromicina) en organismos acuáticos. Realizaron bioensayos sobre bacterias, algas, rotíferos, microcrustáceos y peces (*Vibrio fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* y *Danio rerio*) para evaluar la toxicidad aguda y crónica. Los resultados ecotoxicológicos mostraron que la toxicidad aguda era del orden de mg/L, mientras que para los datos crónicos, los antibióticos eran bioactivos en concentraciones del orden de µg/L, principalmente para las algas. Los fármacos investigados fueron de uno o dos órdenes de magnitud menos activos contra los rotíferos y crustáceos. La ofloxacina fue el único compuesto genotóxico y el sulfametoxazol, la ofloxacina y la lincomicina fueron mutagénicos. En cuanto al riesgo ambiental, se descubrió que los macrólidos son los más dañinos para el ambiente acuático.

Park & Choi (2008) evaluaron once antibióticos de uso común (sulfonamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y b-lactámicos), utilizando organismos de prueba estándar (*V. fischeri*, *D. magna*, *Moina macrocopa y Oryzias latipes*). Entre los antibióticos analizados en el ensayo agudo, la neomicina fue la más tóxica, seguida del trimetoprim, el sulfametoxazol y el enrofloxacino. La sulfametazina, la oxitetraciclina, la clortetraciclina, la sulfadimetoxina y el sulfatiazol tuvieron una toxicidad intermedia, mientras que la ampicilina y la amoxicilina fueron menos tóxicas para los organismos de prueba. En el ensayo crónico, la neomicina afectó la reproducción y la supervivencia adulta de *D. magna* y *M. macrocopa* con niveles bajos de exposición a mg/L. Ellos concluyeron que se requieren más estudios que incluyan monitoreo y estudios toxicológicos detallados para evaluar el riesgo ecológico potencial de estos antibióticos veterinarios de uso frecuente.

van der Grinten et al. (2010) compararon la sensibilidad de algas, cianobacterias y bioensayos bacterianos a diferentes clases de antibióticos en un intervalo de concentraciones de 0.1 mg/L a 10 mg/L. En este estudio, no se observaron efectos para ninguno de los compuestos de prueba. Para trimetoprim, sulfametoxazol y estreptomicina, las cianobacterias eran más vulnerables que las algas verdes cuando se utilizaba la eficiencia fotosintética como punto final.

Li et al. (2014) encontraron que el difloxacino y el moxifloxacino exhibieron un notable efecto tóxico sobre la fotobacteria *V. fischeri* entre las 21 quinolonas analizadas, con un 20% de concentraciones inhibitorias para la eliminación de luminiscencia (CLI_{20}) de 19 y 23 µmol/L. Aunque las quinolonas mostraron una toxicidad aguda limitada para *V. fischeri*, se detectó una elevación de la toxicidad después de su cloración. Por lo tanto, el tratamiento de desinfección por cloración del agua que contiene quinolonas debería ser una preocupación.

Ebert et al. (2011) investigaron el efecto de inhibición del crecimiento por la presencia de fluoroquinolonas (enrofloxacino y ciprofloxacino) en cuatro especies acuáticas fotoautotrófas: la microalga de agua dulce *Desmodesmus subspicatus*, la cianobacteria *Anabaena flosaquae*, la macrófita monocotiledónea *Lemna minor* y la macrófita dicotiledónea *Myriophyllum spicatum*. Ambos antibióticos, que actúan inhibiendo la ADN girasa bacteriana, demostraron una alta toxicidad para *A. flosaquae* y *L. minor* y toxicidad moderada o leve para *D. subspicatus* y *M. spicatum*. La cianobacteria fue la especie más sensible con valores de CE_{50} de 173 y 10.2 mg/L para enrofloxacino y ciprofloxacino, respectivamente.

Rico et al. (2014) evaluaron el impacto ecológico del enrofloxacino en la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas de agua dulce tropicales. La fluoroquinolona se aplicó a concentraciones ambientalmente relevantes (1, 10, 100 y 100 µg/L) durante 7 días consecutivos en microcosmos externos de 600 litros. Los resultados de este estudio sugieren que no es probable que las concentraciones ambientalmente relevantes del antibiótico produzcan efectos tóxicos directos o

indirectos sobre la ecología de los microcosmos eutróficos tropicales de agua dulce (macroinvertebrados, zooplancton, fitoplancton, perifiton y bacterias).

A su vez, Wagil et al. (2014) informaron del riesgo ambiental moderado para el enrofloxacino, el norfloxacino y el ciprofloxacino, en función de su concentración de ocurrencia en dos ríos en el norte de Polonia y evaluaron la ecotoxicidad de estos antibióticos en cuatro especies diferentes de organismos acuáticos: bacterias bioluminiscentes marinas (*V. fischeri*), algas verdes (*Scenedesmus vacuolatus*), plantas (*L. minor* o lenteja de agua) y crustáceos (*D. magna*). Los resultados obtenidos demostraron que *L. minor* es la especie más sensible a los fármacos investigados con CE_{50} de 0.13 mg/L, 0.22 mg/L y 0.34 mg/L para norfloxacino, enrofloxacino y ciprofloxacino, respectivamente.

González-Pleiter et al. (2013) probaron la toxicidad de diferentes clases de antibióticos: amoxicilina, eritromicina, levofloxacino, norfloxacino y tetraciclina; en concentraciones entre 0.01 y 1500 mg/L, 0.001-10 mg/L, 0.01-200 mg/L, 0.01-100 mg/L y 0.01-100 mg/L, respectivamente en cianobacterias (*Anabaena*) y algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*), tanto en aislamiento, como en diferentes combinaciones. Los resultados sugieren que la eritromicina fue altamente tóxica para ambos organismos acuáticos. En la mayoría de los casos, los efectos nocivos de los antibióticos aumentaron cuando se combinaron con otros. Por lo tanto, los autores demostraron que los antibióticos pueden tener un efecto tóxico en los ecosistemas acuáticos cuando se mezclan con otras sustancias, incluso en concentraciones más bajas.

Oliveira et al. (2013) evaluaron los efectos subletales de la oxitetraciclina y la amoxicilina en embriones y adultos del pez cebra (*D. rerio*). La amoxicilina causó la eclosión prematura y malformaciones (como edema y deformidades de la cola), mientras que la oxitetraciclina causó el retraso en la eclosión de los embriones. Además, ambos antibióticos inhibieron la actividad de la enzima catalasa e indujeron la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa en los adultos expuestos. Sin embargo, sólo la oxitetraciclina indujo la actividad de la lactato deshidrogenasa, lo que indica que estos antibióticos son capaces de modificar la actividad enzimática normal en peces.

Elizalde-Velázquez et al. (2017) evaluaron el estrés oxidativo inducido por amoxicilina en cerebro, branquias, hígado y riñón de *Cyprinus carpio*. Las carpas fueron expuestas a tres concentraciones diferentes de dicho fármaco (10 ng/L, 10 µg/L y 10 mg/L) durante 12, 24, 48, 72 y 96 h, y se midieron los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Los resultados mostraron incrementos significativos en el grado de lipoperoxidación, el contenido de hidroperóxidos y de

proteínas carboniladas en todos los órganos del estudio, particularmente en riñón, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes.

2. Conclusiones

Los antibióticos son un grupo de fármacos ampliamente utilizados alrededor del mundo, tanto en humanos como en animales y en actividades económicas del sector primario como ganadería, acuacultura, agricultura y apicultura. Diversos estudios han reportado la presencia de antibióticos no sólo en efluentes de PTAR, sino también en aguas superficiales y aguas subterráneas e incluso en el agua potable. La información disponible sobre toxicidad ecológica está limitada a los efectos letales agudos. Para organismos acuáticos, tales como bacterias, algas, invertebrados y peces, la toxicidad aguda se observa generalmente a bajas concentraciones. Aunque los datos de toxicidad aguda pueden ser utilizados para predecir el daño por exposición a altas concentraciones, estos datos no pueden reflejar las consecuencias de la exposición ambiental real, la cual involucra generalmente bajas concentraciones, pero exposiciones a largo plazo.

Los resultados reportados por diferentes autores en diversos países permiten afirmar que las concentraciones ambientales de antibióticos son potencialmente dañinas para la vida acuática, produciendo efectos tóxicos sobre las bacterias y las algas, organismos que forman la base de los ecosistemas acuáticos.

La mayoría de los estudios realizados utilizaron un solo compuesto. Se sabe que los antibióticos de los mismos o diferentes grupos pueden tener un efecto aditivo, por esta razón, el impacto de los antibióticos en el ambiente se subestima. La posibilidad de su biodegradación en el ambiente actualmente no está bien estudiada. Además de que la presencia simultánea de varios antibióticos con otros productos farmacéuticos y/o xenobióticos puede resultar en un efecto sinérgico.

A pesar de los avances en el análisis químico, el desarrollo y la optimización de las metodologías para el análisis de antibióticos en muestras de agua ambiental, continúa siendo difícil y desafiante, debido principalmente a sus diversas propiedades fisicoquímicas y bajas concentraciones (ng/L) en el ambiente, y a la complejidad de las matrices ambientales acuosas.

3. Referencias

Alós, J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.03.001

Angulo, F. J., Nunnery, J. A., & Bair, H. D. (2004). Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1499

Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006

Batt, A. L., & Aga, D. S. (2005). Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1021/ac048512+

Björklund, H., Bondestam, J., & Bylund, G. (1990). Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90324-G

Blackwell, P. A., Kay, P., Ashauer, R., & Boxall, A. B. A. (2009). Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.070

Botitsi, E., Frosyni, C., & Tsipi, D. (2007). Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0804-8

Buchberger, W. W. (2007). Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta*. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.006

Buchberger, W. W. (2011). Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.040

Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025

Chang, H., Hu, J., Asami, M., & Kunikane, S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.057

Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., … Aminov, R. I. (2009). Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *Journal of Environment Quality*. https://doi.org/10.2134/jeq2008.0128

Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., & Goldbach, H. E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. https://doi.org/10.1002/aheh.200390014

Coyne, R., Hiney, M., O'Connor, B., Kerry, J., Cazabon, D., & Smith, P. (1994). Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture*. https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90117-1

Cromwell, G. L. (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*. https://doi.org/10.1081/ABIO-120005767

Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., … Alder, A. C. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.009

Ebert, I., Bachmann, J., Kühnen, U., Küster, A., Kussatz, C., Maletzki, D., & Schlüter, C. (2011). Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. https://doi.org/10.1002/etc.678

Elizalde-Velázquez, A., Martínez-Rodríguez, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., Rodríguez-Flores, J., … Gómez-Oliván, L. M. (2017). Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver, and kidney of common carp (Cyprinus carpio): The role of amoxicilloic acid. *Environmental Toxicology*. https://doi.org/10.1002/tox.22307

Errecalde, J. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Rome, Italy: FAO. Dirección de Producción y Sanidad Animal.

Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: Mode of action. *Animal Biotechnology*. https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., … Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.020

Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: A cross-national database study. *Lancet*. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)70799-6

Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *Clean - Soil, Air, Water*. https://doi.org/10.1002/clen.201300989

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., & Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3

Hernández-Serrano, P. (2005). *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. *FAO Fisheries Technical Paper*. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., & Guerrero, C. (2007). Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012

Heuer, O. E., Hammerum, A. M., Collignon, P., & Wegener, H. C. (2006). Food Safety: Human Health Hazard from Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Food. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(7), 911–916. https://doi.org/10.1086/507534

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., & Kratz, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4

Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.023

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017

Jacobsen, P., & Berglind, L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*. https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90120-2

Juhel-Gaugain, M., McEvoy, J. D. G., & VanGinkel, L. A. (2000). Measurements for certification of chlortetracycline reference materials within the European Union Standards, Measurements and Testing programme. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s002160000570

Karthikeyan, K. G., & Meyer, M. T. (2006). Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.030

Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002

Kim, S. C., & Carlson, K. (2007). Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental Science and Technology*. https://doi.org/10.1021/es060737+

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. https://doi.org/10.1021/es011055j

Kostopoulou, M., & Nikolaou, A. (2008). Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.011

Kümmerer, K. (2009a). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086

Kümmerer, K. (2009b). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023

Kümmerer, K. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00739.x

Lanzky, P. F., & Halting-Sørensen, B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00324-X

Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.020

Li, M., Wei, D., & Du, Y. (2014). Acute toxicity evaluation for quinolone antibiotics and their chlorination disinfection processes. *Journal of Environmental Sciences (China)*. https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.06.023

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica* (18a ed.). Madrid, España: Médica Panamericana.

Lorian, V. (2005). *Antibiotics in laboratory medicine* (5th editio). Lippincott Williams & Wilkins.

Lucas, M., Mestorino, N., & Errecalde, J. (2007). Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Vet*, *27*(1), 36–45.

Manzetti, S., & Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollution Bulletin*. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005

Martins, A. F., Vasconcelos, T. G., Henriques, D. M., Frank, C. da S., König, A., & Kümmerer, K. (2008). Concentration of ciprofloxacin in Brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. *Clean - Soil, Air, Water*. https://doi.org/10.1002/clen.200700171

Mcmanus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol*, *40*, 443–465. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927

Mestres, C., & Duran, H. (2012). *Farmacología en Nutrición*. Madrid, España: Médica Panamericana.

Migliore, L., Brambilla, G., Grassitellis, A., & Dojmi di Delupis, G. (1993). Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in Artemia (Crustacea, Anostraca). *International Journal of Salt Lake Research*. https://doi.org/10.1007/BF02905906

Milić, N., Milanović, M., Letić, N. G., Sekulić, M. T., Radonić, J., Mihajlović, I., & Miloradov, M. V. (2013). Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment. *International Journal of Environmental Health Research*. https://doi.org/10.1080/09603123.2012.733934

Mölstad, S., Lundborg, C. S., Karlsson, A. K., & Cars, O. (2002). Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1080/00365540110080034

Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J. C. L., Soares, A. M. V. M., Nogueira, A. J. A., & Domingues, I. (2013). Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (Danio rerio). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.019

Pailler, J. Y., Krein, A., Pfister, L., Hoffmann, L., & Guignard, C. (2009). Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042

Park, S., & Choi, K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*. https://doi.org/10.1007/s10646-008-0209-x

Pavlović, D. M., Babić, S., Horvat, A. J. M., & Kaštelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.010

Peng, X., Tan, J., Tang, C., Yu, Y., & Wang, Z. (2008). Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry*. https://doi.org/10.1897/06-650.1

Petrović, M., Gonzalez, S., & Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1

Pozo, O. J., Guerrero, C., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E., & Hernández, F. (2006). Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.073

Pruden, A., Joakim Larsson, D. G., Amézquita, A., Collignon, P., Brandt, K. K., Graham, D. W., … Zhu, Y. G. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environmental Health Perspectives*. https://doi.org/10.1289/ehp.1206446

Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., & Petrović, M. (2007). Advanced mass spectrometric methods applied to the study of fate and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.10.002

Rico, A., Dimitrov, M. R., Van Wijngaarden, R. P. A., Satapornvanit, K., Smidt, H., & Van den Brink, P. J. (2014). Effects of the antibiotic enrofloxacin on the ecology of tropical eutrophic freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology*. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.008

Samanidou, V. F., Nikolaidou, K. I., & Papadoyannis, I. N. (2007). Advances in chromatographic analysis of tetracyclines in foodstuffs of animal origin - A review. *Separation and Purification Reviews*. https://doi.org/10.1080/15422110600822758

Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026

Schuster, A., Hädrich, C., & Kümmerer, K. (2008). Flows of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional, and nationwide level in Germany-is hospital effluent treatment an effective

approach for risk reduction? *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*. https://doi.org/10.1007/s11267-008-9183-9

Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A., & Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031

Seija, V., & Vignoli, R. (2016). Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*.

Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., … Jabučar, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.003

Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. https://doi.org/10.1002/jpln.200390023

Tong, L., Li, P., Wang, Y., & Zhu, K. (2009). Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.051

van der Grinten, E., Pikkemaat, M. G., van den Brandhof, E. J., Stroomberg, G. J., & Kraak, M. H. S. (2010). Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011

Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002

Vojinović-Miloradov, M., Turk-Sekulić, M., Radonić, J., Mihajlović, I., & Stosišć, M. (2011b). Emerging substances of concern – a shift in traditional thinking. In *15th International ECO-conference, 9th ECO-conference on "Environmental protection of urban and suburban settlements"* (pp. 256–271).

Vojinović-Miloradov, M., Turk-Sekulić, M., Radonić, J., Spanic, I., Kiurski, J., Milovanović, D., & Mihajlović, I. (2011a). Pseudo-persistent pollutant in the environment: emerging substance. In *Proceedings of the 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (pp. 180–184).

Wagil, M., Kumirska, J., Stolte, S., Puckowski, A., Maszkowska, J., Stepnowski, P., & Białk-Bielin´ska, A. (2014). Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence

in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.082

Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*. https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.005

Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585

Xu, W., Zhang, G., Zou, S., Li, X., & Liu, Y. (2007). Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.038

Zhao, J. L., Liu, Y. S., Liu, W. R., Jiang, Y. X., Su, H. C., Zhang, Q. Q., … Ying, G. G. (2015). Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.026

Capítulo 5

IMPACTO ECOTOXICOLÓGICO DEL 17a-ETINILESTRADIOL (EE2) EN AMBIENTES ACUÁTICOS.

Alejandro Mejía-García[1*]

Leobardo Manuel Gómez Oliván [1]

[1] Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón S/N, Colonia Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca de Lerdo, Estado de México.

* mejiagarciaa@gmail.com

Resumen

Los organismos vivos nos encontramos expuestos a una amplia variedad de sustancias químicas de origen natural y sintético, así como a compuestos derivados de actividades antropogénicas. Recientemente, los compuestos disruptores endócrinos (EDCs) han recibido una gran atención debido a los efectos que producen sobre el sistema endocrino. Los estrógenos esteroideos son considerados como disruptores endócrinos y se clasifican de acuerdo con su origen como estrógenosen naturales y sintéticos. En años recientes, la investigación se ha centrado en el estudio del 17α-etinilestradiol (EE2), un compuesto estrogénico sintético que se ha convertido en un problema generalizado de contaminación de ambientes acuáticos debido a su tendencia a (1) absorber materia orgánica, (2) acumularse en sedimentos y (3) concentrarse en la biota. EE2 es el ingrediente activo de los anticonceptivos orales y es usado en la terapia de reemplazo hormonal. El objetivo de esta revisión es brindar un panorama general acerca del EE2, abordando su presencia y métodos de eliminación o degradación de ambientes acuáticos, así como los efectos tóxicos en especies acuáticas. Se ha determinado la presencia de EE2 en ambientes acuáticos que abarca rangos de ng/L a mg/L en diversos países alrededor del mundo. Se han reportado efectos tóxicos en la fertilidad y la reproducción y promoción de la feminización e inducción de la vitelogenina (VTG) en peces machos adultos expuestos. Entre los métodos empleados para la eliminación o degradación de EE2 de los ecosistemas acuáticos destacan métodos físicos, químicos y biológicos, siendo estos últimos los más utilizados.

Palabras clave: 17a-etinilestradiol, EE2, EDC.

1. Introducción

Los organismos vivos nos encontramos expuestos a una amplia variedad de sustancias químicas de origen natural y sintético, así como a compuestos derivados de actividades antropogénicas. En los últimos años, los seres humanos han introducido cientos de nuevos compuestos sintéticos en el medio ambiente, muchos de ellos incluso han sido desarrollados de manera específica para influir en las funciones fisiológicas microbianas, de vegetales y de animales, teniendo un impacto tanto en los organismos individuales como en la dinámica de las poblaciones y en el funcionamiento de los ecosistemas, en particular los acuáticos (Propper, 2005).

Entre los principales contaminantes ambientales se han identificado compuestos que poseen actividad como pesticidas, compuestos industriales, metales pesados, productos para el cuidado personal, edulcorantes artificiales, fitoestrógenos y compuestos farmacéuticos activos, mismos que tienen las propiedades de alterar el equilibrio natural de los ecosistemas. Este delicado equilibrio puede estar en riesgo, debido al creciente número de contaminantes vertidos al medio ambiente que pueden acumularse en individuos expuestos y a los efectos adversos que provocan. Miles de productos químicos, algunos prohibidos y otros aún en uso, se han clasificado como contaminantes emergentes (Frye et al., 2012; Propper, 2005; Tran, Reinhard, & Gin, 2018).

Los efectos tóxicos generados por los contaminantes emergentes en ambientes acuáticos constituyen un aspecto de interés a nivel global. El término contaminante emergente se refiere a aquellas sustancias químicas, naturales o sintéticas, que se liberan constantemente a bajas concentraciones (generalmente en el orden de mg/L o ng/L) al medio acuático, fundamentalmente a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP, por sus siglas en inglés), como consecuencia de un amplio uso humano, así como a la dificultad para degradarse por los tratamientos aplicados en las plantas de tratamiento. Se trata de sustancias que, por lo general, son ubicuas y persistentes en ambientes acuáticos, no existiendo en la actualidad criterios que establezcan su regulación orientada a proteger la salud humana y ambiental y que gracias a la mejora en la sensibilidad de las técnicas analíticas, actualmente están siendo detectadas en ambientes acuáticos (Li, Dong, Weng, Chang, & Liu, 2015; Oropesa, Moreno, & Gómez, 2017).

Basados en el monitoreo de datos reportados en la literatura, los contaminantes emergentes pueden ser clasificados en diversas familias (Tran et al., 2018), entre las cuales se encuentran:

(1) Antibióticos.

(2) Agentes antifúngicos/antimicrobianos.

(3) Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

(4) Anticonvulsivos/antidepresivos.

(5) Edulcorantes artificiales.

(6) Agentes bloqueadores b-adrenérgicos.

(7) Plastificantes.

(8) Estrógenos esteroideos (Compuestos Disruptores Endócrinos)

(9) Medio de contraste de rayos X.

(10) Filtros UV.

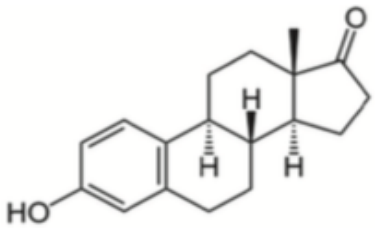
Recientemente, los compuestos disruptores endócrinos (EDC, por sus siglas en inglés) han recibido gran atención debido a los efectos que producen sobre el sistema endocrino (Goeppert, Dror, & Berkowitz, 2014). De acuerdo con el Comité Asesor para la Evaluación y Pruebas para Disruptores Endócrinos (EDSTAC, por sus siglas en inglés), los disruptores endócrinos se definen como "una sustancia o mezcla química exógena que altera la estructura o función (es) del sistema endocrino y causa efectos adversos a nivel del organismo, su progenie, poblaciones o subpoblaciones de organismos, con base en principios científicos, datos, evidencia de peso y el principio de precaución". Los compuestos disruptores endócrinos tienen la capacidad de alterar varios aspectos de la señalización endocrina al imitar, antagonizar o alterar los niveles de esteroides endógenos (andrógenos o estradiol) a través de tasas cambiantes de su síntesis o metabolismo y/o expresión o acción en los receptores objetivo, teniendo un efecto deletéreo en procesos biológicos esenciales para la homeostasis tales como la reproducción, el crecimiento, el metabolismo, las concentraciones de los iones calcio, potasio y sodio, la inducción de obesidad e incluso cambios epigenéticos que pueden ser heredables, entre otros (Cooke, Simon, & Denslow, 2013; EPA, 2014; Frye et al., 2012).

Los compuestos estrogénicos están considerados entre las subclases más representativas de los EDCs, según lo definido por EDSTAC, y son los compuestos más ampliamente estudiados debido a sus efectos adversos sobre la vida silvestre como la feminización de peces machos expuestos. Los estrógenos esteroideos naturales como la estrona (E1), el estradiol (E2) y el estriol (E3) son eliminados principalmente a través de las heces y la orina en los humanos y el ganado, mientras que los estrógenos sintéticos, como el 17α-etinilestradiol (EE2), son usados como anticonceptivos y productos químicos industriales (Desbrow, Routledge, Brighty, Sumpter, & Waldock, 1998; Fernandez, Ikonomou, & Buchanan, 2007; Hanselman, Graetz, Wilkie, Szabo, & Diaz, 2006; Larsson et al., 1999; Mills & Chichester, 2005).

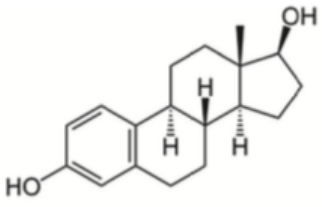
1.1 Estrógenos esteroideos

Los estrógenos esteroideos se clasifican de acuerdo a su origen como estrógenos naturales o sintéticos y son compuestos que tienen la capacidad de actuar como disruptores endócrinos (Adeel, Song, Wang, Francis, & Yang, 2017). Los estrógenos esteroideos son hormonas biológicamente activas que derivan del colesterol y, una vez que son sintetizadas durante el proceso denominado esteroidogénesis, son liberadas por la corteza suprarrenal, los testículos, los ovarios y la placenta, tanto en humanos como en animales. Los compuestos estrogénicos también se han encontrado en plantas (Hamid & Eskicioglu, 2012; Ying, Kookana, & Ru, 2002).

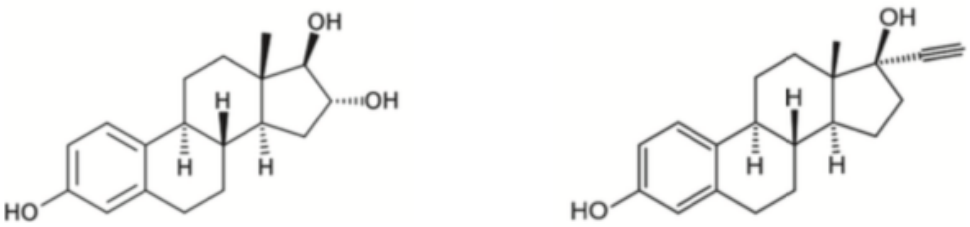
Todos los estrógenos esteroideos, naturales y sintéticos, están relacionados estructuralmente; comparten la misma estructura tetracíclica formada por cuatro anillos: un grupo fenólico, dos anillos de ciclohexano y un ciclopentano. Las variaciones estructurales generalmente ocurren en los grupos funcionales de los átomos de carbono 16 y 17. Por ejemplo, la estrona (E1) posee un grupo carbonilo (C=O) en el C-17 mientras que el estradiol (E2) presenta un grupo hidroxilo (OH); el grupo hidroxilo en el C-17 de E2 puede presentar una orientación hacia abajo o hacia arriba en el plano molecular, formando los compuestos 17a- o 17β-estradiol. Por otra parte, el estriol (E3) posee dos grupos hidroxilo localizados en los carbonos 16 y 17; la adición de un grupo etinil en el C-17 de E2 produce el 17a-etinilestradiol o también conocido como EE2, convirtiéndolo en un compuesto muy estable. Los estrógenos conjugados, que también son peligros ambientales potenciales, se forman mediante la esterificación de los agentes libres por los grupos glucurónidos y sulfato en las posiciones de C-3 y/o C-17 (Hamid & Eskicioglu, 2012; Khanal et al., 2006; Nash et al., 2004; Neef, 1999; Örn, Yamani, & Norrgren, 2006). En la figura 1 se muestran las estructuras químicas de los principales estrógenos esteroideos naturales y sintéticos.



Estrona (E1)



Estradiol (E2)



Estriol (E3) 17a-etinilestradiol (EE2)

Figura 1. Estructuras químicas de estrógenos esteroideos naturales y sintéticos . Tomado de (Aris, Shamsuddin, & Praveena, 2014)

1.1.1 Propiedades fisicoquímicas de los estrógenos esteroideos

Los estrógenos esteroideos poseen propiedades fisicoquímicas muy similares entre sí debido a que su estructura química está estrechamente relacionada; es por ello que los valores correspondientes a diferentes parámetros físicos y químicos son muy parecidos, de manera particular entre la EE2 (que se presenta como polvo inodoro de color blanco-amarillento), y su precursor, el estradiol (E2) (National Toxicology Program, 2011).

La presión de vapor de los estrógenos esteroideos es extremadamente baja y casi insignificante, lo que hace que sea poco probable que se volatilicen; los valores oscilan entre 6.7×10^{-15} y 2.3×10^{-10} mmHg; la alta lipofilicidad se ve reflejada en su coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), siendo EE2 el estrógeno más lipofílico (valor de 4.14) en comparación con sus análogos naturales (valores de 3.43, 3.94 y 2.81 para E1, E2 y E3 respectivamente), lo que probablemente ocasione que EE2 sea más fácilmente absorbida por los organismos expuestos (Lai, Scrimshaw, & Lester, 2002; National Toxicology Program, 2011).

Si bien la solubilidad en agua de los estrógenos esteroideos es baja, éstos compuestos son solubles en diversos solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona y acetonitrilo. Específicamente, el 17a-etinilestradiol es soluble en etanol (1 parte de EE2 en 6 partes del solvente); en contraste, presenta una solubilidad en agua relativamente baja, 4.8 mg/L a 20 °C (Colman, Baldwin, Johnson, & Scholz, 2009; Feng et al., 2010; Li, Jiang, Liu, & Lv, 2013).

En la tabla 1 se muestran algunos valores de diferentes propiedades fisicoquímicas de los estrógenos esteroideos naturales y sintéticos. De éstas, se puede observar que EE2 es un compuesto orgánico, no polar e hidrófobo con baja volatilidad y probablemente el más resistente a la biodegradación en comparación

con compuestos relacionados, aunque el EE2 y el E2 poseen una estructura química similar (National Toxicology Program, 2011). Estas importantes propiedades fisicoquímicas colocan a 17a-etinilestradiol entre los compuestos que probablemente se bioconcentren rápidamente en la biota acuática, principalmente en peces (Lai et al., 2002).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los estrógenos esteroideos.

	Fórmula molecular	Peso molecular	Log K_{ow}	pKa	Presión de vapor (mm Hg)	Solubilidad en agua (mg/L) a 20°C	Log Kd
Estrógenos Naturales							
E1	$C_{16}H_{22}O_2$	270.4	3.43	10.3	2.3×10^{-10}	13	2.44-2.7
E2	$C_{18}H_{24}O_2$	272.4	3.94	10.6	2.3×10^{-10}	13	sd
E3	$C_{18}H_{24}O_3$	288.4	2.81	sd	6.7×10^{-15}	13	sd
Estrógenos Sintéticos							
EE2	$C_{20}H_{22}O_2$	296.4	4.14	10.4	4.5×10^{-11}	4.8	2.65-2.86

sd: sin dato. Modificado de (Adeel et al., 2017; Aris et al., 2014).

1.2 17a-etinilestradiol (EE2)

En los últimos años, la investigación científica se ha centrado en el estudio del 17α-etinilestradiol, un compuesto estrogénico sintético que se ha convertido en un problema generalizado de contaminación de ambientes acuáticos debido a su alta resistencia al proceso de degradación y su tendencia a (1) absorber materia orgánica, (2) acumularse en sedimentos y (3) concentrarse en la biota (Wit et al., 2010).

17α-etinilestradiol es el ingrediente activo de los anticonceptivos orales y es utilizado para prevenir el embarazo al inhibir la ovulación y en la terapia de reemplazo hormonal para el tratamiento de trastornos post-menopáusicos (Notelovitz, 2006; Pérez-Campos, 2010). La potencia de EE2 es aproximadamente 30 veces mayor que la de estradiol (Nash et al., 2004; Örn et al., 2006; Van den Belt, Berckmans, Vangenechten, Verheyen, & Witters, 2004). A nivel mundial, la producción y el consumo anual de 17α-etinilestradiol se estima alrededor de 907.18 kg (Vosges, Braguer, & Combarnous, 2008).

17a-etinilestradiol se absorbe rápidamente por administración oral en humanos. Las concentraciones plasmáticas alcanzan un punto máximo después de 2

h y disminuyen a la concentración mínima en 24 h, presentando una vida media de aproximadamente 18 h (DiLiberti, O'Leary, Hendy, Waters, & Margolis, 2011; Pérez-Campos, 2010).

1.3 Presencia del EE2 en ambientes acuáticos: estudios de ocurrencia

Las píldoras anticonceptivas, los antibióticos, los anti-inflamatorios y los antidepresivos son ejemplos de productos farmacéuticos que son liberados al medio ambiente acuático con mayor frecuencia; estos compuestos generalmente han sido detectados en aguas superficiales y/o influentes/efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en concentraciones que se encuentran en el rango de mg/L a ng/L (Falconer, Chapman, Moore, & Ranmuthugala, 2006; Kolpin et al., 2002; Trudeau, Metcalfe, Mimeault, & Moon, 2005). Los estrógenos esteroideos naturales y sintéticos excretados por los humanos se encuentran entre los compuestos disruptores endócrinos más potentes (Fernandez et al., 2007), que son introducidos al ambiente acuático a través de varias rutas, de las cuales se han identificado varias fuentes clasificadas como puntuales y no puntuales. En las ciudades, por ejemplo, las descargas de aguas residuales sin previo tratamiento (Saravanabhavan, Helleur, & Hellou, 2009) y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs, por sus siglas en inglés) son consideradas como las principales fuentes puntuales que contaminan los cuerpos de agua receptores (Jobling et al., 2002; Lishman et al., 2006; Wierman, 2007; Wise, O'Brien, & Woodruff, 2011); otras fuentes de contaminación incluyen: a los efluentes hospitalarios y las actividades ganaderas, que también contribuyen de manera significativa en el aporte ambiental de compuestos estrogénicos que contaminan las aguas superficiales y subterráneas, entre otros (Arnon et al., 2008; Bartelt-Hunt, Snow, Damon-Powell, & Miesbach, 2011; Pereira, Postigo, de Alda, Daniel, & Barceló, 2011; Soto et al., 2004; Ying et al., 2002).

El nivel y la forma de contaminación varía dependiendo de la zona geográfica específica. Por ejemplo, los efluentes de las WWTPs municipales vertidos en los ríos próximos a ellas tendrán una mezcla diferente de compuestos en comparación con las áreas adyacentes a los campos agrícolas; las aguas residuales que contienen compuestos estrogénicos son descargadas en los ríos mientras que los lodos son utilizados como fertilizantes (Propper, 2005; Vulliet & Cren-Olivé, 2011).

En relación al nivel de hormonas detectadas en ambientes acuáticos, el 17a-etinilestradiol es el principal compuesto que se ha detectado, encontrándose en concentraciones máximas de 0.83 mg/L en aguas del arroyo Itchepackesassa, localizado en Florida, E.U. (Kolpin et al., 2002) y 22.8 ng/g en sedimentos del río Anoja, en España (Lopez & Alda, 2001); generalmente, los compuestos detectados en sedimentos pueden ser categorizados en cuatro clases: (1) residuos

farmacéuticos (diclofenaco, amoxicilina, entre otros), (2) hormonas estrogénicas (E1, E2 y EE2), (3) xenoestrógenos fenólicos como bisfenol-A y (4) pesticidas (diazinon). Omar y colaboradores en 2018, determinaron la presencia de EE2 en muestras de sedimentos colectados en estuarios del río Klang (Malasia), impactados por actividades antropogénicas, en concentraciones en el rango de 0.12 a 5.88 ng/g (Omar, Aris, Yusoff, & Mustafa, 2018).

Pessoa y colaboradores (2014) determinaron en muestras de influentes y efluentes de WWTPs en Ceará, Brasil, la ocurrencia en un 52% de 17a-etinilestradiol, encontrándose en concentraciones máximas de 3,180 y 176 ng/L en influentes y efluentes, respectivamente (Pessoa et al., 2014).

Estrógenos esteroideos fueron detectados en plantas de tratamiento de aguas residuales localizadas en la región suroeste de Ontario, Canadá (2012); en el estudio realizado por Atkinson y colaboradores, las concentraciones máximas detectadas de E1, E2 y EE2 fueron 104, 66.9 y 5.7 ng/L, respectivamente (Atkinson et al., 2012). Manickum y John, en 2014, encontraron concentraciones máximas en influentes y efluentes de WWTPs, localizadas en la región de Pietermaritzburg (Sudáfrica), de 95 y 8 ng/L; así mismo, se analizó el perfil de estrógenos esteroideos presentes en los ríos próximos a las plantas de tratamiento, encontrándolos en concentraciones promedio de 3 ng/L (río arriba) y 4 ng/L (río abajo) (Manickum & John, 2014).

Existen varios aspectos importantes a tener en consideración al analizar la variación en las concentraciones encontradas de estrógenos esteroideos en ambientes acuáticos: 1) las actividades antropogénicas realizadas en las zonas de análisis y/o a la efectividad de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Ejemplo de esto lo reportan Dotan y colaboradores en 2016, al analizar la presencia de EE2 en muestras recolectadas de plantas de tratamiento de aguas residuales de Israel y Palestina, quienes comparten la misma región geográfica pero difieren en la reutilización de sus aguas residuales; en Israel, por ejemplo, el 90% de las aguas residuales son tratadas y el 86% se reutiliza para actividades de irrigación, sin embargo y en contraste, en Palestina únicamente el 20-35% de las aguas residuales son tratadas y no se reutilizan; 2) la época del año en la cual se realiza el análisis, en el caso particular de EE2, Manickum y John indicaron que, sin importar la estación de análisis, el etinilestradiol siempre se detecta en concentraciones superiores a estriol (E3), pero por debajo de E1/E2 en Pietermaritzburg, Sudáfrica y 3) fenómenos de bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación, para la evaluación de estrógenos esteroideos en la biota acuática. La bioacumulación puede definirse como la cantidad neta disponible de un producto químico después de un periodo de absorción, eliminación y metabolismo; generalmente se asocia con la exposición ambiental donde la biota se expone a través de múltiples vías incluyendo agua, alimentos y sedimentos. Por otra parte, la bioconcentración únicamente considera como fuente de exposición al agua. La tendencia de un producto químico a

biomagnificarse está determinada por el aumento de la concentración del producto químico en cuestión en los organismos con cada aumento gradual dentro de la cadena trófica para esa red alimentaria (Dotan et al., 2016; Gobas & Morrison, 2000; Manickum & John, 2014). En la tabla 2 se muestran algunos datos de concentraciones encontradas de 17a-etinilestradiol (EE2) en diferentes países y muestras analizadas.

Tabla 2. Concentraciones de EE2 en agua, sedimento y biota en el mundo

Agua		Sedimento		Biota	
Fuente	EE2 (ng/L)	Fuente	EE2 (ng/g)	Fuente	EE2 (ng/g lípido)
Estuario del río Aushet; E.U.	3.0 - 4.6	Río Ouse; Londres	nd - 0.04	*Mytilus galloprovicialis* (Laguna Venecia)	3.0 - 38.0
Agua Superficial; Irán	0.01 - 2.0	Manglar Itacorubi; Brasil	133.6	Tilapia (Laguna Yundang; China)	nd
Ría Würm; Alemania	0.3 - 0.7	Malabar Sidney; Australia	0.05 - 5.0	*Moxostoma macrolepidotum* (Ría St. Claire; Canadá)	20.2 -78.1
Laguna Venecia, cerca de la bahía del mar Adriático	0.8 - 34.0	Laguna Venecia	2.0 - 41.0	*Sparus latus* (Laguna Yundang; China)	2.71

nd: no detectado. Modificado de (Aris et al., 2014).

1.4 Efectos tóxicos ocasionados por EE2 en especies acuáticas

Muchas especies acuáticas como peces, anfibios, reptiles acuáticos y mamíferos, están expuestas diariamente a elevadas concentraciones de diversos contaminantes ambientales, como los compuestos disruptores endócrinos (incluidos los estrógenos esteroideos). Cuando son liberados a los ambientes acuáticos y la biota, los estrógenos esteroideos tienen la capacidad de modular o mimetizar la actividad de los estrógenos endógenos, interfiriendo con la función natural del sistema endócrino, ocasionando efectos adversos a la salud de las especies acuáticas (Campbell et al., 2006; Jobling & Tyler, 2003).

Los peces representan uno de los elementos clave para la evaluación del estado ecológico del ambiente acuático, ya que actúan como bioindicadores de la contaminación en dichos sistemas (Hermoso, Clavero, Blanco-Garrido, & Prenda, 2010). Las toxinas y las sustancias químicas, incluidos los estrógenos esteroideos, pueden entrar en contacto con los peces a través de diferentes vías como las branquias y/o la piel, absorbiendo los compuestos directamente del medio que los rodea o bien a través de la vía gastrointestinal mediante la ingestión de alimentos. En peces teleósteos, las branquias ponen de manifiesto las concentraciones de contaminantes ambientales presentes en el agua, mientras que el hígado y el riñón son los órganos metabólicamente activos con capacidad de acumular dichos compuestos (Lien & McKim, 1993; Oropesa et al., 2017).

De manera particular, las poblaciones de peces que viven rio abajo de las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden estar expuestas de manera crónica a bajas concentraciones (ng/L o ng/g) de EE2 y de estrógenos esteroideos naturales como estrona, estradiol y estriol (E1, E2 y E3, respectivamente), a través de distintas vías de exposición incluidas el agua, las algas, los microorganismos y los sedimentos (Cailleaud et al., 2011; Della Greca et al., 2008; Dussault, Balakrishnan, Borgmann, Solomon, & Sibley, 2009; Flores-Valverde, Horwood, & Hill, 2010; Khanal et al., 2006; Peng, Wang, Yang, Chen, & Mai, 2006; Pereira et al., 2011).

Para estudiar los efectos de los EDCs en animales acuáticos, los embriones y las larvas son, generalmente, incubados en agua que contiene concentraciones definidas de los compuestos en estudio; sin embargo, la cantidad neta de captación del disruptor endócrino en el animal a menudo es difícil de determinar. Souder y Gorelick (2018), desarrollaron un método en el cual mediante el uso de ^{3}[H]-EDC se determinó que < 5% de 17a-etinilestradiol es captado por embriones de *Danio rerio* después de 24 horas y que dicha captación es dependiente de la concentración, de la duración de la exposición y del estado de desarrollo del embrión (Souder & Gorelick, 2018). Estudios realizados sobre la evaluación de los efectos tóxicos provocados por la exposición a estrógenos esteroideos utilizando a *Dario rerio* como bioindicador demostraron que, tras la exposición a largo plazo de 17a-etinilestradiol (75 días; 5 ng/L), se incrementó el tamaño y el peso corporal de las hembras expuestas, además, se observaron alteraciones en el comportamiento locomotor (incluidos parámetros como reducción en el tiempo de natación,

aumento de la inmovilidad y movimientos erráticos) y los trastornos fisiológicos (Basavaraj & Pancharatna, 2017).

Los órganos reproductivos son, a menudo, los órganos diana de los EDCs estrogénicos en animales, provocando en ellos alteraciones tanto en la capacidad como en la fisiología reproductiva. Diversos estudios en peces han demostrado alteraciones a nivel reproductivo ocasionadas por la exposición a compuestos disruptores endócrinos. La exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de EE2 afectan la fertilidad y la reproducción, promoviendo la feminización y la inducción de la vitelogenina (VTG) en peces machos adultos expuestos incluidos *Danio rerio*, *Onchorynchus mykiss* y *Pimephales promelas*, entre otros. Se ha reportado también que la exposición continua a EE2 en el pez macho de *Danio rerio* inhibe la espermatogénesis y reduce el tamaño de los testículos, disminuyendo la fecundidad y el éxito de la fertilización (Corcoran, Winter, & Tyler, 2010; Lange et al., 2012; Rose et al., 2002; Santos et al., 2007; Scholz, Kordes, Hamann, & Gutzeit, 2004; Seki et al., 2002; Van den Belt, Wester, Van der Ven, Verheyen, & Witters, 2002).

En años recientes, el riesgo potencial de EDCs en organismos no diana ha recibido una gran atención. Geng y colaboradores (2018), demostraron que el quinestrol, un compuesto derivado de 17a-etinilestradiol, podría acumularse y biotransformarse en la planta acuática *Spirodela polyrhiza*; además, demostraron que redujo el contenido de biomasa y pigmento, e incrementó los niveles de actividad de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el contenido de malondialdehído (MDA) (Geng et al., 2018). Por otra parte, EE2 en una concentración de 10 ng/L, provocó un incremento de 215 veces el nivel de expresión de mRNA de *lhb* (hormona luteinizante subunidad b, que actúa como biomarcador de la exposición a estrógenos) y 6670 veces el nivel de mRNA de la vitelogenina hepática, en comparación con grupos control, en *Oncorhynchus kisutch*; mientras que el uso de concentraciones subletales de EE2 (concentraciones en el rango de 0.1 a 10 mg/L) afectaron el desarrollo sexual de *Hyalella azteca*. Dichos efectos fueron evidenciados mediante la observación de aberraciones histológicas en el tracto reproductivo, principalmente: indicaciones de hermafroditismo, maduración alterada de las células germinales y espermatogénesis perturbada en machos expuestos; por otra parte, estudios realizados en *Oryzias melastigma* revelaron diferencias en la respuesta biológica dependiente del sexo, posterior a la exposición de peces machos con 17a-etinilestradiol. El contacto directo con la hormona estrogénica a concentraciones de 33 ng/L, fue suficiente para mantener las deficiencias en la competencia inmunitaria y el rendimiento reproductivo, en comparación con las hembras, así como la desregulación de los genes de la función inmunitaria *in vivo*. En *Pimephales promelas,* la exposición a EE2 (100 mg/L) ocasionó malformaciones vertebrales hasta en el 62% de los peces

expuestos; las lesiones incluyeron fusión ósea y curvaturas espinales. Se ha reportado que la exposición a 17a-etinilestradiol provoca alteraciones relacionadas con el desarrollo sexual y alteraciones neuroconductuales en anfibios e inversión sexual, así como efectos fisiológicos relacionados con el sexo en reptiles acuáticos (Bhandari et al., 2015; Harding et al., 2016; Vandenbergh, Adriaens, Verslycke, & Janssen, 2003; Warner & Jenkins, 2007; Ye et al., 2018).

1.5 Métodos de eliminación o degradación de EE2 en ambientes acuáticos

A pesar del uso de métodos mecánicos y biológicos avanzados para el tratamiento de aguas residuales, los compuestos disruptores endócrinos penetran en el medio y afectan negativamente a los organismos que viven en los ambientes acuáticos, como los ríos y los reservorios, en donde son descargadas las aguas residuales tratadas. La sorción y la biodegradación son los principales mecanismos utilizados para la eliminación de EDCs, provenientes tanto de matrices sólidas como matrices líquidas. La adsorción representa un método prometedor para la eliminación de contaminantes emergentes, ya que posee un costo inicial de implementación relativamente bajo, presenta una eficiencia elevada y consta de un diseño operativo simple. La investigación ha demostrado que la aplicación de diferentes materiales adsorbentes tales como carbones activados (CA), biochars modificados (BM), nano adsorbentes (compuestos por nanotubos de carbono y grafeno), adsorbentes compuestos y otros se están utilizando actualmente para la eliminación de contaminantes emergentes de las aguas residuales (Carmalin & Lima, 2018)

Loffredo, Castellana y Senesi (2014) evaluaron la eliminación simultánea de diversos compuestos disruptores endócrinos en lixiviados obtenidos a partir de rellenos sanitarios municipales, incluido el 17a-etinilestradiol, utilizando un enfoque combinado de absorción/biodegradación. En el estudio fueron utilizadas diferentes matrices de absorción de origen orgánico (composta de café, por ejemplo) combinadas con el uso del hongo *Pleurotus ostreatus,* el cual está presente en productos de putrefacción, observándose una degradación del EE2 casi completa dentro de los primeros 20 días de tratamiento de aguas obtenidas de los rellenos sanitarios (Loffredo, Castellana, & Senesi, 2014).

Zuo y colaboradores en 2013 demostraron que el 17a-etinilestradiol presente en las aguas superficiales del lago Quinsigamond, Massachusetts, E.U., en una concentraciónde hasta 11.1 ng/L (concentración necesaria para producir efectos negativos sobre la reproducción de peces), fue capaz de sufrir fotodegradación bajo la irradiación de la luz solar, presentando una vida media de 23 horas y resultando ser un método más efectivo en comparación con la degradación microbiana llevada a cabo tanto en condiciones aerobias (vida media 108 horas) como en condiciones anaerobias (Zuo, Zhang, & Zhou, 2013).

Por otra parte, Sornalingam y colaboradores (2016) demostraron que la eficiencia de degradación de compuestos estrogénicos en procesos de fotodegradación es mayor bajo la luz UV en comparación con la irradiación de la luz solar; también determinaron que el dióxido de titanio (TiO_2) es el mejor catalizador utilizado en procesos de fotocatálisis de compuestos disruptores endócrinos, utilizado en concentraciones en el rango de 0.05 a 1.0 g/L, debido a su estabilidad química, disponibilidad comercial, capacidad para funcionar en condiciones ambientales y baja toxicidad (Sornalingam, McDonagh, & Zhou, 2016).

Los compuestos disruptores endócrinos, en particular el estradiol y el 17a-etinilestradiol, son susceptibles a bioconcentrarse en ambientes acuáticos y poseen un elevado potencial para bioacumularse. Las plantas de tratamiento de aguas residuales se identifican como una de las principales fuentes de contaminación de cuerpos acuáticos y, de manera paradójica, dichas plantas de tratamiento no están diseñadas para remover los compuestos estrogénicos. Para proporcionar una alternativa a dicha problemática, Maurício y colaboradores (2018), usando un sistema optimizado de rotación de contacto (RBC, por sus siglas en inglés), el cual ha sido empleado para remover estrógenos en plantas de tratamiento de aguas residuales, determinaron una eficiencia por encima de 15% al utilizar dicho método para eliminar EDCs de ambientes acuáticos (Maurício et al., 2018).

También se ha demostrado la eficacia para remover compuestos estrogénicos de ambientes acuáticos mediante el uso de plantas de rábano (*Raphanus sativus L.)* y de Ryegrass (*Lolium perenne L.)*, mostrando una reducción significativa de EE2 en los cuerpos de agua en donde están presentes ambas plantas. Se demostró que en un periodo de 5 días *Raphanus sativus L.* logró eliminar el 100% de 17a-etinilestradiol y la *Lolium perenne L.* alcanzó una eliminación del 74% en un periodo de 6 días. La considerable capacidad probada de ambas plantas para eliminar contaminantes estrogénicos, pone de manifiesto las ventajas del uso de la fitorremediación como un método nuevo y eficaz para la remoción de EDCs (Gattullo, Barboza Cunha, Rosa, & Loffredo, 2013).

Diferentes tecnologías han sido utilizadas para la eliminación o degradación de compuestos disruptores endócrinos. Dichas tecnologías incluyen métodos físicos, químicos y biológicos, siendo estos últimos los más utilizados y entre ellos se incluyen: lodos activados, biorreactores de membrana, biorreactores aerobios y anaerobios, biorreactores de microalgas y fúngicos, reactor de rotación, nitrificación, tratamientos enzimático y biosorción. Entre los métodos químicos más ampliamente utilizados se encuentran: métodos de oxidación convencionales como Fenton, ozonización, fotólisis y procesos de oxidación avanzada (foto-Fenton y fotocatálisis). En años recientes se han utilizado sistemas híbridos (combinaciones de dos o más tecnologías) con el propósito de mejorar las tasas de eliminación de los EDCs de los ambientes acuáticos (Ahmed et al., 2017). Las principales ventajas de los diferentes

procesos empleados para la eliminación o degradación de compuestos disruptores endócrinos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Principales ventajas de diversos procesos/tratamientos utilizados para la eliminación o degradación de compuestos disruptores endócrinos

Proceso / Tratamiento	Ventajas
Convencionales	
Carbón activado	1. Eliminación de una amplia gama de EDCs en aguas residuales. 2. Eliminación de productos residuales de desinfección/oxidación. 3. No se generan productos tóxicos activos.
Lodos activados	1. Disminución en costos operativos comparado con procesos de oxidación avanzada. 2. Más amigable con el medio ambiente comparado con la cloración
No convencionales	
Biorreactores de membranas	1. Eficaz para la eliminación de biorecalcitrantes y compuestos disruptores endócrinos
Procesos químicos	
Coagulación	1. Reducción de la turbidez por partículas inorgánicas y orgánicas suspendidas. 2. Aumento de la velocidad de sedimentación a través de la formación de partículas sólidas en suspensión.
Ozonización	1. Gran afinidad por compuestos disruptores endócrinos en presencia de H_2O_2
Fenton	1. Degradación y mineralización de EDCs
Fotocatálisis (TiO_2)	1. Uso de luz solar evitando la luz UV 2. Degradación de compuestos persistentes 3. Altas velocidades de reacción al usar el catalizador
Procesos físicos	
Nanofiltración	1. Aplicable para la remoción de metales pesados

	2. Tratamiento de influentes de plantas de tratamiento de aguas residuales
Ósmosis reversa	1. Tratamiento de influentes de plantas de tratamientos de aguas residuales 2. Remoción de compuestos disruptores endócrinos

Modificado de (Ahmed et al., 2017)

2. Conclusiones

Como se ha mencionado, los contaminantes emergentes son actualmente el blanco de investigación ecotoxicologica a nivel mundial, de manera particular, los compuestos disruptores endócrinos o EDCs. Ejemplos de dichos compuestos son los estrógenos esteroideos, los cuales han generado un particular interés debido a sus características fisicoquímicas inherentes y a la elevada presencia, especialmente, en ambientes acuáticos. Específicamente, el 17a-etinilestradiol o EE2 se ha convertido en un problema generalizado de contaminación de ambientes acuáticos y se han reportado concentraciones ambientalmente relevantes de dicho compuesto (rango de ng/L a mg/L) en cuerpos de agua, sedimentos y biota expuesta. La importancia de los EDCs es que han demostrado generar efectos tóxicos en la biota acuática, incluso a bajas concentraciones (ng/L), siendo capaces de modular o mimetizar la actividad de los estrógenos endógenos; de manera particular, entre los principales efectos tóxicos asociados a la exposición del 17a-etinilestradiol se encuentran alteraciones en el desarrollo sexual (inhibición de espermatogénesis y feminización de peces machos), neuroconductuales y de comportamiento locomotor.

Con todo lo anterior concluimos que aún es necesario desarrollar mayor investigación para evaluar el impacto que los compuestos disruptores endócrinos, específicamente el 17a-etinilestradiol, generan sobre el ambiente acuático, así como contribuir con evidencia suficiente que permita desarrollar nuevas tecnologías para eliminar compuestos disruptores endócrinos de los ambientes acuáticos de manera más eficiente, con bajos costos de implementación y de manera rápida y segura; para ello, una alternativa prometedora consiste en fusionar dos o más métodos (enfoque de absorción/biodegradación, por ejemplo) o la fitorremediación, la cual resulta ser efectiva y ambientalmente amigable. También, con mayor investigación realizada sobre la presencia y los efectos tóxicos generados por 17a-etinilestradiol sobre los organismos expuestos, incluido el humano, se podrán establecer las bases para una legislación sobre el uso y destino de los compuestos disruptores endócrinos, principalmente en aquellos países en vías de desarrollo.

3. Referencias

Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, *99*, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010

Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Ngo, H. H., Guo, W., Thomaidis, N. S., & Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, *323*, 274–298. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045

Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. (2014). Occurrence of 17α-ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*, *69*, 104–119. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.011

Arnon, S., Dahan, O., Elhanany, S., Cohen, K., Pankratov, I., Gross, A., Ronen, Z., Baram, S., & Shore, L. S. (2008). Transport of Testosterone and Estrogen from Dairy-Farm Waste Lagoons to Groundwater. *Environmental Science & Technology*, *42*(15), 5521–5526. https://doi.org/10.1021/es800784m

Atkinson, S. K., Marlatt, V. L., Kimpe, L. E., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L., & Blais, J. M. (2012). The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, *430*, 119–125. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.069

Bartelt-Hunt, S., Snow, D. D., Damon-Powell, T., & Miesbach, D. (2011). Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *Journal of Contaminant Hydrology*, *123*(3–4), 94–103. https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.12.010

Basavaraj B., G., & Pancharatna, K. (2017). Environmental estrogen(s) induced swimming behavioural alterations in adult zebrafish (Danio rerio). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *54*, 146–154. https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.001

Bhandari, R. K., Deem, S. L., Holliday, D. K., Jandegian, C. M., Kassotis, C. D., Nagel, S. C., … Rosenfeld, C. S. (2015). Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17α-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology*, *214*, 195–219. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.014

Cailleaud, K., Budzinski, H., Lardy, S., Augagneur, S., Barka, S., Souissi, S., & Forget-Leray, J. (2011). Uptake and elimination, and effect of estrogen-like

contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environmental Science and Pollution Research*, *18*(2), 226–236. https://doi.org/10.1007/s11356-010-0355-6

Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozei, E., & Stringfellow, W. T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, *65*(8), 1265–1280. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.003

Carmalin, S. A., & Lima, E. C. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *150*, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.026

Colman, J. R., Baldwin, D., Johnson, L. L., & Scholz, N. L. (2009). Effects of the synthetic estrogen, 17α-ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology*, *91*(4), 346–354. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.001

Cooke, P. S., Simon, L., & Denslow, N. D. (2013). *Endocrine Disruptors*. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00037-6

Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, *40*(4), 287–304. https://doi.org/10.3109/10408440903373590

Della Greca, M., Pinto, G., Pistillo, P., Pollio, A., Previtera, L., & Temussi, F. (2008). Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere*, *70*(11), 2047–2053. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.011

Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, *32*(11), 1549–1558. https://doi.org/10.1021/es9707973

DiLiberti, C. E., O'Leary, C. M., Hendy, C. H., Waters, D. H., & Margolis, M. B. (2011). Steady-state pharmacokinetics of an extended-regimen oral contraceptive with continuous estrogen. *Contraception*, *83*(1), 55–61. https://doi.org/10.1016/j.contraception.2010.06.015

Dotan, P., Godinger, T., Odeh, W., Groisman, L., Al-Khateeb, N., Rabbo, A. A., Tal, A., & Arnon, S. (2016). Occurrence and fate of endocrine disrupting compounds in wastewater treatment plants in Israel and the Palestinian West Bank. *Chemosphere*, *155*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.027

Dussault, È. B., Balakrishnan, V. K., Borgmann, U., Solomon, K. R., & Sibley, P. K. (2009). Bioaccumulation of the synthetic hormone 17α-ethinylestradiol in the benthic invertebrates Chironomus tentans and Hyalella azteca. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(6), 1635–1641. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.019

EPA. (2014). Executive Summary. *Obstetrics & Gynecology*, *123*(4), 896–901. https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000445580.65983.d2

Falconer, I. R., Chapman, H. F., Moore, M. R., & Ranmuthugala, G. (2006). Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environmental Toxicology*, *21*(2), 181–191. https://doi.org/10.1002/tox.20172

Feng, Y., Zhang, Z., Gao, P., Su, H., Yu, Y., & Ren, N. (2010). Adsorption behavior of EE2 (17α-ethinylestradiol) onto the inactivated sewage sludge: Kinetics, thermodynamics and influence factors. *Journal of Hazardous Materials*, *175*(1–3), 970–976. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.105

Fernandez, M. P., Ikonomou, M. G., & Buchanan, I. (2007). An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of The Total Environment*, *373*(1), 250–269. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.018

Flores-Valverde, A. M., Horwood, J., & Hill, E. M. (2010). Disruption of the Steroid Metabolome in Fish Caused by Exposure to the Environmental Estrogen 17α-Ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*, *44*(9), 3552–3558. https://doi.org/10.1021/es9039049

Frye, C., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kha, O., Katja, M., Le Page, Y., Patisaul, H. B., Venerosi, A., Wojtowicz, A. K., & Panzica, G. C. (2012). Endocrine Disrupters: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. *Journal of Neuroendocrinology*, *24*(1), 144–159. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x

Gattullo, C. E., Barboza Cunha, B., Rosa, A. H., & Loffredo, E. (2013). Removal of a combination of endocrine disruptors from aqueous systems by seedlings of radish and ryegrass. *Environmental Technology*, *34*(24), 3129–3136. https://doi.org/10.1080/09593330.2013.807854

Geng, Q., Li, T., Li, P., Wang, X., Chu, W., Ma, Y.,Ma, H., & Ni, H. (2018). The accumulation, transformation, and effects of quinestrol in duckweed (Spirodela polyrhiza L.). *Science of The Total Environment*, *634*, 1034–1041. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.030

Gobas, F., & Morrison, H. (2000). Bioconcentration and Biomagnification in the Aquatic Environment. In *Handbook of Property Estimation Methods for*

Chemicals (pp. 9.189 – 9.227). Florida: CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420026283.ch9

Goeppert, N., Dror, I., & Berkowitz, B. (2014). Detection, fate and transport of estrogen family hormones in soil. *Chemosphere*, *95*, 336–345. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.039

Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012). Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, *46*(18), 5813–5833. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002

Hanselman, T. A., Graetz, D. A., Wilkie, A. C., Szabo, N. J., & Diaz, C. S. (2006). Determination of steroidal estrogens in flushed dairy manure wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Quality*, *35*(3), 695–700. https://doi.org/10.2134/jeq2005.0282

Harding, L. B., Schultz, I. R., da Silva, D. A. M., Ylitalo, G. M., Ragsdale, D., Harris, S. I.,Bailey, S., Pepich, B. V., & Swanson, P. (2016). Wastewater treatment plant effluent alters pituitary gland gonadotropin mRNA levels in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Aquatic Toxicology*, *178*, 118–131. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.013

Hermoso, V., Clavero, M., Blanco-Garrido, F., & Prenda, J. (2010). Assessing the ecological status in species-poor systems: A fish-based index for Mediterranean Rivers (Guadiana River, SW Spain). *Ecological Indicators*, *10*(6), 1152–1161. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.03.018

Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (2002). Altered Sexual Maturation and Gamete Production in Wild Roach (Rutilus rutilus) Living in Rivers That Receive Treated Sewage Effluents1. *Biology of Reproduction*, *66*(2), 272–281. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.272

Jobling, S., & Tyler, C. R. (2003). Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology*, *126*(7), 103–107. https://doi.org/10.1017/S0031182003003652

Khanal, S. K., Xie, B., Thompson, M. L., Sung, S., Ong, S.-K., & van Leeuwen, J. (Hans). (2006). Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science & Technology*, *40*(21), 6537–6546. https://doi.org/10.1021/es0607739

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999−2000: A National

Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, *36*(6), 1202–1211. https://doi.org/10.1021/es011055j

Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2002). Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of The Total Environment*, *289*(1–3), 159–168. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01036-1

Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J. A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C. R., & Iguchi, T. (2012). Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquatic Toxicology*, *109*, 250–258. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.004

Larsson, D. G. ., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. ., Olsson, P.-E., & Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, *45*(2–3), 91–97. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00112-X

Li, H., Dong, Z., Weng, Q., Chang, C. C., & Liu, B. (2015). Emerging Pollutants – Part I: Occurrence, Fate and Transport. *Water Environment Research*, *87*(10), 1849–1872. https://doi.org/10.2175/106143015X14338845156425

Li, J., Jiang, L., Liu, X., & Lv, J. (2013). Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil–water system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *76*, 3–7. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.004

Lien, G. J., & McKim, J. M. (1993). Predicting branchial and cutaneous uptake of 2,2′,5,5′-tetrachlorobiphenyl in fathead minnows (Pimephales promelas) and Japanese medaka (Oryzias latipes): Rate limiting factors. *Aquatic Toxicology*, *27*(1–2), 15–31. https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90044-2

Lishman, L., Smyth, S. A., Sarafin, K., Kleywegt, S., Toito, J., Peart, T., Lee, B., Servos, M., Beland, M., & Seto, P. (2006). Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of The Total Environment*, *367*(2–3), 544–558. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.03.021

Loffredo, E., Castellana, G., & Senesi, N. (2014). Decontamination of a municipal landfill leachate from endocrine disruptors using a combined sorption/bioremoval approach. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(4), 2654–2662. https://doi.org/10.1007/s11356-013-2202-z

Lopez, M. J., & Alda, D. (2001). Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully

automated on-line solid-phase extraction – liquid chromatography – diode array detection. *Science*, *911*, 203–210. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00068-6

Manickum, T., & John, W. (2014). Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). *Science of The Total Environment*, *468–469*, 584–597. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.041

Maurício, R., Dias, R., Ribeiro, V., Fernandes, S., Vicente, A. C., Pinto, M. I., Noronha, J. P., Amaral, L., Coelho, P., & Mano, A. P. (2018). 17α-Ethinylestradiol and 17β-estradiol removal from a secondary urban wastewater using an RBC treatment system. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(6), 320. https://doi.org/10.1007/s10661-018-6701-8

Mills, L. J., & Chichester, C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of The Total Environment*, *343*(1–3), 1–34. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070

Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., … Tyler, C. R. (2004). Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environmental Health Perspectives*, *112*(17), 1725–1733. https://doi.org/10.1289/ehp.7209

National Toxicology Program. (2011). Estrogens, Steroidal. Report on Carcinogens. In *Department of Health and Human Services National Toxicology Program* (12 th, pp. 184–188). Retrieved from http://ntp.niehs.nie.gov

Neef, G. (1999). *Estrogens and Antiestrogens I*. (M. Oettel & E. Schillinger, Eds.) (135th ed., Vol. 135 / 1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58616-3

Notelovitz, M. (2006). Clinical opinion: the biologic and pharmacologic principles of estrogen therapy for symptomatic menopause. *MedGenMed : Medscape General Medicine*, *8*(1), 85. https://doi.org/523196 [pii]

Omar, T. F. T., Aris, A. Z., Yusoff, F. M., & Mustafa, S. (2018). Occurrence, distribution, and sources of emerging organic contaminants in tropical coastal sediments of anthropogenically impacted Klang River estuary, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*, *131*, 284–293. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.019

Örn, S., Yamani, S., & Norrgren, L. (2006). Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology Between Zebrafish and Japanese Medaka After Exposure to 17α-Ethinylestradiol and 17β-Trenbolone. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *51*(2), 237–243. https://doi.org/10.1007/s00244-005-0103-y

Oropesa, A., Moreno, J., & Gómez, L. (2017). Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes : recopilando y analizando datos. *Revista de Toxicología*, *34*, 99–108.

Peng, X., Wang, Z., Yang, C., Chen, F., & Mai, B. (2006). Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1116*(1–2), 51–56. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.017

Pereira, R. O., Postigo, C., de Alda, M. L., Daniel, L. A., & Barceló, D. (2011). Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, *82*(6), 789–799. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.082

Pérez-Campos, E. F. (2010). Ethinylestradiol/Dienogest in Oral Contraception. *Drugs*, *70*(6), 681–689. https://doi.org/10.2165/11536320-000000000-00000

Pessoa, G. P., de Souza, N. C., Vidal, C. B., Alves, J. A. C., Firmino, P. I. M., Nascimento, R. F., & dos Santos, A. B. (2014). Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, *490*, 288–295. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.008

Propper, C. R. (2005). The Study of Endocrine-Disrupting Compounds: Past Approaches and New Directions. *Integrative and Comparative Biology*, *45*(1), 194–200. https://doi.org/10.1093/icb/45.1.194

Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Nørum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., & Bjerregaard, P. (2002). Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *131*(4), 531–539. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00035-2

Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J. W., Workman, V. L., Holt, W. V., van Aerle, R., Kille, P., & Tyler, C. R. (2007). Gonadal transcriptome responses and physiological consequences of exposure to oestrogen in breeding zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology*, *83*(2), 134–142. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.019

Saravanabhavan, G., Helleur, R., & Hellou, J. (2009). GC–MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. *Chemosphere*, *76*(8), 1156–1162. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.006

Scholz, S., Kordes, C., Hamann, J., & Gutzeit, H. O. (2004). Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (Oryzias latipes):

comparison of gene expression and protein levels. *Marine Environmental Research*, *57*(3), 235–244. https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00082-5

Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H., & Kobayashi, K. (2002). Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in Medaka (Oryzias latipes). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(8), 1692. https://doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021<1692:EOEOTR>2.0.CO;2

Sornalingam, K., McDonagh, A., & Zhou, J. L. (2016). Photodegradation of estrogenic endocrine disrupting steroidal hormones in aqueous systems: Progress and future challenges. *Science of The Total Environment*, *550*, 209–224. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.086

Soto, A. M., Calabro, J. M., Prechtl, N. V., Yau, A. Y., Orlando, E. F., Daxenberger, A., … Sonnenschein, C. (2004). Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environmental Health Perspectives*, *112*(3), 346–352. https://doi.org/10.1289/ehp.6590

Souder, J. P., & Gorelick, D. A. (2018). Assaying uptake of endocrine disruptor compounds in zebrafish embryos and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *208*, 105–113. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.09.007

Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, *133*, 182–207. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029

Trudeau, V. L., Metcalfe, C. D., Mimeault, C., & Moon, T. W. (2005). Chapter 17 Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (pp. 475–493). https://doi.org/10.1016/S1873-0140(05)80020-7

Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., & Witters, H. (2004). Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17β-estradiol, estrone, 17α-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, *66*(2), 183–195. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.004

Van den Belt, K., Wester, P. W., Van der Ven, L. T. M., Verheyen, R., & Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (Danio rerio): time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*(4), 767–775. https://doi.org/10.1897/1551-5028(2002)021<0767:EOEOTR>2.0.CO;2

Vandenbergh, G. F., Adriaens, D., Verslycke, T., & Janssen, C. R. (2003). Effects of 17α-ethinylestradiol on sexual development of the amphipod Hyalella azteca. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *54*(2), 216–222. https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00030-1

Vosges, M., Braguer, J. C., & Combarnous, Y. (2008). Long-term exposure of male rats to low-dose ethinylestradiol (EE2) in drinking water: Effects on ponderal growth and on litter size of their progeny. *Reproductive Toxicology*, *25*(2), 161–168. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.12.002

Vulliet, E., & Cren-Olivé, C. (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution*, *159*(10), 2929–2934. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033

Warner, K. E., & Jenkins, J. J. (2007). Effects of 17 α-ethinylestradiol and bisphenol a en vertebral develeopment in the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *26*(4), 732. https://doi.org/10.1897/06-482R.1

Wierman, M. E. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advances in Physiology Education*, *31*(1), 26–33. https://doi.org/10.1152/advan.00086.2006

Wise, A., O'Brien, K., & Woodruff, T. (2011). Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water? †. *Environmental Science & Technology*, *45*(1), 51–60. https://doi.org/10.1021/es1014482

Wit, M. De, Keil, D., Ven, K. van der, Vandamme, S., Witters, E., & Coen, W. De. (2010). An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 α-ethinylestradiol in zebrafish (Danio rerio). *General and Comparative Endocrinology*, *167*(2), 190–201. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.003

Ye, R. R., Peterson, D. R., Kitamura, S. I., Segner, H., Seemann, F., & Au, D. W. T. (2018). Sex-specific immunomodulatory action of the environmental estrogen 17α-ethynylestradiol alongside with reproductive impairment in fish. *Aquatic Toxicology*, *203*, 95–106. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.019

Ying, G.-G., Kookana, R. S., & Ru, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, *28*(6), 545–551. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00075-2

Zuo, Y., Zhang, K., & Zhou, S. (2013). Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17α-ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study. *Environmental Science: Processes & Impacts*, *15*(8), 1529. https://doi.org/10.1039/c3em00239j

Capítulo 6

DESTINO, OCURRENCIA Y EFECTOS TÓXICOS DE EDULCORANTES ARTIFICIALES, UN NUEVO TIPO DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Livier Mireya Sánchez Aceves[1*]

Leobardo Manuel Gómez-Oliván [1]

Hariz Islas-Flores[1]

Marcela Galar-Martínez[2]

[1] Facultad de Química, Laboratorio de Toxicología Ambiental, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón S/N, Colonia Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca de Lerdo, Estado de México.

[2] Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

* livier.sanchez15@gmail.com

Resumen

Los edulcorantes artificiales son compuestos altamente consumidos alrededor del mundo como aditivos alimentarios seguros para consumo humano, sin embargo diversos estudios los señalan como contaminantes antropogénicos emergentes de gran importancia debido a su creciente uso, alta persistencia y ubicua presencia en los ecosistemas acuáticos. Ha sido demostrado que se trata de compuestos relativamente resistentes a los tratamientos convencionales de aguas residuales, por lo tanto su introducción al medio acuático se muestra continua y casi inevitable. Edulcorantes artificiales como la sucralosa, acesulfame-K, aspartame, ciclamato, sacarina, entre otros han sido aprobados para consumo humano por diversos organismos de seguridad alimentaria alrededor del mundo, sin embargo, a la fecha existen pocos estudios que señalen de forma específica sus fuentes de ingreso al ecosistema, distribución, comportamiento ambiental y destino, así como efectos ecotoxicológicos. Éste capítulo tiene por objetivo ser una compilación de los estudios que se han llevado a cabo sobre la ubicuidad, destino y efectos tóxicos generados por la presencia de edulcorantes artificiales en los ecosistemas acuáticos.

Palabras clave: Contaminantes Emergentes, Edulcorantes de Alta Intensidad EAI, Ocurrencia, Toxicidad.

1. **Edulcorantes como contaminantes emergentes**

1.1 Contaminantes emergentes

Son compuestos presentes en diferentes compartimentos ambientales a escala global, que no se encuentran sujetos a regulación para la protección de la salud humana o del ambiente. Son productos potencialmente tóxicos debido a que sus tasas de transformación y remoción se ven compensados por su constante ingreso al ecosistema, por lo que no necesitan ser persistentes para generar daño a la biota (Petrovic, González y Barceló, 2013).

De acuerdo a Ferrando-Climent *et al.* (2012) y Lange, Scheurer y Brauch (2012), los contaminantes de preocupación emergente se pueden englobar dentro de los siguientes apartados:

a) Nuevas sustancias químicas que no eran conocidas anteriormente o que han sido incluidas recientemente en la literatura científica

b) Compuestos que ya habían sido identificados como contaminantes pero que no han sido estudiados a profundidad

c) Contaminantes conocidos que están siendo estudiados y de los cuales se tiene nueva información sobre el riesgo ecotoxicológico que presentan para la salud humana.

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos como ingredientes farmacéuticos activos, productos de cuidado personal, pesticidas polares, hormonas, retardantes de llamas, plastificantes, nanopartículas, siloxanos, toxinas provenientes de algas, fragancias, compuestos perfluoroalquilados, parafinas cloradas, radionucleótidos, tierras raras, aditivos alimentarios, entre otros (Bolong *et al.*, 2009; Richardson, 2009; Thomaidis, Asimakopoulos y Bletsou, 2012; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013; Petrie, Barden y Kasprzyk-Hordern, 2014; Ribeiro *et al.*, 2015). Con la extensa gama de productos de distribución masiva, la ocurrencia y destino así como los efectos tóxicos de los contaminantes emergentes en los ambientes acuáticos, se ha convertido en un tema de gran preocupación en los últimos años (Sang *et al.,* 2014).

Ésta revisión comprende información sobre la ocurrencia, destino y efectos ambientales de los edulcorantes artificiales, aditivos de gran importancia para la industria alimentaria y farmacéutica cuyo estudio ha adquirido relevancia en los últimos años.

1.2. Edulcorantes artificiales

Desde el punto de vista de salud pública, el combate al sobrepeso y la obesidad se han convertido en objetos de particular interés por su asociación con el

incremento en el riesgo de padecer una variedad de enfermedades crónicas incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Brown, De Banate y Rother, 2010; Lange *et al.*, 2012; García, Casado y García, 2014). Los edulcorantes artificiales son utilizados como sustitutos de azúcar en cantidades considerables en alimentos y bebidas, especialmente aquellos dirigidos a personas con dietas especiales. Además de su uso como aditivos alimentarios, dichos compuestos también son incluidos en la formulación de diversos productos de cuidado personal y farmacéuticos por lo que son considerados productos químicos de uso cotidiano (Zygler, *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2014).

Por definición, edulcorante no calórico se refiere a un aditivo alimentario que mimetiza el sabor de la sacarosa proporcionando un aporte calórico nulo o poco significativo en términos nutricionales. Algunos edulcorantes no son metabolizados por el cuerpo humano, y por lo tanto no proveen calorías. Aún aquellos sustitutos de azúcar que si pueden se metabolizados, proveen calorías marginales a la dieta ya que son consumidos en dosis muy bajas debido a su alto poder edulcorante, varias magnitudes mayores al que posee la sacarosa (Scheurer, Brauch y Lange, 2014). Éstos aditivos son conocidos bajo diferentes denominaciones: edulcorantes de alta intensidad, edulcorantes bajos en calorías, edulcorantes no calóricos, edulcorantes no nutritivos, sustitutos de azúcar, edulcorantes libres de azúcar, etc (Brown *et al.*, 2010).

En la actualidad, los edulcorantes de alta intensidad (EAI) pertenecen al grupo de aditivos alimentarios más consumidos a nivel mundial (Suez *et al.*, 2015). La introducción de los EAI al mercado global se generó a partir de la necesidad de proveer sabor dulce a los alimentos a un bajo costo y con un aporte calórico nulo o poco significativo, reduciendo con ello el impacto negativo en la salud asociado al consumo de azúcares simples (Gardner *et al.*, 2012). EAI entre los cuales se encuentran el acesulfame K, aspartame, ciclamato, sacarina, sucralosa, taumatina, neohesperidina DC, las sales de aspartame, glicósidos de steviol y extractos de Luo Han Go, han sido aprobados por agencias de seguridad alimentaria en más de 70 países, entre ellas la FDA (*Food and Drugs Administration*) de los Estados Unidos, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (*Canadian Food Inspection Agency*), Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México. Desde su aprobación, los beneficios de su consumo han sido ampliamente cuestionados, debido a que, estudios de epidemiología en humanos y ciertos mamíferos, han demostrado una relación directa entre su ingesta y la ganancia de peso, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, incidencia de diabetes tipo 2 y problemas de control de la glicemia (Mace *et al.*, 2007; Dhingra *et al.*, 2007; Swithers, Baker y Davidson, 2009; Brown *et al.*, 2010; Nettleton, Reimer y Shearer 2016). La sucralosa y otros edulcorantes han sido identificados como contaminantes emergentes persistentes (Richardson y Kimura, 2017). Estudios alrededor del mundo han

demostrado que edulcorantes como sucralosa (SUC), acesulfame (ACE-K), sacarina (SAC), ciclamatos(CYC), aspartame (ASP) y sus productos de transformación son ampliamente encontrados en cuerpos de agua contaminados con aguas residuales y tratadas (Scheurer, Brauch y Lange, 2009; Richarson y Kimura, 2017), lo que indica su persistencia y bajas tasas de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales donde son empleados métodos de remoción convencionales como coagulación, floculación, sedimentación, filtración con membranas no biológicas, filtración con carbón activado, cloración, entre otros (Scheurer *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2011; Mckie, Andrews y Andrews, 2016). Dichas características los convierten en candidatos ideales para convertirse en marcadores de contaminación de aguas domésticas en ambientes acuáticos, particularmente en aguas subterráneas (Buergue *et al.*, 2009; Oppenheimer *et al.*, 2011; Mckie *et al.*, 2016).

Basados en evidencias científicas (Butchko y Stargel, 2001; *Food and Drugs Administration* FDA, 2006; Sharma *et al.*, 2016; Nichol, Holle y An, 2018), agencias de seguridad alimentaria alrededor del mundo (FDA, 2006; *European Union*, 2003) han concluido que los edulcorantes aprobados como aditivos alimentarios son seguros para la población bajo condiciones específicas de uso ya que a las dosis de consumo admisible no representan daños para la salud humana, sin embargo desde hace una década diversos estudios señalan a los edulcorantes artificiales como compuestos contaminantes que se encuentran en concentraciones importantes en cuerpos de agua (Scheurer *et al.*,2009; Robertson *et al.*, 2016), sin embargo las implicaciones ecotoxicológicas no han sido ampliamente estudiadas (Sang *et al.*, 2014).

1.3. Características de los principales edulcorantes artificiales.

Los edulcorantes artificiales han sido producidos de forma industrial desde finales del siglo XIX. El más antiguo de ellos, la sacarina (SAC) fue utilizado desde la Primera Guerra Mundial. En las décadas siguientes, otros edulcorantes como ciclamato (CYC), aspartame (ASP), acesulfame (ACE-K) y sucralosa (SUC) fueron sintetizados en estudios cuyo propósito no era la creación de aditivos alimentarios (Kokotou, Asimakopoulos y Thomaidis, 2012; Subedi *et al.*, 2015).

1.3.1 Sucralosa

Sucralosa (E955) es el nombre común para el 1,6-dicloro-1,6-dideoxi-β-D-fructofuranosil 1,4-cloro-4-deoxi-α-D-galactopiranosido (Tabla 1). Se trata de un edulcorante de alta intensidad sintetizado a partir del reemplazo selectivo de tres grupos hidroxilo de la sacarosa por tres átomos de cloro (Grice y Goldsmith, 2000).

Fue sintetizada por el Prof. Les Hough y colaboradores en la década de los 70's como resultado de un proyecto conjunto de investigación sobre edulcorantes realizado por Tate y Lyle y el Queen Elizabeth College de Londres (Molinary y Quinlan, 2006).Posee un poder edulcorante 600 veces mayor que la sacarosa, dos veces mayor que la SAC y tres veces mayor que ACE-K, no provee calorías, por lo tanto se trata de un edulcorante no nutritivo (Goldsmith y Merkel, 2001). Posee un sabor que difiere considerablemente del azúcar común y es térmicamente estable. Es un aditivo altamente consumido a nivel mundial, de forma individual o en mezclas con otros edulcorantes, y se puede encontrar en más de 4.500 alimentos (García *et al.*, 2013).

1.3.2 Acesulfame-K

El acesulfame potásico (E950) fue descubierto en el año 1967 por la farmoquímica alemana denominada Hoechst AG. Éste sustituto de azúcar posee un poder edulcorante 200 veces mayor que la sacarosa. Su consumo está permitido en más de 100 países en sus diferentes presentaciones, para consumo individual o formando parte de más de 5,000 productos procesados (Shankar, Ahuja y Sriram, 2013; Rother *et al.*, 2018; Cruz-Rojas *et al.*, 2019).Acesulfame potásico es uno de los edulcorantes artificiales no calóricos más consumidos a nivel mundial, su IDA es de 15 mg/kg de peso corporal y usualmente se consume como complemento de una mezcla con ASP o SUC debido a la sinergia que posee con dichos sustitutos de azúcar para proveer de un perfil de dulzor óptimo en gran variedad de alimentos (Shankar *et al.*, 2013). Comercialmente se le denomina acesulfame K, acesulfame potásico, o ACE-K. Los datos de toxicidad han demostrado que su consumo es seguro, sin embargo existen estudios que demuestran que posee actividad genotóxica e inhibidora de la fermentación glucídica por parte de la microbiota intestinal, además de poseer un papel activo en el metabolismo de mamíferos promoviendo la ganancia de peso y diferentes trastornos metabólicos (Pfeffer, Ziesenitz y Siebert, 1985; Byyopadhyay, Ghoshal y Mukherjee, 2008; Brown *et al.*, 2010; Bian *et al.*, 2017). La fórmula química así como estructura del compuesto se muestran en la Tabla 1.

1.3.3 Aspartame

Aspartame E951 (Tabla 1) es un edulcorante de alta intensidad obtenido de la síntesis de dos aminoácidos: ácido aspártico y fenilalanina, uno de ellos modificado por la unión de una molécula de metanol. Descubierto en 1965 por el químico G.D. Searle quien en la búsqueda de un compuesto para el tratamiento de úlceras gástricas, sintetizó el intermediario con alto poder edulcorante L-aspartil-L-

fenilalanina metil éster (Whitehouse, Boullata y McCauley, 2016; Zafar, Naik y Shrivastava, 2016). Desde su aprobación como aditivo alimentario hace más de 30 años (FDA, 2006), éste sustituto de azúcar se ha convertido en uno de los aditivos más consumidos en todo el mundo. Actualmente está presente en más de 6, 0000 alimentos procesados en el mercado, especialmente aquellos dirigidos para personas con dietas restringidas en azúcares. Posee un poder edulcorante 180 veces mayor que la sacarosa y no es resistente a temperaturas altas en medios ácidos, investigaciones sugieren la posibilidad de efectos neurológicos y de comportamiento observados en mamíferos debido a los productos de transformación metabólica de ASP (fenilalanina, ácido aspártico, dicetopiperazina y metanol) (Butchko y Stargel, 2001; Scheurer *et al.*, 2014; Whitehouse *et al.*, 2016). De acuerdo a Humphries, Pretorius y Naudé (2008), se ha observado que ASP altera el metabolismo de neurotransmisores, la estructura y metabolismo de proteínas incluidas diversas enzimas, integridad de los ácidos nucleicos, función neuronal, balances endócrinos, y concentraciones cerebrales de catecolaminas. Abhilash *et al.* (2011) observaron que el consumo a largo plazo de ASP altera el sistema antioxidante hepático y produce daño hepatocelular en ratas Wistar alimentadas durante 180 días con el edulcorante a concentraciones de 500 y 1000 mg kg^{-1} de peso corporal.

1.3.4 Sacarina

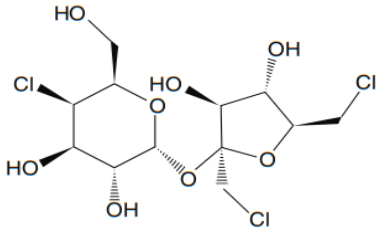
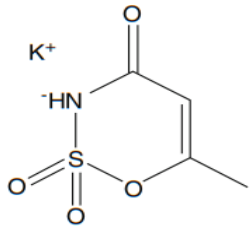
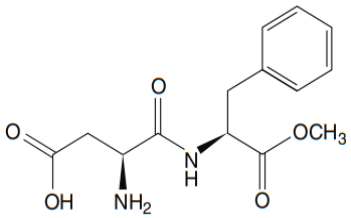
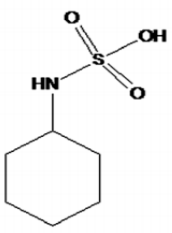
La sacarina SAC (E954) referida como 1,1-dióxido 1,2-benziso-tiazolin-3-ona (Tabla 1), fue el primer edulcorante orgánico sintético desarrollado con un poder edulcorante mayor a la sacarosa. Fue descubierta por Remsen y Fahlberg en 1879 al realizar la oxidación del compuesto *O*-metil-bencenosufonamida. La molécula obtenida no es soluble en agua, por lo que se comercializa en su forma de sal sódica o cálcica. Debido a que posee un sabor amargo y metálico, es ampliamente utiliza como aditivo complementario de mezclas con otros edulcorantes (DuBois, 2012). El descubrimiento de la SAC se reporta en 1879, mientras que el descubrimiento de CYC (E952) se dio en 1944, sin embargo ambos EAI se emplearon como sustitutos de azúcar para personas con diabetes hasta finales de los años 50's. En el año de 1957, Helgren de Laboratorios Abbot, descubrió que al mezclar ambos aditivos, en proporciones definidas (10 partes de CYC por 1 de SAC), se conseguía mejorar de manera importante el perfil de dulzor, sin comprometer el sabor de los productos (DuBois, 2012)

1.3.5 Ciclamato

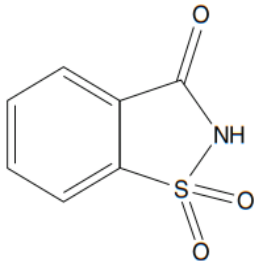
Ciclamato (ácido ciclámico y sus sales) fue utilizado como edulcorante artificial de alta intensidad alrededor del mundo en las décadas de los 50's y 60's,

sin embargo países como Estados Unidos y Reino Unido prohibieron su consumo a inicios de la década de los 70's después de varios experimentos en ratas que demostraban su potencial carcinogénico basando su decisión en las premisas de que CYC no había demostrado no causar cáncer ni daño genético heredable (Whitehouse *et al.*, 2016). Otros países continuaron su uso como aditivo alimentario con una IDA de 0-11 mg/kg de peso corporal, establecida por organismos como el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y el Comité Científico sobre la Alimentación Humana de la Unión Europea (SCF), con base en la información de toxicidad de su metabolito principal la ciclohexalamina (Renwick *et al.*, 2004). En la Tabla 1 se muestra la estructura química del compuesto.

Tabla 1. Estructura y fórmula química de SUC, ACE-K, ASP, CYC, SAC. (Fernandes et al., 2013; Sharma, Oturan y Kim, 2014; Sylvetsky et al., 2018)

Nomenclatura	Fórmula Química	Estructura
Sucralosa	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$	
Acesulfame potásico	$C_4H_4KNO_4S$	
Aspartame	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	
Ciclamato	$C_6H_{12}NO_3S$	

Sacarina $C_7H_5NO_3S$



Actualmente la presencia de edulcorantes artificiales en productos alimenticios, farmacéuticos y de cuidado personal los ha convertido en productos ampliamente consumidos en todo el mundo. Científicos y tecnólogos de alimentos han realizado investigaciones desde hace más de 100 años sobre compuestos que puedan proveer un sabor similar a la sacarosa pero sin los indeseados efectos de ésta. La seguridad es esencial, los edulcorantes deben de ser no tóxicos y metabolizables de forma normal o ser excretados de forma inalterada. Estudios de seguridad llevados a cabo para su aprobación indican que son seguros para el ser humano, sin embargo se ha comprobado que especies no objetivo pueden sufrir alteraciones bioquímicas y metabólicas importantes, tanto por los productos originales como por sus productos de transformación.

1.4. Transformaciones abióticas y bióticas de EAI.

El aumento en la presencia de edulcorantes artificiales detectados en el ciclo del agua, ha adquirido importancia en los últimos años. Posterior al uso humano y veterinario, éstos compuestos son excretados o liberados al ambiente en su forma de compuesto padre libre o metabolitos conjugados. Los productos de transformación de éstos compuestos pueden ser encontrados en aguas residuales provenientes de las plantas tratadoras o en el ambiente como resultado de una serie de transformaciones abióticas y bióticas sufridas por los compuestos en su forma original (Devier *et al.*, 2011; Andrés-Costa *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2014; Kosma, Lambropoulou y Albanis, 2014).

1.4.1 Transformaciones abióticas y bióticas de SUC

SUC es una molécula clorada polihidroxilada de bajo peso molecular (M_w ~400) por lo tanto exhibe una alta solubilidad en agua, débil carácter lipofílico y un bajo coeficiente de bioconcentración (Baird *et al.*, 2000; Sims *et al.*, 2000). La cloración de la molécula genera resistencia a las enzimas glicosídicas que llevan a cabo la degradación de carbohidratos (Scheurer *et al.*, 2014).Estudios de metabolismo de sucralosa han concluido que cerca del 95% de la dosis oral consumida pasa a través del cuerpo humano sin ser absorbida y es eliminada como

compuesto padre (Soh *et al.*, 2011). De acuerdo a John, Wood y Hawkins (2000) el porcentaje restante pertenece a los metabolitos 4-cloro-4-deoxi-galactosa (4-CG) y 1,6-dicloro-1,6-dideoxi-fructosa (1,6-DCF), ambos metabolitos tienen características de conjugados glucurónicos de SUC, representando no más del 10% de la sucralosa total administrada de forma oral. Dichos metabolitos fueron identificados en ratón, perro y el hombre sin diferencias significativas entre especies (Molinary y Quinlan, 2006; Soh *et al.*, 2011). Sims *et al.* (2000) demostraron que la sucralosa fue pobremente absorbida en el tracto intestinal de ratas administradas con dosis de 2-20 mg kg^{-1} y su eliminación se dio a través de la orina y las heces como producto inalterado. Por otro lado autores como Grice y Goldsmith (2000) no encontraron señales de decloración producto del metabolismo.

Se ha propuesto que la biodegradación de la SUC produce aldehídos insaturados de sucralosa y ácido urónico de sucralosa así como los monosacáridos 4-CG y 1,6-DCF (John, Wood y Hawkins, 2000; Sims *et al.*, 2000; Grotz y Munro, 2009; Lange *et al.*, 2012; Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017). De acuerdo a Labare y Alexander (1993), la transformación microbiana de la SUC en compartimentos ambientales es un proceso co-metabólico ya que se hace necesaria la presencia de microorganismos y materia orgánica suficiente en las muestras ambientales para llevar a cabo el proceso de degradación del compuesto.

En medio altamente ácido la hidrólisis de la sucralosa produce dos metabolitos, la 1,6-diclorofructosa (1,6-DCF) y la 4-clorogalactosa (4-CG) por lo que ha sido considerada extremadamente resistente a la hidrólisis. Se ha comprobado que a pH ambiental el compuesto es altamente estable, sin embargo su estabilidad puede variar con el pH y la temperatura. Por otro lado, los estudios de degradación de SUC durante el tratamiento de aguas residuales ha mostrado una alta resistencia del edulcorante a métodos como la ozonación y tratamientos fotoquímicos (Minten *et al.*, 2011; Soh *et al.*, 2011).

1.4.2 Transformaciones abióticas y bióticas de ACE

Estudios previos han reportado que el acesulfame no es degradado en procesos biológicos tanto aerobios como anaerobios, tampoco de forma metabólica o co-metabólica (Buerge *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011). Sin embargo Kroger, Meister y Kava (2006) mencionan que si se lleva a cabo un proceso metabólico en mamíferos mediante el cual se forma acetoacetato, que ha demostrado poseer actividad tóxica a altas concentraciones Se ha comprobado que posee un bajo coeficiente de partición (Kow= -1,33) debido a su alta hidrofilicidad (Ryu *et al.,* 2014) por lo que su remoción en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR´s) resulta en eficiencias muy bajas y su introducción al medio ambiente es casi inevitable. Ha sido demostrado que el ACE presenta un comportamiento conservativo en aguas subterráneas (Buerge *et al.*, 2009; Van Stempvoort *et al.*,

2011; Robertson *et al.*, 2016) indicando que los procesos biogeotérmicos llevados a cabo en dicho ambiente no lo afectan de manera significativa. Por ozonación se han encontrado productos como dioxiacetil sulfamato y el ácido acético (Scheurer *et al.*, 2012). En pruebas de estabilidad en alimentos von Rymon y Hanger (2001) no observaron hidrólisis de ACE-K a pH mayor de 3 y a temperaturas de hasta 25° C durante varios meses. A pH menores y temperaturas mayores (40°C) se observaron pérdidas menores durante un periodo de 6 meses de vida de anaquel de los productos examinados. En ensayos llevados a cabo a altas temperaturas (hasta 90°C) simulando el proceso de pasteurización no se observó degradación de ACE.

La remoción en PTAR's del edulcorante se ha estudiado mediante la aplicación de ozono con una remoción parcial, dependiente del tiempo y la concentración de ACE y ozono. La formación de dos compuestos de transformación, hidrato de aldehído y ácido acético ha sido comprobada por Scheurer *et al.* (2012).

1.4.3 Transformaciones abióticas y bióticas de ASP

El aspartame ASP está compuesto por 50% del aminoácido fenilalanina, 40% de ácido aspártico y 10% de metanol (Humphries *et al.*, 2008). En general, en roedores, primates y humanos, ASP es metabolizado en el tracto gastrointestinal por enzimas esterasas y peptidadas en sus tres componentes principales: metanol, fenilalanina y ácido aspártico (aspartato). Ambos aminoácidos resultan de reacciones de escisión del dipéptido aspartilfenilalanina. Por cada molécula de ASP se forma una molécula de cada metabolito. El metabolito oxalacetato es producido por la transaminación del ácido aspártico. El metanol por su parte es oxidado a formaldehido y ácido fórmico (Butchko y Stargel, 2001).

En cuanto a las transformaciones abióticas de ASP, se ha observado que en medio neutro se forma un anillo de dicetopiperazina, adicionalmente la hidrólisis del residuo éster forma aspartilfenilalanina y metanol. ASP en medio ácido, forma el metabolito fenilalanina metil éster, mientras que en medio alcalino su hidrólisis produce metanol, dicetopiperazina y aspartilfenilalanina, que posteriormente sufren una escisión en los dos aminoácidos componentes del sustituto de azúcar. Las altas temperaturas producen ácido 5 bencil-3,6-dioxo-2-piperazinoacético. Los productos de ozonación y biodegradación son actualmente desconocidos (Soffritti *et al.*, 2005).

1.4.4 Transformaciones abióticas y bióticas de CYC

En principio fue determinado que CYC no sufría ningún tipo de transformación metabólica en mamíferos y por lo tanto era excretado de forma inalterada. Estudios llevados a cabo por (Kojima y Ichibagase, 1966 ; Bickel *et al.*,

1974) demostraron la existencia de un metabolito producto de la ingestión de CYC, la ciclohexilamina. La ciclohexamina administrada de forma oral a humanos es excretada de forma casi inalterada en la orina y en menor medida sufre un proceso de desaminación mientras que en otros mamíferos la hidroxilación de la molécula también se lleva a cabo (Renwick y Williams, 1972). Después de varios estudios se pudo concluir que la capacidad de metabolizar el edulcorante varía entre individuos pues las tasas de conversión y el tiempo necesario para ella, era desarrollado de forma diferente en cada caso de estudio (Bickel *et al.*, 1974). Se asumió por otro lado que la conversión es un proceso microbiológico ya que se mostraba inhibida por la presencia de ciertos antibióticos (Renwick *et al.*, 2004). Renwick y Williams (1972) detectaron los metabolitos ciclohexanol y trans-ciclohexano-1,2-diol, oxalohexanona, ciclohexilhidroxilamina, trans-3-, cis-4-, trans-4- y cis-3-aminociclohexanol).

La estabilidad del edulcorante en soluciones acuosas es buena y la hidrólisis en productos alimenticios es casi indetectable (Kojima y Ichibagase, 1966). La degradación del CYC por medio de ozonación genera dos productos de transformación principales, la ciclohexanona y el ácido amidosulfónico (Kojima y Ichibagase, 1966).

1.4.5 Transformaciones abióticas y bióticas de SAC

Existe un consenso común de que SAC es un compuesto que no sufre metabolismo en mamíferos entre ellos el ser humano (Renwick y Willinas, 1972; Scheurer *et al.*, 2014). SAC es considerado un compuesto altamente estable a condiciones establecidas para alimentos y bebidas. De acuerdo a Dubois (2012) a pH 2 y 150ºC existe una descomposición de 19% de una solución al 0.35% del edulcorante. La formación de dos posibles productos de transformación, ácido 2-sulfobenzóico y ácido 2-sulfamoilbenzóico se muestra dependiente del pH.

Se ha reportado que SAC ha sido detectada en concentraciones de µg/L en influentes de PTAR's y las tasas de remoción de 90% demuestran que es un compuesto poco persistente a tratamiento biológico principalmente (Lange *et al.*, 2012). La SAC se encuentra presente en una amplia gama de productos alimenticios, farmacéuticos y de cuidado personal. SAC es un producto de transformación de más de 7 herbicidas sulfonilrureas, el producto primario de hidrólisis es el metil o etil 2-(aminosulfonil) benzoato, el cual después de varios rearreglos moleculares se transforma en SAC. Además de la transformación hidrolítica, la transformación microbiana también es posible (Anderson y Dulka, 1985).

Desde hace varios años se ha llevado a cabo un gran esfuerzo por estudiar el destino, ocurrencia y efectos tóxicos de contaminantes emergentes en los ambientes acuáticos. Recientemente, las investigaciones se enfocan en la toxicidad de sus metabolitos y productos de transformación ya que se ha demostrado que gran cantidad de ellos pueden generar efectos tóxicos mayores que sus compuestos originales, los cuales una vez liberados al ambiente sufren todo tipo de procesos abióticos (degradación química, térmica o fotoquímica) y bióticos (metabolismo, biodegradación). Ha sido demostrado que si bien la mayoría de los edulcorantes artificiales no sufren metabolismo o su metabolismo resulta despreciable en los seres humanos, pueden generar todo tipo de compuestos cuyo mecanismo de acción tóxica no ha sido dilucidado.

1.5. Destino y Ocurrencia de EAI en el medio acuático.

A pesar de que los EAI son aditivos alimentarios aprobados para consumo humano por autoridades regulatorias en la materia en más de 70 países, éstos han demostrado generar efectos adversos en el medio ambiente. Estudios de concentraciones ambientales han confirmado la extendida distribución de sucralosa (SUC), acesulfame (ACE), ciclamatos (CYC) y sacarina (SAC) en el ciclo del agua a niveles que se encuentran entre los más altos dentro de los contaminantes antropogénicos (Scheurer *et al.*, 2009; Grotz y Munro, 2009; Tollefsen, Nizzetto y Huggett, 2012; Eriksson *et al.*, 2014; Stolte *et al.*, 2013). Los EAI pueden ser considerados eficientes marcadores de contaminación en la detección de trazas de aguas residuales domésticas dentro del ciclo del agua, inclusive más que otros trazadores comúnmente utilizados para dicho fin (Buerge *et al.*, 2011; Soh *et al.*, 2011; Spoelstra, Schiff y Brown, 2013; Robertson *et al.*, 2016). La excreción de los EAI después del consumo humano, es sin dudarlo una de las mayores fuentes de ingreso de éstos aditivos alimentarios en los medios acuáticos, sin embargo, productos como SAC han sido autorizados por la Unión Europea como aditivos para piensos animales, a la vez que también se trata de uno de los productos mayoritarios de degradación de ciertos herbicidas de la familia de las sulfonilureas (Sims *et al.*, 2000; Buerge *et al.*, 2011).

Desde los hogares hasta las industrias, los EAI ingresan en las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR's) donde se llevan a cabo tratamientos de remoción/degradación que no resultan totalmente efectivos para éste tipo de compuestos, por lo que los efluentes que los contienen son descargados directamente en los ecosistemas acuáticos. Houtman (2010) señala que las descargas industriales, domésticas, agrícolas y ganaderas directas, son responsables de la liberación de sustitutos de azúcar en el ambiente, en la Figura 1 se muestran posibles rutas de ingreso de los edulcorantes en el medio acuático.

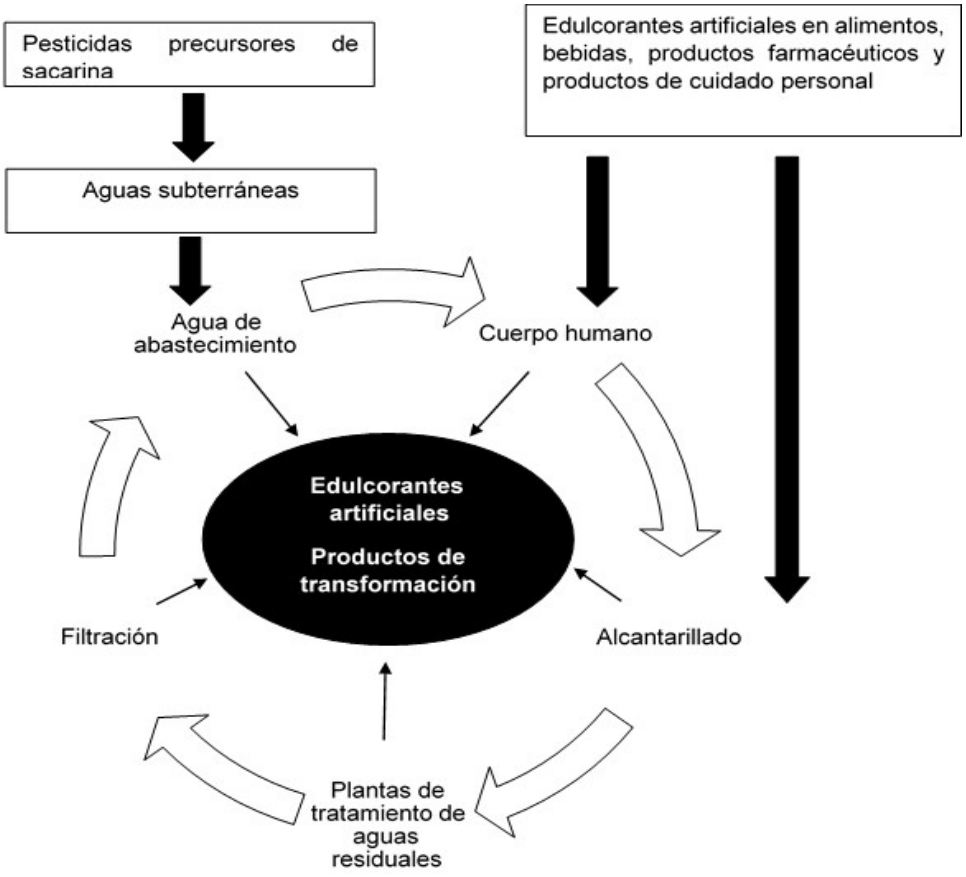


Fig 1. Rutas de ingreso de edulcorantes artificiales y sus productos de transformación al ambiente acuático (Scheurer *et al.*, 2014, pp. 659)

La SUC, es un compuesto altamente estable que experimenta un metabolismo despreciable en mamíferos, incluyendo humanos, y presenta una inherente biodegradabilidad en el ambiente. Al ser altamente soluble en agua (>100 g/L), muestra un bajo potencial de bioacumulación y de sorción en el suelo y la materia orgánica, por lo tanto se encuentra presente de forma predominante en la columna de agua (Tollefsen *et al.*, 2012). La estabilidad relativamente alta del compuesto ha llevado a estudios que ubican a la SUC como un contaminante presente en varios compartimientos ambientales como efluentes municipales y aguas superficiales en concentraciones de nanogramos y microgramos por litro (Lillicrap, Angford y Tollefsen, 2011).El edulcorante artificial ACE-K puede ser considerado como un eficiente marcador de contaminación en la detección de trazas de aguas residuales domésticas en los cuerpos de agua debido a que se ha encontrado que no es eliminado en las Plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR´s) y presenta una alta persistencia en cuerpos de agua como lagos, ríos y lagunas (Buerge *et al.*, 2011). Ha demostrado ser altamente móvil y recalcitrante en

aguas subterráneas (Buerge *et al.*, 2009; Van Stempvoort *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2016) por lo que puede ser considerado como un marcador de contaminación fiable en aguas del subsuelo. Un marcador ideal debe de poseer ciertas características, entre ellas, encontrarse en el medio ambiente en cantidades cuantitativamente significativas (dependiendo de su liberación, transformaciones bióticas y abióticas así como su persistencia), específico de la fuente de contaminación, debe de reflejar de forma cuantitativamente importante la contaminación, ser susceptible y rápidamente detectable y analizable; en aguas subterráneas es importante que presente una buena tasa de sorción así como suficiente estabilidad en las condiciones del medio (Buerge *et al.*, 2011). ACE-K es lo suficientemente persistente e hidrofílico para alcanzar de manera continua y en concentraciones cuantitativamente importantes las aguas subterráneas como consecuencia de la filtración de las aguas de ríos contaminados por efluentes domésticos, industriales y de PTAR´s (Buerge *et al.*, 2011).

La remoción de acesulfame mediante diversos procesos de tratamiento de aguas residuales ha demostrado ser ineficiente e incompleta (Scheurer *et al.*, 2010). El Acesulfame resulta útil para el estudio de las interacciones entre el agua superficial (ríos, lagos, lagunas) y las aguas subterráneas, asimilación de nutrientes y otras sustancias presentes en aguas residuales incluyendo los contaminantes emergentes. Puede ser utilizado para distinguir y cuantificar dilución versus atenuación evitando con ello las confusiones relacionadas con la presencia de otras sustancias propias del ambiente (Spoelstra *et al.*, 2013).

La SAC es un compuesto que es ampliamente utilizado en productos alimenticios, farmacéuticos y de cuidado personal. De acuerdo a Buergue *et al.*, 2011 existen varias fuentes de ingreso del edulcorante en el ecosistema acuático, por un lado la irrigación de campos con aguas contaminadas, fertilización con lodos provenientes de plantas depuradoras, y por otro lado su utilización como aditivo alimentario en productos de consumo humano y porcino además de ser un metabolito de ciertos herbicidas de la familia de las sulfonilureas como el metsulfuron metil, tribenurolmetil, propoxicarbazona, entre otros.

De todos los edulcorantes artificiales que existen actualmente en el mercado, la investigación ambiental se ha enfocado especialmente en SUC, ACE-K, CYC, SAC, debido a dos razones principales: (1) se han determinado concentraciones del orden de μg L^{-1} en el ambiente acuático, (2) su remoción es parcial o limitada durante los tratamientos de aguas residuales y agua potable (Scheurer *et al.*, 2010; Buerge *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2016). Estudios de concentraciones ambientales de edulcorantes artificiales han destacado su extensa distribución dentro del ciclo del agua (Loos *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009; Buerge *et al.*, 2011; Van Stempvoort *et al.*, 2011) . Scheurer *et al.* (2009) determinaron concentraciones de hasta 190 μgL^{-1} de CYC, 34 y 50 μgL^{-1} de ACE y SAC respectivamente y concentraciones <1 μgL^{-1} de SUC en los efluentes

provenientes de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales en Alemania. Los mismos autores encontraron que las PTAR remueven de forma limitada SUC y ACE (20 y 41%, respectivamente), sin embargo CYC y SAC son casi completamente eliminados (>94%).

Scheurer *et al.* (2009), detectaron cuatro edulcorantes artificiales en aguas superficiales en Alemania, ACE-K en una máxima concentración de 2 μgL^{-1}, SAC y CYC 50-150 ngL^{-1} y SUC fue detectada en concentraciones de 60-80 ngL^{-1}. En general han sido determinadas concentraciones de ACE y SUC del orden de μgL^{-1} en aguas superficiales, mantos acuíferos subterráneos y agua de consumo, por lo que se concluye que únicamente SAC y CYC son completamente removidos utilizando tratamientos de agua convencionales (Lange *et al.*, 2012).

Buerge *et al.* (2009) investigaron la distribución de SAC, CYC, SUC y ACE-K en aguas subterráneas, superficiales y de consumo humano en Suiza, encontrando concentraciones de 3.9-18 $\mu g\ L^{-1}$, 10-65 $\mu g\ L^{-1}$, 2.0-9.1 $\mu g\ L^{-1}$ y 12-43 $\mu g\ L^{-1}$ respectivamente en influentes de una PTAR, mientras que en los efluentes se detectaron <LOD-3.2 $\mu g\ L^{-1}$, <LOD-0.82 $\mu g\ L^{-1}$, 2.0-8.8 $\mu g\ L^{-1}$ y 14-46 $\mu g\ L^{-1}$ respectivamente. El análisis de aguas superficiales de ríos y lagos arrojó presencia de los cuatro edulcorantes en concentraciones cuantitativamente relevantes, mientras que en agua de consumo humano, solamente ACE-K fue detectado en concentraciones de 0.01-2.8 $\mu g\ L^{-1}$.

Otros estudios han demostrado que SUC es un contaminante ampliamente extendido en aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. La sucralosa pasa prácticamente sin sufrir cambios a través de los procesos de tratamiento de aguas residuales, el tratamiento con carbón activado es el único proceso utilizado capaz de eliminar una proporción significativa de sucralosa de aguas residuales (Scheurer *et al.*, 2009; Minten *et al.*, 2011). Loos *et al.* (2009) llevaron a cabo un monitoreo de SUC en cuerpos de agua de 27 países europeos, encontrando concentraciones entre 0.1 y 1 $\mu g\ L^{-1}$ en aguas superficiales y municipales en países como España, Italia, Suiza, Francia, Bélgica, Países Bajos, Reino Unido, entre otros (Loos *et al.*, 2009; Minten *et al.*, 2011).

Mead *et al.* (2009) estudiaron la presencia de SUC en agua de costa y mar abierto en América del Norte, donde fueron detectadas concentraciones de 67,147, 372 y 392 ng L^{-1} en distintos puntos de la Costa Oeste de Estados Unidos.

Ferrer y Thurman (2010) detectaron SUC en muestras de aguas superficiales, subterráneas y residuales recolectadas de diferentes puntos de Estados Unidos, en concentraciones de 0.05-1.8 $\mu g\ L^{-1}$, 0.6-2.4 $\mu g\ L^{-1}$ y 0.8-1.8 $\mu g\ L^{-1}$ respectivamente. En el mismo estudio se detectó SAC en una concentración de 5 $\mu g\ L^{-1}$ en una de las muestras analizadas.

Mawhinney *et al.* (2011) llevaron a cabo el análisis de sucralosa presente en muestras de 19 plantas de tratamiento de agua potable en Estados Unidos utilizando la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Se encontró que el edulcorante estaba presente en aguas provenientes del canal de descarga en 15 de 19 plantas de tratamiento analizadas (47-2900 ng L^{-1}), en 13 de 17 plantas se presentaron concentraciones de 49-2400 ng L^{-1} en muestras después de tratamiento y en 8 de 12 plantas (48-2400 ng L^{-1}) en agua proveniente del sistema de distribución.

Spoelstra *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio en 23 sitios a lo largo del Gran Río, Ontario, Canadá, encontrando una máxima concentración de sucralosa de 21 µg L^{-1} convirtiéndose en una de las mayores reportadas en el mundo. Dicho edulcorante había sido detectado con anterioridad en ríos de países europeos en concentraciones máximas de 3.56 µg L^{-1} y diversos puntos en Norte América a niveles máximos de 10 µg L^{-1} (Scheurer *et al.*, 2009; Ferrer y Thurman, 2010; Buerge *et al.*, 2011; Mawhinney *et al.*, 2011; Oppenheimer *et al.*, 2011; Van Stempvoort *et al.*, 2011).

Subedi *et al.* (2015) analizaron muestras de una planta tratadora en India, encontrando concentraciones relativamente bajas de sucralosa (1046 ng L^{-1}, factor de dilución 100%), en comparación con las concentraciones encontradas de ciclamato y sacarina, dos de los edulcorantes más consumidos en el país.

Todos los edulcorantes artificiales son compuestos químicos altamente solubles en agua y algunos altamente estables como ACE y SUC, pueden ser detectados en aguas de abastecimiento y agua de grifo en concentraciones mayores de µg L^{-1} (Loos *et al.*, 2009). A pesar de que las concentraciones en agua de grifo son relativamente altas comparadas con otros compuestos antropogénicos, tales como pesticidas o productos farmacéuticos, la presencia de cantidades traza de estos compuestos toxicológicamente bien estudiados genera poca preocupación (Scheurer *et al.*, 2014).

En términos de evaluación del riesgo tradicional de SUC, la concentración prevista sin efecto propuesta para organismos acuáticos (PNEC) ha sido determinada en 0.93 mg/L, basado en la concentración de efecto no observado (NOEC) de un estudio de toxicidad crónica con camarón mysida y con la aplicación de un valor de seguridad de 100. Se determinó que el cociente resultante de PEC/PNEC es claramente menor de 1 (PEC/PNEC=0.08), indicando de este modo un riesgo al medio ambiente limitado utilizando enfoques tradicionales de evaluación de riesgo toxicológico (Tollefsen *et al.*, 2012).

Robertson *et al.* (2016) determinaron concentraciones de ACE en aguas residuales y aguas subterráneas provenientes de 12 sistemas sépticos en Ontario, Canada. Su investigación arrojó concentraciones de 5-1000 µg L^{-1} en aguas impactadas, concluyendo que el ACE tiene una amplia presencia en aguas sépticas

que se han encontrado en contacto con plumas de contaminación de aguas subterráneas por lo que se trata de un edulcorante móvil y persistente.

Baena-Nogueras *et al*. (2018) llevaron a cabo un estudio sobre ingreso, ocurrencia y distribución de edulcorantes artificiales en PTAR's costeras analizando ACE, ASP, CYC, SAC y SUC en la bahía de Cádiz, España durante un periodo de 6 meses, encontrando concentraciones constantes <0.1 μg L^{-1} de ASP, 0.6 - 3 μg L^{-1} de ACE y SUC, concluyendo que el carácter recalcitrante de SUC y ACE los convierte en buenos marcadores de contaminación de origen antropogénico en ambientes costeros.

SAC es utilizado como aditivo para alimento animal, de acuerdo a Buergue *et al*. (2011), el edulcorante es excretado en concentraciones de hasta 12 mg L^{-1}, por lo que puede ser ampliamente encontrado en heces fecales porcinas. El estudio de aguas subterráneas provenientes de una estación de bombeo en Suiza, arrojó una concentración de 0.26 μg L^{-1} del edulcorante presumiblemente proveniente de la aplicación de abono que contiene heces porcinas.

Al ser compuestos altamente consumidos, con probada persistencia y que no se encuentran de forma natural en el ambiente, los edulcorantes artificiales especialmente SUC y ACE son considerados marcadores ideales de contaminación antropogénica en cuerpos de agua. Si bien la principal fuente de emisión de edulcorantes es la excreción humana contenida en efluentes domésticos, estos compuestos también pueden ingresar al medio ambiente a partir de descargas industriales, agrícolas y ganaderas.

1.6. Efectos tóxicos de EAI en diversas especies acuáticas.

Los efectos tóxicos generados a partir de la presencia de EAI en los ecosistemas acuáticos no ha sido estudiada a profundidad, a la fecha es poca la información de estudios de toxicidad inducida por sustitutos de azúcar en hidrobiontes, siendo la SUC el aditivo más estudiado (Stolte *et al*., 2013).

Aun cuando la sucralosa se considera inofensiva para los seres humanos quienes excretan cerca del 98% de la ingesta de forma inalterada, es ampliamente mencionada su persistencia en el ambiente ya que presenta una vida media muy larga (del orden de varios años), dependiendo del pH y la temperatura (Grice y Goldsmith, 2000). La presencia de sustancias con estructura parecida a la sacarosa y altamente persistentes en el ambiente podrían generar cambios en el comportamiento de alimentación de diversos organismos (Peñalva-Arana, Lynch y Robertson, 2009)

SUC es considerada no tóxica para los seres humanos (Grice y Goldsmith, 2000), por lo que ha sido aprobada para su uso específico como edulcorante de

consumo humano por un gran número de autoridades regulatorias en seguridad alimentaria alrededor del mundo a dosis de 5 mg kg^{-1} peso corporal (Molinary y Quinlan, 2006). Aunque ha sido sometida a evaluaciones de seguridad para el consumo humano y del medioambiente, resulta ser motivo de preocupación con respecto a sus potenciales efectos biológicos en especies no objetivo que se encuentran en áreas receptoras de descargas generadas por las actividades antropogénicas (Lillicrap *et al.*, 2011).

Hjorth, Hansen y Camus (2010) evaluaron los efectos de la exposición a concentraciones de 0-50 µg L^{-1} (96 h) de edulcorante SUC en dos especies de copépodos del ártico. Se evaluaron factores tales como producción de huevos, tasa de eclosión, ingesta de alimento y mortalidad, encontrando que la ingesta de alimento incrementó dependientemente del aumento de concentraciones de SUC en el copépodo marino *Calanus glacialis* no así en *Calanus finmarchicus*, mientras que la producción de huevos no fue afectada. Lillicrap *et al.* (2011) encontraron un factor de bioconcentración (FBC) <1 para alga *Pseudokirchneirella subcapita* y *Danio rerio* y valores mayores de FBC (1.6-2.2) en *Daphnia magna*.

Eriksson *et al.* (2014) llevaron a cabo estudios de bioconcentración, comportamiento y toxicidad crónica y aguda en *D. magna*, *Nitocra spinipes*, *Gammarus oceanicus* y *Gammarus zaddachi* encontrando que la sucralosa afectó la locomoción de *D. magna* y *G. zaddachi* en concentraciones de 0.5, 5 y 500 µg L^{-1}, así como un aumento en la ingesta de alimentos con concentraciones de sucralosa más elevadas en *C. glacialis*. La sucralosa no exhibe efectos adversos en la tasa de crecimiento de *Lenma gibba* (7d) a concentraciones <1000 mg L^{-1} (Soh *et al.*, 2011).

Huggett y Stoddard (2011) investigaron la toxicidad crónica de SUC no encontrando reducción significativa en la supervivencia o reproducción a concentraciones hasta de 1800 mg L^{-1} para *Daphnia magna* (21 d) y 93 mg L^{-1} para *Americamysis bahia* (28d), por lo que concluyeron que las concentraciones ambientalmente relevantes de SUC encontradas hasta ese entonces, se encontraban por debajo de la concentraciones requeridas para inducir efectos tóxicos crónicos en invertebrados de agua dulce y salada.

Stolte *et al.*, (2013) mencionan que hasta el año 2013 no existían datos disponibles sobre los efectos ecotoxicológicos de ACE, CYC y SAC, por lo tanto llevaron a cabo estudios de ecotoxicidad de los tres edulcorantes más SUC a concentraciones de hasta 1000 µg L^{-1}, utilizando como organismos a *Scenedesmus vacuolatus* (24 h), *Daphnia magna* (48 h) y *Lema minor* (7 d). Evaluaron factores como inhibición de la reproducción, inmovilización aguda e inhibición del crecimiento, concluyendo que las concentraciones sin efectos observables obtenidas en el estudio, indicaban un bajo potencial de riesgo para los organismos acuáticos estudiados.

A pesar de que estos estudios indican que la sucralosa posee una baja toxicidad y no se bioacumula a un grado significativo en organismos acuáticos, su persistencia combinada con el incremento en el consumo del edulcorante demanda una evaluación ecotoxicológica más detallada, llevando a cabo análisis de toxicidad subletal. En los ambientes acuáticos las señales químicas son la principal ruta de comunicación (Hay, 2009). El sentido del gusto es el regulador dominante y la fuerza motora del comportamiento de alimentación y los principios fundamentales del sistema gustativo son los mismos en diversos organismos como mamíferos e insectos (Yarmolinsky, Zuker y Ryba, 2009) lo que puede significar que los receptores de sabores dulces que se encuentran en humanos podrían estar presentes en otros grupos taxonómicos. Como ejemplo, estudios recientes proveen evidencias de receptores gustativos de sabores dulces en crustáceos (Peñalva-Arana *et al*., 2009). La persistencia de la sucralosa en combinación con su alta solubilidad en agua, su semejanza estructural con el azúcar y su perfil de dulzor hacen de esta sustancia un reto para la evaluación del riesgo en los ambientes acuáticos.

Saucedo-Vence *et al*. (2017) realizaron un estudio de estrés oxidativo producido por sucralosa en *Cyprinus carpio*, concluyendo que a concentraciones ambientalmente relevantes (0.05 y 155 μg L^{-1}), SUC induce daño oxidativo en branquias, cerebro y músculo de carpa común al generar un incremento en biomarcadores de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y contenido de proteínas carboniladas.

Es muy poco conocido el destino post consumo de la sucralosa en el ambiente, las moléculas cloradas (bifenilos policlorados, aldrin, clordano, heptaclor, dioxinas) han presentado persistencia, un potencial de bioacumulación y efectos tóxicos. Es conocido que la sucralosa es persistente a los procesos metabólicos en distintas especies y en el ambiente, sin embargo se ha demostrado que posee un bajo (Kow= 0,3) potencial de bioacumulación (Grice y Goldsmith, 2000).

Cruz-Rojas *et al*. (2019) llevaron a cabo un estudio de evaluación del estrés oxidativo inducido por la exposición de carpa común *Cyprinus carpio* a concentraciones ambientalmente relevantes de ACE-K (0.05 μg L^{-1} y 149 μg L^{-1}), encontrando que el edulcorante es capaz de generar daño oxidativo en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de la especie.

Reportes sobre la presencia de edulcorantes artificiales en ambientes acuáticos especialmente de SUC y ACE-K, han llevado a la comunidad científica a analizar las implicaciones biológicas en especies no objetivo que se encuentran en áreas impactadas por actividades antropogénicas. En gran cantidad de estudios se ha demostrado que la exposición a edulcorantes de especies acuáticas a diferentes niveles de cadena trófica, derivan en efectos tóxicos como alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas a concentraciones de ng L^{-1} a μg L^{-1}. Si bien los edulcorantes son considerados seguros para consumo humano a concentraciones

establecidas, actualmente es poco conocido su impacto ambiental ya que no forman parte de programas de monitoreo ambiental por lo que su presencia es en ocasiones desconocida.

1.7. Métodos de remoción de EAI

De acuerdo a Stolte et al. (2013) los niveles ambientales de edulcorantes artificiales dependen estrictamente de su consumo en los diferentes países así como de su degradabilidad. Diferentes tecnologías han sido empleadas para minimizar las descargas de EAI en los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas residuales provenientes de efluentes domésticos, industriales, agrícolas y hospitalarios como de agua potable para consumo humano (Kokotou *et al.*, 2012). Los EAI por lo general son removidos durante el tratamiento de aguas residuales por medio de ozonación o procesos de generación de radicales, sin embargo la información al respecto todavía es escasa (Scheurer *et al.*, 2014)

Scheurer *et al.* (2012) llevaron a cabo un estudio con CYC y ACE-K utilizando muestras de agua filtradas para identificar los productos de ozonación (PO) formados y el sitio de formación de dichos productos. En el caso de CYC, la oxidación ocurrió principalmente en el átomo de carbono, donde el residuo de sulfonamida está unido al anillo de ciclohexil. Para ACE-K, se reportó una remoción parcial dependiente del tiempo de contacto entre el ozono y el edulcorante. Aplicando una concentración de 0.5 mg L^{-1}, se formaron dos productos principales, aldehído hidratado y ácido acético en un reacción de primer orden. El aldehído fue detectado al término del tratamiento, pero eliminado casi en su totalidad con un tratamiento posterior con carbón activado. Torres *et al.* (2011) llevaron a cabo el análisis de SUC en muestras de diferentes PTAR's y aguas superficiales en Arizona, Estado Unidos, detectando concentraciones de 2,800 ± 1000 ng L^{-1} en muestras de influentes de siete de ellas. En aguas superficiales detectaron concentraciones de 300 ± 30 ng L^{-1}. Se estudiaron dos tipos de tratamientos de remoción, la degradación biológica y procesos de oxidación química. El estudio concluyó que la SUC no fue degradada en reactores biológicos aerobios y/o anaerobios por procesos metabólicos o co-metabólicos después de 42-62 días de tratamiento. La exposición prolongada a radiación UV no oxidó de manera significativa al edulcorante, mientras que la adición de ozono, generó una lenta oxidación de la molécula de SUC. Sus resultados sugirieron que en las condiciones normales de tratamiento de las PTARs no existe una degradación significativa de las SUC por lo tanto su introducción al ecosistema resulta casi inevitable.

Soh *et al.* (2011) evaluaron la degradación o mineralización de SUC mediante la exposición a una variedad de tratamientos ambientales (degradación microbiológica, hidrólisis, sorción en el suelo) y procesos avanzados de tratamiento ATPs (cloración, ozonación, sorción en carbón activado y radiación UV). Concluyeron

que la degradación solamente ocurrió de una forma limitada durante la hidrólisis, ozonación y procesos microbiológicos indicando que la ruptura de la molécula se lleva a cabo de forma lenta e incompleta, por lo que su acumulación en aguas superficiales es altamente probable.

Scheurer *et al*., (2009) estudiaron la remoción de ACE-K, SUC, CYC, SAC por dos métodos químicos, ozonación y cloración. Los resultados arrojaron que todos los EAI permanecieron inertes durante la cloración. Para el tratamiento con ozono, se observó persistencia de la SUC con un porcentaje de remoción del 8-15%. ACE-K probó reaccionar rápidamente con el ozono, sin embargo la concentración utilizada para el tratamiento estuvo por encima de la utilizada usualmente en las PTARs, una remoción de 18-60% se esperaría en condiciones convencionales. SAC y CYC fueron transformados en 30 minutos a una tasa de <10% y 30-50% respectivamente empleando una concentración conocida de ozono (5 mg L^{-1}).

Sharma, Oturan y Kim (2014) compararon diferentes procesos biológicos, electroquímicos, químicos y de oxidación avanzada para la remoción de SUC. Determinaron que el proceso con UV/H_2O_2 es el más efectivo para la remoción de SUC debido a la generación de radical ·OH cuyo mecanismo se basa en la sustitución de los átomos de cloro por hidroxilos en la sucralosa transformándola en fructosa y polioles, moléculas ambientalmente amigables.

Existe un creciente interés en la investigación de edulcorantes artificiales con el objetivo de comprender sus efectos en la salud humana y recientemente en el ambiente. Algunos edulcorantes como SUC y ACE son altamente persistentes en el ambiente habiendo sido encontrados en diferentes etapas del ciclo del agua. Diversos procesos de tratamiento de aguas residuales tienen por objetivo la degradación de compuestos edulcorantes en las plantas depuradoras de agua, sin embargo son pocos los que logran una tasa de remoción que garantice la inocuidad de los efluentes que se descargan a los ambientes acuáticos.

2. Conclusiones.

Los edulcorantes SUC, ACE-K, ASP, SAC, CYC son ampliamente consumidos como ingredientes de alimentos, bebidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal. Su uso como aditivos alimentarios ha sido aprobado por agencias de seguridad alimentaria en todo el mundo, pese a ciertos estudios toxicológicos que señalan efectos adversos de su consumo a largo plazo. Los edulcorantes artificiales han llamado la atención de la comunidad científica en los últimos años ya que se trata de aditivos alimentarios de creciente consumo que han sido detectados en concentraciones importantes en ecosistemas acuáticos en todo el mundo, es por ello que su estudio resulta fundamental ya que en la actualidad no forman parte de

los programas de monitoreo ambiental y por lo tanto su presencia no se encuentra regulada. Los efectos tóxicos inducidos por edulcorantes artificiales en especies acuáticas a diferentes niveles de la cadena trófica son variados, autores señalan que pueden generar alteraciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas a concentraciones de ng L^{-1} a µg L^{-1}. Debido a los niveles ambientales y su persistencia en el caso de SUC y ACE-K o la probada "pseudo-persistencia" de SAC y CYC, cuyas tasas de eliminación son compensadas por su continua liberación al medio ambiente, la ecotoxicidad de los EAI debe ser investigada a profundidad para evaluar el posible riesgo ambiental de estos productos químicos en hidrobiontes.

3. Referencias

Abhilash, M., Paul., M.V.S, Varghese, M.V. y Nair, R.H. (2011). Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food y Chemical Toxicology*, *49*(6), 1203–1207. doi: 10.1016/j.fct.2011.02.019.

Anderson, J. J. y Dulka, J. J. (1985). Environmental fate of sulfometuron methyl in aerobic soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33*(4), 596–602. doi:10.1021/jf00064a010

Andrés-Costa, M.J., Rubio-López, N., Morales, M. y Picó. Y. (2014). Occurrence and removal of drugs of abuse in wastewater treatment plants of Valencia (Spain). *Environmental Pollution*, *194*, 152–162. Doi: 10.1016/j.envpol.2014.07.019

Baena-Nogueras, R. M., Traverso-Soto, J. M., Biel-Maeso, M., Villar-Navarro, E., y Lara-Martín, P. A. (2018). Sources and trends of artificial sweeteners in coastal waters in the bay of Cadiz (NE Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*, *135*, 607–616. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.07.069

Baird, I. M., Shephard, N. W., Merritt, R. J. y Hildick-Smith, G. (2000). Repeated Dose Study of Sucralose Tolerance in Human Subjects. *Food and Chemical Toxicology, 38*, 123-129. doi:10.1016/s.0278-6915(00)00035-1

Byyopadhyay, A., Ghoshal, S. y Mukherjee, A. (2008). Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: Aspartame, acesulfame-K, y saccharin. *Drug y Chemical Toxicology*, *31*(4), 447–457. doi: 10.1080/01480540802390270.

Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., y Lu, K. (2017). The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLOS ONE*, *12*(6), 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0178426

Bickel, M. H., Burkard, B., Meier-Strasser, E., y Van Den Broek-Boot, M. (1974). Entero-bacterial Formation of Cyclohexylamine in Rats Ingesting Cyclamate. *Xenobiotica*, *4*(7), 425–439. doi:10.3109/00498257409052106

Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, *239*(1-3), 229–246. doi:10.1016/j.desal.2008.03.020

Brown, R. J., De Banate, M. A. y Rother, K. I. (2010). Artificial sweeteners: A systematic review of metabolic effects in youth. *International Journal of Pediatric Obesity*, *5*(4),305–312. doi: 10.3109/17477160903497027.

Buerge, I. J., Buser, H.R., Kahle, M., Müller, M. D. y Poiger, T. (2009). Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environmental Science & Technology*, *43*(12), 4381–4385. doi:10.1021/es900126x

Buerge, I. J., Buster, H. R., Kahle, M., Müller, M. D. y Poiger, T. (2011). The artificial sweetener acesulfame as marker of domestic wastewater in groundwater. *International Association of Hydrological Sciences*, 342, 103-106.

Butchko, H. H. y Stargel, W. W. (2001). Aspartame: Scientific evaluation in the postmarketing period. *Regulatory Toxicology y Pharmacology*, *34*(3), 221–233. doi: 10.1006/rtph.2001.1500.

Cruz-Rojas, C., SanJuan-Reyes, N., Fuentes-Benites, M.P.A., Dublan-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H. y Gómez-Oliván, L. (2019). Acesulfame potassium: Its ecotoxicity measured through oxidative stress biomarkers in common carp (Cyprinus carpio). *Science of the Total Environment*, *647*, 772–784. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.034.

Dhingra, R., Sullivan, L., Jacques, P. F., Wang, T. J., Fox, C. S., Meigs, J. B. y otros (2007). Soft Drink Consumption and Risk of Developing Cardiometabolic Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged Adults in the Community. *Circulation*, *116*(5), 480–488. doi:10.1161/circulationaha.107.689935

Devier, M.H., Mazellier, P., Ait-Aissa, S. y Budzinski, H. (2011). New challenges in environmental analytical chemistry: identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie*, 14 (7-8),766–779.doi: 10.1016/j.crci.2011.004.006

DuBois, G., (2012). Saccharine and Cyclamate. En O'Donell, K. y Kearsley , M.,(Eds.), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology (*pp.32-33). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Eriksson, A.K., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B. y Gorokhova, E. (2014). Sucralose Induces Biochemical Responses in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*, *9*(4), e92771. doi:10.1371/journal.pone.0092771

European Union. *European Parliament and Council Directive 2003/115/EC of 22 December 2003 Amending Directive 94/35/EC on Sweeteners for Use in Foodstuffs*, 2003. Recuperado de https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1994L0035:20060815:EN:PDF

Fernandes, V. N. O., Fernandes, L. B., Vasconcellos, J. P., Jager, A. V., Tonin, F. G., y Leal de Oliveira, M. A. (2013). Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection. *Analytical Methods*, *5*(6), 1524. doi:10.1039/c3ay26187e

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., y Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of The Total Environment*, *438*, 404–413. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.073

Ferrer, I. y Thurman, E. M. (2010). Analysis of sucralose y other sweeteners in water y beverage samples by liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography*,*1217*(25),4127–4134. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.020.

Food and Drugs Administration. *Food labeling: health claims; dietary noncariogenic carbohydrate sweeteners and dental caries Fed Reg 71:15559–15564*, 2006. Recuperado de https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2006-03-29/pdf/06-3007.pdf#page=1

Gardner, C., Wylie-Rosett, J., Gidding, S. S., Steffen, L. M., Johnson, R. K. y otros (2012). Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives: A Scientific Statement From the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Circulation*, *126*(4), 509–519. doi:10.1161/cir.0b013e31825c42ee

García, J. M., Casado, G. M., y García, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición hospitalaria*, 28(4), 17-31.

Goldsmith, L.A. y Mekel, A. (2001) Sucralose. En O'brien-Nabors (Ed.) *Alternative Sweeteners* (pp.185-187).New York: Marcel Dekker.

Grice, H. C. y Goldsmith, L. A. (2000). Sucralose -An Overview of the Toxicity Data. *Food and Chemical Toxicology*, *38*(2), 1–6. doi:10.1016/s0278-6915(00)00023-5

Grotz, V. L. y Munro, I. C. (2009). An overview of the safety of sucralose, *Regulatory Toxicology y Pharmacology*, *55*(1), 1–5. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.05.011.

Hay, M. E. (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, *1*, 193–212. doi:10.1146/annurev.marine.010908.163

Hernández, F., Ibañez, M., Bade, R., Bijlsma, L. y Sancho, J.V. (2014). Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, *63*, 140–157. Doi: 10.1016/j.trac.2014.08.003

Hjorth, M., Hansen, J. H. y Camus, L. (2010). Short-term effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland. *Chemistry and Ecology, 26*(5), 385-393. doi: 10.1080/02757540.2010.504672

Houtman, C. J. (2010) Emerging contaminants in surface waters y their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, *7*(4), 271–295. doi: 10.1080/1943815X.2010.511648.

Huggett, D. B. y Stoddard, K. I. (2011). Effects of the artificial sweetener sucralose on Daphnia magna y Americamysis bahia survival , growth y reproduction. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(10), 2575–2579. doi: 10.1016/j.fct.2011.06.073.

Humphries, P., Pretorius, E. y Naudé, H. (2008). Direct y indirect cellular effects of aspartame on the brain. *European Journal of Clinical Nutrition*, *62*(4), 451–462. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602866.

John, B. , Wood, S. y Hawkins, D. (2000). The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the mouse. *Food and Chemical Toxicology, 38*, 107–110. doi:10.1016/s0278-6915(00)00032-6

Lillicrap, A., Langford, K. y Tollefsen, K. E. (2011). Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(3), 673–681. doi:10.1002/etc.433

Kokotou, M. G., Asimakopoulos, A. G. y Thomaidis, N. S. (2012). Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: Analytical methodologies y environmental impact. *Analytical Methods*, *4*(10),3057–3070. doi: 10.1039/c2ay05950a.

Kojima, S. y Ichibagase, H. (1966). Studies on Synthetic Sweetening Agents. VIII. Cyclohexylamine, a Metabolite of Sodium Cyclamate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 14*(9), 971–974. doi:10.1248/cpb.14.971

Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A. y Albanis, T.A. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and

environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, *466-467*, 421–438. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.044

Kroger, M., Meister, K. y Kava, R. (2006). Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5*(2), 35–47.doi:10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x

Labare, M. P. y Alexander, M. (1993). Biodegradation of sucralose, a chlorinated carbohydrate, in samples of natural environments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *12*(5), 797-804. doi: 10.1002/etc.5620120502

Lange, F. T., Scheurer, M. y Brauch, H.J. (2012). Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(9), 2503–2518. doi:10.1007/s00216-012-5892-z

Loos, R., Gawlik, B. M., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S. y Bidoglio, G. (2009). Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A*, *1216*(7), 1126–1131. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.048

Mace, O. J., Affleck, J., Patel, N. y Kellett, G. L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *The Journal of Physiology, 582*(1), 379–392. doi:10.1113/jphysiol.2007.130906

Magnuson, B. A., Roberts, A. y Nestmann, E. R. (2017). Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food and Chemical Toxicology*, *106*, 324-355. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.047.

Mawhinney, D. B., Young, R. B., Vanderford, B. J., Borch, T. y Snyder, S. A. (2011). Artificial Sweetener Sucralose in U.S. Drinking Water Systems. *Environmental Science & Technology*, *45*(20), 8716–8722. doi:10.1021/es202404c

McKie, M. J., Andrews, S. A. y Andrews, R. C. (2016). Conventional drinking water treatment and direct biofiltration for the removal of pharmaceuticals and artificial sweeteners: A pilot-scale approach. *Science of The Total Environment*, *544*, 10–17. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.145

Mead, R. N., Morgan, J. B., Avery, G. B., Kieber, R. J., Kirk, A. M., Skrabal, S. A. y Willey, J. D. (2009). Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States. *Marine Chemistry*, *116*(1-4), 13–17. doi:10.1016/j.marchem.2009.09.005

Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Björlenius, B. y Alsberg, T. (2011). A method for the analysis of sucralose with electrospray LC/MS in recipient waters and in

sewage effluent subjected to tertiary treatment technologies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *91*(4), 357–366. doi:10.1080/03067310903582333

Molinary, S. y Quinlan, M.E. (2006) Sucralose. En Mitchell

, H. (Ed.) *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology* (pp.167-183). Oxford: Blackwell Publishing. doi: 10.1002/9781118373941

Nettleton, J. E., Reimer, R. A., y Shearer, J. (2016). Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance?. *Physiology & Behavior*, *164*, 488–493. doi:10.1016/j.physbeh.2016.04.029

Nichol, A. D., Holle, M. J. y An, R. (2018). Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, *72*(6), 796–804. doi:10.1038/s41430-018-0170-6

Oppenheimer, J., Eaton, A., Badruzzaman, M., Haghani, A. W., y Jacangelo, J. G. (2011). Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions. *Water Research*, *45*(13), 4019–4027. doi:10.1016/j.watres.2011.05.014

Peñalva-Arana, D. C., Lynch, M. y Robertson, H. M. (2009). The chemoreceptor genes of the waterflea Daphnia pulex: many Grs but no Ors. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 79. doi:10.1186/1471-2148-9-79

Petrie, B., Barden, R. y Kasprzyk-Hordern, B. (2014). A review on emerging contaminants in wastewaters in the environment: Current knowledge, understudied areas y recommendations for future monitoring. *Water Research*, *72*, 3–27. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.053.

Petrovic, M., González, S. y Barceló, D., (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, *22*(10), 685–696. doi:10.1016/s0165-9936(03)01105-1

Pfeffer, M., Ziesenitz, S. C. y Siebert, G. (1985). Acesulfame K, cyclamate y saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 24(4), 231–235. doi: 10.1007/BF02023668.

Renwick, A. G. y Williams, R. T. (1972). The fate of cyclamate in man and other species. *Biochemical Journal*, *129*(4), 869-879. doi: 10.1042/bj1290869

Renwick, A. G., Thompson, J.P., O'Shaughnessy, M. y Walter, E.J. (2004). The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *196*(3), 367–380. doi: 10.1016/j.taap.2004.01.013.

Ribeiro, A. R., Maia, A., Santos, M., Tiritan, M. E., y Ribeiro, C. M. (2015). Occurrence of Natural Contaminants of Emerging Concern in the Douro River Estuary, Portugal. *Environmental Contamination and Toxicology*, *70*(2), 361–371. doi:10.1007/s00244-015-0212-1

Richardson, S. (2009). Water analysis: emerging contaminants y current issues. *Analitical Chemistry*, *81*(12), 4645–4677. doi: 10.1021/ac058022x.

Richardson, S. D., y Kimura, S. Y. (2017). Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. *Environmental Technology & Innovation*, *8*, 40–56. doi:10.1016/j.eti.2017.04.002

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M. Á., Prados-Joya, G., y Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water: A review. *Chemosphere*, *93*(7), 1268–1287. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.059

von Rymon, G.W. y Hanger, L., (2001). Acesulfame K. En O'brien, L. (Ed.) *Alternative Sweeteners* (pp.23-24). New York: Marcel Dekker, Inc.

Ryu, J., Oh, J., Snyder, S. A. y Yoon, Y. (2014). Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant (Seoul, South Korea). *Environmental monitoring and assessment*, *186*(5), 3239-3251. doi: 10.1007/s10661-013-3613-5

Robertson , W. D., Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J., Spoelstra, J., Schiff, S. L. y otros (2016). Use of an Artificial Sweetener to Identify Sources of Groundwater Nitrate Contamination. *Groundwater*, *54*(4), 579–587. doi:10.1111/gwat.12399

Rother, K. I. , Sylvetsky, A. C., Walter, P. J., Garraffo, H. M. y Fields, D. A. (2018). Pharmacokinetics of Sucralose and Acesulfame-Potassium in Breast Milk Following Ingestion of Diet Soda. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *66*(3), 466–470. doi:10.1097/mpg.0000000000001817

Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y.K., y Leung, K.S. (2014). Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Research*, *52*, 260–274. doi:10.1016/j.watres.2013.11.002

Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N. y otros (2017). Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (Cyprinus carpio). *Science of The Total Environment*, 575, 347–357. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.230

Scheurer, M., Storck, F. R., Brauch, H. J., y Lange, F. T. (2010). Performance of conventional multi-barrier drinking water treatment plants for the removal of four artificial sweeteners. *Water Research*, *44*(12), 3573–3584. doi:10.1016/j.watres.2010.04.005

Scheurer, M., Godejohann, M., Wick, A., Happel, O., Ternes, T. A., Brauch, H.J. y otros (2012). Structural elucidation of main ozonation products of the artificial sweeteners cyclamate and acesulfame. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(4), 1107–1118. doi:10.1007/s11356-011-0618-x

Scheurer, M., Brauch, H.J. y Lange, F.T. (2009). Analysis y occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water y surface water y in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394*(6), 1585–1594. doi: 10.1007/s00216-009-2881-y.

Scheurer, M., Brauch, H.J. y Lange F.T. (2014). Transformation Products of Artificial Sweeteners. En Lambropoulou, D.A. y Nollet, L.M. (Eds.). *Transformation products of emerging contaminants in the environment: Analysis, processes, occurrence, effects and risks* (pp. 658-675). West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.

Shankar, P., Ahuja, S. y Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review y update. *Nutrition*, *29*(11–12), 1293–1299. doi: 10.1016/j.nut.2013.03.024.

Sharma, A., Amarnath, S., Thulasimani, M. y Ramaswamy S. (2016). Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe?. *Indian Journal of Pharmacology,48*(3),237-40. doi: 10.4103/0253-7613.182888

Sharma, V. K., Oturan, M. y Kim, H. (2014). Oxidation of artificial sweetener sucralose by advanced oxidation processes: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(14), 8525–8533.doi:10.1007/s11356-014-2786-y

Sims, J., Roberts, A., Daniel, J. y Renwick, A. (2000). The metabolic fate of sucralose in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *38*, 115–121. doi:10.1016/s0278-6915(00)00034-x

Soffritti, M., Belpoggi, F., Esposti, D. D., Lambertini, L., Tibaldi, E. y Rigano, A. (2005). First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administered in the Feed to Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives*, *114*(3), 379–385. doi:10.1289/ehp.8711

Soh, L., Connors, K. A., Brooks, B. W. y Zimmerman, J. (2011). Fate of Sucralose through Environmental and Water Treatment Processes and Impact on Plant Indicator Species. *Environmental Science & Technology*, *45*(4), 1363–1369. doi:10.1021/es102719d

Spoelstra, J., Schiff, S. L. y Brown, S. J. (2013). Artificial Sweeteners in a Large Canadian River Reflect Human Consumption in the Watershed. *PLoS ONE*, *8*(12), e82706. doi:10.1371/journal.pone.0082706

Stolte, S., Steudte, S., Schebb, N. H., Willenberg, I. y Stepnowski, P. (2013). Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside. *Environment International*, *60*, 123–127. doi:10.1016/j.envint.2013.08.010

Subedi, B., Balakrishna, K., Sinha, R. K., Yamashita, N., Balasubramanian, V. G., y Kannan, K. (2015). Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products, including psychoactive and illicit drugs and artificial sweeteners, in five sewage treatment plants in India. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *3*(4), 2882–2891. doi:10.1016/j.jece.2015.09.031

Sylvetsky, A. C., Abdelhadi, J., Issa, N., y Rother, K. I. (2018). Nonnutritive Sweeteners and Their Role in the Gastrointestinal Tract. *Sweeteners*, 377–392. doi:10.1007/978-3-319-27027-2_4

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O. y otros (2015). Artificial Sweeteners Induce Glucose Intolerance by Altering the Gut Microbiota. *Obstetrical and Gynecological Survey*, *70*(1), 31–32 doi:10.1097/01.ogx.0000460711.58331.9

Swithers, S. E., Baker, C. R. y Davidson, T. L. (2009). General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*, *123*(4), 772–780. doi:10.1037/a0016139

Tollefsen, K., Nizzetto, L. y Huggett, D. B. (2012) Science of the Total Environment Presence , fate y effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment sucralose. *Science of the Total Environment*, *438* , 510–516. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.060.

Torres, C. I., Ramakrishna, S., Chiu, C.A., Nelson, K. G., Westerhoff, P. y Krajmalnik-Brown, R. (2011) Fate of Sucralose During Wastewater Treatment. *Environmental Engineering Science*, *28*(5), 325–331. doi:10.1089/ees.2010.0227

Thomaidis, N.S., Asimakopoulos, A.G., y Bletsou, A.A. (2012). Emerging contaminants: a tutorial mini-review. *Global Nest Journal*, *14*(1), 72-79. https://doi.org/10.30955/gnj.000823

Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J. y Bickerton, G. (2011). Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology*, *401*(1-2), 126–133. doi:10.1016/j.jhydrol.2011.02.013

Whitehouse, C. R., Boullata, J. y McCauley, L. A. (2008). The potential toxicity of artificial sweeteners. *American Association of Health Nurses Journal, 56*(6), 251-261. doi: 10.1177/216507990805600604

Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S. y Ryba, N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, *139*(2), 234-244. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.001.

Zafar, T., Naik, Q. A. y Shrivastava, V. K. (2017). Aspartame: Effects and awareness. *MedCrave Online Journal of Toxicology*, *3*(2), 00046. doi: 10.15406/mojt.2017.03.00046

Zygler, A., Wasik, A., Kot-Wasik, A., y Namieśnik, J. (2011). Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*(7), 2159–2172. doi:10.1007/s00216-011-4937-z

Capítulo 7

PLAGUICIDAS Y CÁNCER EN BAJA CALIFORNIA: REVISIÓN SISTEMÁTICA (1950-2016)

María Evarista Arellano García[1]

Olivia Torres Bugarín[2]*

Marco Antonio García Zárate[3]

Ana Erika Ruiz Arellano[1]

[1] Universidad Autónoma de Baja California

[2] Universidad Autónoma de Guadalajara

[3] Universidad Autónoma de Guadalajara

* oliviatorres@hotmail.com

Resumen

La exposición a plaguicidas como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas, es un tema controversial desde la última mitad del siglo pasado. El objetivo fue analizar la información publicada en la investigación científica y vigilancia epidemiológica sobre el tema del cáncer en Baja California, en relación con los plaguicidas de uso agrícola en el periodo comprendido de 1950 a 2016. La metodología incluyó una búsqueda en las diferentes bases de datos científicas, con la finalidad de ubicar artículos científicos publicados sobre la temática, utilizando los términos "Baja California" "Tijuana", "Ensenada" "Mexicali", en el campo del título y se usó la estrategia de búsqueda con las palabras clave "agroquímicos", "salud", "plaguicidas", "pesticidas" "cáncer" y enfermedades respiratorias". Los resultados mostraron un total de 1811 registros, de los cuales solo 5 % (91) abordan la relación entre plaguicidas y cáncer. Los resultados del análisis exhaustivo de los artículos mostraron que la mayor parte de los estudios utilizan metodologías cualitativas y posibilitó su clasificación en cinco abordajes teóricos principales: (1) biomonitoreos, (2) estudios de casos y controles, (3) estudios de caso, (4) revisiones sistemáticas y (5) estudios epidemiológicos. Se concluye que hay carencia de estudios que utilicen metodologías cuantitativas, especialmente biomonitoreos y estudios epidemiológicos que relacionen la exposición a plaguicidas y la salud humana, en especial en diferentes grupos poblacionales vulnerables como los niños, mujeres y los adultos mayores, que se han relacionado por estudios socio-ambientales con la exposición a plaguicidas en la península de Baja California.

Palabras clave: Agroquímicos, Salud y plaguicidas, Cáncer, Enfermedades respiratorias

1. **Introducción**

La presente revisión resume y analiza la información publicada en la investigación científica y vigilancia epidemiológica sobre el tema del cáncer en Baja California, en relación con los plaguicidas de uso agrícola, con la finalidad de acceder a las siguientes preguntas: ¿Qué información existe en la literatura científica acerca de la relación entre exposición ambiental a plaguicidas y el desarrollo de cáncer en la región de Baja California?; ¿Qué tipo de estudios son los que se encuentran publicados tales como biomonitoreos, revisiones sistemáticas, estudios de caso, estudios clínicos, entre otros?; ¿Cuáles son los vacíos de información en torno a la investigación y vigilancia epidemiológica sobre el cáncer en Baja California y su correlación con la aplicación de plaguicidas?; ¿Cómo se puede avanzar en la investigación en torno a la relación entre salud y exposición a plaguicidas? y ¿Cuáles son las mejores estrategias de intervención en las comunidades para mejorar la salud de las comunidades locales?.

1.1 Plaguicidas y salud humana

La relación entre la presencia de contaminantes ambientales y la salud, es una cuestión de discusión desde la segunda mitad del siglo pasado, ya que las diferentes actividades humanas que liberan sustancias tóxicos a los sistemas naturales se incrementa a medida que la población crece con la consecuente demanda de zonas habitacionales, productos y servicios de la industria y la agricultura (Badii and Landeros, 2007; Claxton, Houk and Hughes, 1998).

En la literatura de investigación biomédica frecuentemente se menciona que el contacto continuo con sustancias contaminantes contribuye a la inestabilidad genética y al riesgo de cáncer en general (Lobo and Bolaños, 2014; Di Renzo et al., 2015)

La exposición a plaguicidas durante el embarazo y la lactancia es generalizada (Koepke et al., 2004) y representa una amenaza para la salud reproductiva, ya que hay decenas o miles de productos químicos en el comercio mundial cuyas exposiciones aun pequeñas durante el embarazo pueden desencadenar consecuencias adversas para la salud como bajo peso al nacer (Braud, Nouer and Lamar, 2009) y alteraciones en el neurodesarrollo (Gunier et al., 2017; Di Renzo et al., 2015).

El riesgo de cáncer en los individuos es una manifestación de la inestabilidad genética (Fenech, 2006), y consiste en el deterioro de la información codificada en el genoma humano. Una forma en la que el daño al ADN se manifiesta, es por la pérdida de material genético durante la duplicación celular (Kisurina-Evgenieva, Sutiagina and Onishchenko, 2016).

La inestabilidad genética es la hipótesis fundamental en los procesos del desarrollo de cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas (Tubbs and

Nussenzweig, 2017; Daniels et al., 1997). Las alteraciones mutacionales que se producen en las etapas tempranas de formación de tumores, son capaces de conferir inestabilidad de forma progresiva mediante la generación de inserciones, translocaciones o deleciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Boyko and Kovalchuk, 2011; Daniels et al., 1997).

1.2 Aplicación de Plaguicidas en Baja California

El desarrollo agrícola y el uso de productos fitosanitarios en Baja California inicia durante la primera mitad del siglo pasado con la aplicación de arseniatos de plomo, cobre y calcio (Moreno Mena and López Limón, 2005; Camarena-Ojinaga et al., 2012). Posteriormente, entre 1948 y 1965, los plaguicidas empleados de forma preponderante eran los compuestos organoclorados y tiempo después, entre 1965 y 1980, tras el auge de los compuestos organoclorados persistentes y altamente tóxicos como el DDT, se comenzaron a usar los compuestos organofosforados (Ramos et al., 2008). Desde entonces y hasta la fecha se han empleado una diversidad de plaguicidas organoclorados, organofosforados, y más recientemente compuestos como piretrinas, piretroides entre otros (Moreno Mena and López Limón, 2005; Zuñiga-Violante et al., 2015). VoPham et al. (2015). Annesi-Maesano et al., (2007), McKenzie et al., (2014) y Norton et al., (1992) han establecido que es más riesgoso para la salud vivir cerca de un sitio contaminado que portar algún gen de susceptibilidad genética para padecer defectos al nacimiento.

El Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos estableció que los defectos al nacimiento afectan a más de ocho millones de niños cada año, lo cual representa el seis por ciento del total de niños que nacen en el mundo anualmente y de estos, cerca de tres millones mueren antes de cumplir los cinco años (Braud, Nouer and Lamar, 2009).

Por otra parte, algunos estudios sugieren que el estilo de vida actual, así como la movilidad de agentes genotóxicos físicos, químicos y biológicos en el medio ambiente y a través de la cadena alimenticia constituyen una amenaza constante a la integridad de la información hereditaria no solo de los seres humanos, sino también de otras especies vegetales y animales (VoPham et al., 2015; Annesi-Maesano et al., 2007; McKenzie et al., 2014; Norton et al., 1992).

En el caso especial de México y específicamente en las zonas agrícolas bajacalifornianas, una gran parte de la población que se dedica a las labores del campo carecen de los mínimos aceptables de bienestar, especialmente en lo que se refiere a los indicadores de acceso a la vivienda, salud y educación, además de que frecuentemente están sujetos a la violación constante de sus derechos laborales (Camarena-Ojinaga et al., 2011; Von-Glascoe et al., 2018; Glascoe, Ojinaga and Garcia, 2014) y por lo tanto constituyen una población vulnerable a los efectos sobre la salud por contaminación con plaguicidas, metales pesados y otros xenobióticos (Lara-Flores, 2008).

A pesar de que los plaguicidas, especialmente los carcinogénicos, constituyen un serio problema para la salud pública (Alavanja, Hoppin and Kamel, 2004; Arellano-García et al., 2012a); es hasta cierto punto un contrasentido que se encuentren en la literatura más estudios de los daños al material hereditario en plantas y animales, que en poblaciones humanas expuestas a estos agentes. Por lo anterior, se sugiere estudiar y documentar el efecto que los plaguicidas tienen en la salud humana, con base en determinaciones que provean evidencias lo suficientemente persuasivas, para dar seguimiento y desarrollar estrategias que permitan garantizar la salud e integridad del genoma humano y de esta manera prevenir los costos en cuidados médicos e inversiones en atención de personas enfermas por las secuelas de los distintos padecimientos provocados por estos contaminantes, mediante el desarrollo de estudios de epidemiología molecular.

2. Metodología

La metodología utilizada para el presente trabajo se basó las directrices para la realización de revisiones sistemáticas en gestión medioambiental del Centro de Evidencia Ambiental (CEE, por sus siglas en inglés) (CEE), 2013), para lo cual se realizó una búsqueda en las diferentes bases de datos científicas y la revisión se basó en el análisis estadístico de los registros de vigilancia epidemiológica de egresos hospitalarios por defunción, que publica la Secretaría de Salud de México entre los años 2005 y 2016.

Las búsquedas se efectuaron en las bases de datos Elsevier, PubMed, Ebscohost, Science Direct, Google Schoolar, Redalyc y Dialnet, con la finalidad de ubicar artículos científicos, ponencias en congresos científicos y tesis de licenciatura, maestría y doctorado presentadas en las principales universidades de México. Se utilizaron los términos "Baja California","Tijuana", "Ensenada", "Mexicali", en el campo del título y se usó la estrategia de búsqueda con las palabras clave "agroquímicos", "salud", "plaguicidas", "cáncer" y enfermedades respiratorias" en los otros campos del sistema de búsqueda sin especificar éstos a detalle.

El análisis inició con la lectura del título de las publicaciones localizadas bajo los criterios de búsqueda antes descritos, con la finalidad de excluir todos aquellos artículos de estudios ecotoxicológicos, que no se relacionan con cáncer en seres humanos.

Después de esta primera condensación de la información se procedió a la lectura exhaustiva de los resúmenes para después y cuando fue necesario se examinó el contenido completo de cada artículo, especialmente aquellas más apegados a los propósitos del estudio.

Los artículos localizados se clasificaron con base en cuatro criterios: (1) tipo del estudio, (2) perspectiva de abordaje teórico de la relación Cáncer y Químicos

Tóxicos, (3) el lugar del estudio y por ultimo (4) la naturaleza de recogida de los datos.

Se identificaron cinco tipos de estudios diferentes: (a) biomonitoreos (b) estudios de casos y controles, (c) estudios de caso, (d) revisiones sistemáticas y (e) estudios epidemiológicos.

El segundo criterio de clasificación fue la perspectiva de abordaje teórico del estudio, la cual reunió cinco perspectivas teóricas: análisis de riesgos socio-ambientales, contaminación ambiental, política ambiental, salud pública y toxicología ambiental

El lugar del estudio fue el tercer criterio de clasificación, el cual buscó aglutinar los estudios en tres grupos, aquellos que se refieren a una o dos localidades de Baja California o Baja California Sur, los que abarcan toda la República Mexicana o los que engloban varios países o todo el mundo.

El cuarto y último criterio de clasificación fue la naturaleza de los datos presentados, los cuales se identificaron como datos de naturaleza cuantitativa si el estudio analizado usó cuantificaciones, como la determinación de biomarcadores de exposición o de efecto. También se consideró en este grupo los estudios basados en cuestionarios de encuesta, los cuales presentaron sus resultados en forma de porcentajes o frecuencias utilizando análisis estadístico. En cambio, se identificó como estudios de naturaleza cualitativa si el abordaje estuvo basado en técnicas de análisis social, como la mayoría de los estudios sociológicos o de política ambiental.

3. Resultados

Un total de 1811 registros de artículos fueron localizados en las diferentes bases de datos revisadas, los cuales se inspeccionaron a nivel de título del artículo con la finalidad de analizar su pertinencia en relación con los temas de interés de la presente revisión.

Llama la atención que en el caso específico de Baja California, solo 5 % (91 artículos) de la literatura científica revisada esté enfocada a los tópicos de la relación de plaguicidas con la salud humana en contraste con estudios ecotoxicológicos que se centran en otros grupos taxonómicos, principalmente invertebrados marinos y peces.

Este segundo proceso de concentración de la información produjo 53 artículos que se fueron leídos en su totalidad y se presentan en la tabla I.

En la primera columna se presenta el autor o los autores del trabajo y en las demás columnas se especifica bajo qué categoría, de cada uno de los cuatro criterios mencionados utilizados para la sistematización: (1) tipo del estudio, (2)

perspectiva de abordaje teórico de la relación cáncer y plaguicidas, (3) el lugar del estudio y por ultimo (4) la naturaleza de recogida de los datos.

Tabla I. Clasificación de los artículos analizados y sistematizados (Fuente: Elaboración propia).

Autores	Tipo del estudio	Abordaje teórico de la relación entre Cáncer y Químicos Tóxicos	Lugar del estudio	Naturaleza de los datos
(Albert, 2005)	Revisión sistemática	Contaminación ambiental	México y menciona BC	Cualitativo
(Anguiano-Téllez, 2007)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	San Quintín	Cualitativo
(Arellano-García et al., 2009)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Mexicali BC y San Quintín	Cualitativo
(Arellano-García et al., 2012)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	San Quintín y otras zonas agrícolas	Cualitativo
(Aristizabal et al., 2015)	Estudio epidemiológico	Salud Pública	Tijuana, B. C.	Cuantitativo
(Batres Guadarrama, 2013)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Bousman et al., 2011)	Estudio de caso	Salud Pública	San Quintín	Cualitativo
(Bowen, Kontuly and Hepner, 1995)	Revisión sistemática	Contaminación ambiental	Baja California y NW de México	Cualitativo
(Camarena Ojinaga et al., 2013)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	San Quintín	Cualitativo
(Camarena-Ojinaga et al., 2012)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	San Quintín	Cualitativo
(Carranza-Reyna y Badilla-López, 2002)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Mexicali, B.C.	Cuantitativo
(Carton De Grammont y Lara Flores, 2010)	Revisión sistemática	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Castañeda-Yslas et al., 2016)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Maneadero, B.C.	Cuantitativo
(Chávez-García,	Estudio epidemiológico	Salud Pública	México y menciona BC	Cuantitativo

Zonana-Nacach y Duarte, 2007)				
(Cifuentes et al., 2010)	Revisión sistemática	Política ambiental	México	Cualitativo
(Colín-Torres et al., 2014)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Baja California Sur	Cuantitativo
(Cororia-Zambrano y Rojas-Caldelas, 2008)	Revisión sistemática	Política ambiental	Mexicali	Cualitativo
(De Oliveira and García, 1998)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Díaz Caravantes, Castro Luque y Aranda Gallegos, 2014)	Estudio epidemiológico	Salud Pública	Mexicali	Cuantitativo
(Díaz-Romo y SalinasÁlvarez, 2010)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Nayarit	Cualitativo
(Esplugues et al., 2007)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	España	Cualitativo
(Estévez-González, 2008)	Revisión sistemática	Contaminación ambiental	Tijuana, B. C.	Cualitativo
(Garduño, 1991)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	San Quintín	Cualitativo
(Garduño, Ovalle y Mata, 2011)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Maneadero y San Quintín B.C.	Cualitativo
(Gómez-Arroyo et al., 2013)	Revisión sistemática	Salud Pública	América Latina	Cuantitativo
(Gómez-Arroyo et al., 2013)	Revisión sistemática	Toxicología ambiental	Latinoamérica	Cualitativo
(González-López et al., 2009)	Estudio epidemiológico	Salud Pública	México	Cuantitativo
(Grajales Pérez et al., 2014)	Estudio epidemiológico	Salud Pública	México	Cuantitativo
(Hernández-Antonio y Hansen, 2011)	Estudio de caso	Contaminación ambiental	México	Cuantitativo
(Hernández-	Biomonitoreo o	Salud Pública	Tijuana, B. C.	Cuantitativo

Morales, Zonana-Nacach y Zaragoza-Sandoval, 2009)	estudio de casos y controles			
(Jiménez-Cruz, Leyva-Pacheco y Bacardi-Gascón, 1993)	Revisión sistemática	Salud Pública	N/A	Cualitativo
(Jordán-Ramírez, 2000)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Lara-Flores, 2008)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Leyva-Morales et al., 2014)	Estudio de caso	Contaminación ambiental	Culiacán Sinaloa	Cualitativo
(Luján, 2006)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Zamora, Michoacán	Cualitativo
(Luque-Agraz, 2008)	Estudio de caso	Política ambiental	BC	Cualitativo
(Martinez-Cordero y Gavilán-García, 2004)	Revisión sistemática	Política ambiental	México	Cualitativo
(Martínez-Rodríguez, 2003)	Revisión sistemática	Contaminación ambiental	Frontera Mex USA	Cualitativo
(Montaño-Soto et al., 2014)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Maneadero, B.C.	Cuantitativo
(Moreno Mena y López Limón, 2005)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Baja California	Cuantitativo
(Ortíz, Avila-Chávez y Torres, 2013)	Revisión sistemática	Política ambiental	México	Cuantitativo
(Osornio-Vargas et al., 1991)	Estudio de caso	Toxicología ambiental	Mexicali BC	Cuantitativo
(Quintero Núñez y Moncada Aguilar, 2008)	Estudio de caso	Contaminación ambiental	Mexicali y Valle Imperial	Cuantitativo
(Ramos et al., 2008)	Estudio de caso	Salud Pública	Texas-México	Cuantitativo
(Rao et al., 2007)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	USA	Cualitativo
(Rivera-Luna et al., 2013)	Estudio epidemiológico	Salud Pública	México	Cuantitativo
(Rodríguez, 2013)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	América Latina	Cualitativo

(Rojas-Rangel, 2007)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	México	Cualitativo
(Schwartz et al., 2015)	Estudio de caso	Análisis de riesgos socioambientales	Valle de San Joaquín	Cualitativo
(Valdez-Salas et al., 2000)	Estudio de caso	Contaminación ambiental	Valle de Mexicali	Cuantitativo
(Zúñiga-Violante et al., 2012)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Mexicali, Maneadero y San Quintín, BC	Cuantitativo
(Zúñiga-Violante et al., 2012)	Biomonitoreo o estudio de casos y controles	Toxicología ambiental	Valle de San Quintín B.C.	Cuantitativo
(Zuñiga-Violante et al., 2015)	Estudio de caso	Contaminación ambiental	Maneadero, BC	Cuantitativo

El tipo de estudio más común entre los artículos revisados fue el estudio de caso con 28 artículos (51 %), el segundo fue el de revisión sistemática con 13 artículos (24 %), en cambio los más escasos correspondieron a los biomonitoreo o estudio de casos y controles (8 trabajos, 15 %) y el menos común resultó ser el estudio epidemiológico con 6 artículos (11 %), como puede observarse en la figura 1.

Solo 49% de los estudios analizados fueron realizados en alguna localidad de Baja California, principalmente el valle agrícola de San Quintín, o Mexicali. Se encontró uno en la ciudad de Tijuana y uno también en Baja California Sur. Fue notorio que la mayor parte de estos trabajos solo mencionan a Baja California o Baja California Sur de manera imprecisa sin puntualizar datos específicos de estas dos zonas como ciudad, localidad u otros datos geográficos.

En la figura1 se muestran las cinco categorías en las que se clasificó la perspectiva teórica de la relación entre cáncer y químicos tóxicos, bajo la cual se abordan los diferentes artículos revisados: (1) análisis de riesgos socio-ambientales, que fue la más abundante con 20 trabajos (36 %); seguida por el tema de salud pública, con 12 estudios (22%). Los temas de contaminación ambiental y toxicología ambiental reunieron 9 trabajos cada uno (16%) y en último término se ubicaron aquellos artículos referentes a política ambiental que en total fueron sólo 5 (9 %).

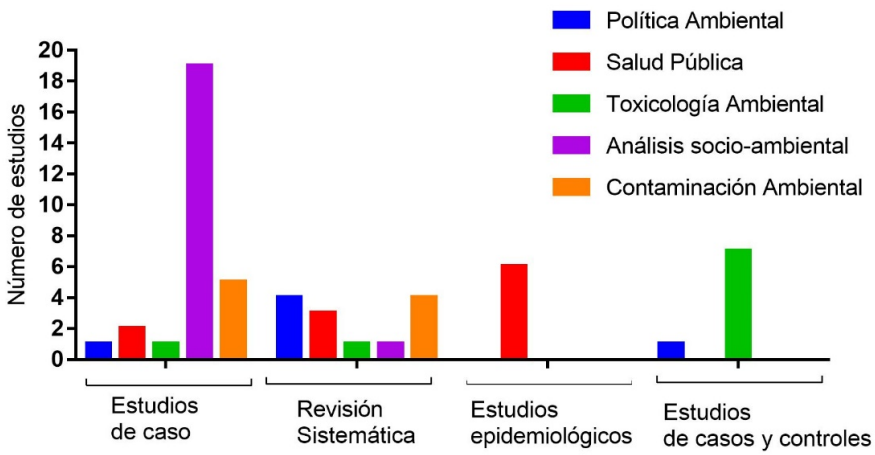


Figura 1. Frecuencia de los tipos de estudios en los artículos analizados y la perspectiva de abordaje teórico utilizado.

Otro aspecto que se consideró, fue la naturaleza de los datos utilizados en el trabajo, según si fue de naturaleza cuantitativa o cualitativa; lo anterior porque este aspecto tiene que ver con la aceptabilidad de las conclusiones cuando se trata de argumentar la relación entre los plaguicidas en el ambiente y su relación con el cáncer, como lo ha comentado Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez and Fajardo-Gutiérrez, (2005), en el sentido de que faltan más datos '"duros" a la hora de correlacionar los diferentes factores de riesgo de cáncer, especialmente los plaguicidas. (Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez and Fajardo-Gutiérrez, 2005).

Como puede observarse en la figura 2, en general la mayoría de los estudios son de corte cualitativo (29 artículos), mientras que los de naturaleza cuantitativa solo fueron 26.

Es importante hacer notar que en lo que respecta al tema de política ambiental y al tema de riesgos socio-ambientales, la mayoría de los trabajos fueron cualitativos. Lo anterior se explica porque una alta proporción de estos trabajos toma en cuenta aspectos de justicia laboral, dentro de la cual se toca al menos tangencialmente la exposición a plaguicidas como un riesgo laboral.

En contraste, en los temas de salud pública, toxicología ambiental y contaminación ambiental prevalecen los datos de naturaleza cuantitativa, como biomonitoreos o estudios de caso, cuyos resultados los presentan en valores en términos de determinaciones de biomarcadores o por lo menos en porcentajes.

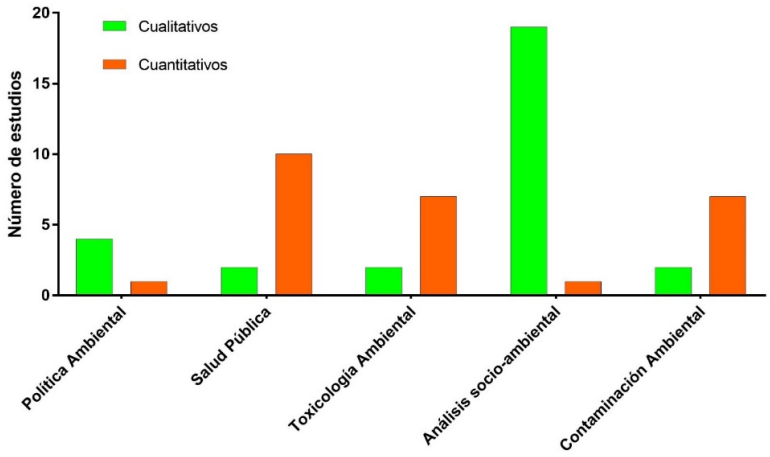


Figura 2. La naturaleza de los datos utilizados en el trabajo en los distintos tipos de abordaje teórico utilizados.

Baja California y Baja California Sur se ubican entre los estados con alta tasa media de mortalidad anual (TMMA) por leucemias agudas en niños menores de 20 años, la cual fue ubicada entre 30.8 y 36.1 por (Rizo-Ríos et al., 2005)

Otro estudio epidemiológico interesante fue el efectuado por el Sector Salud de México, (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011) donde se describió la incidencia relativa en menores de 20 años con cáncer por entidad federativa, en la cual refieren que en un periodo de 5 años de 2005 a 2010, Baja California Sur ocupa el primer lugar en incidencia relativa por millón de habitantes en Baja California Sur con 147casos y Baja California se ubica en el noveno sitio con una incidencia de 51 casos. En el caso específico de las leucemias, llama la atención que Baja California Sur, junto con Chihuahua, Aguascalientes y los estados colindantes al Golfo de México presentan la mortalidad más elevada en el año 2008 como se desprende de la figura 3.

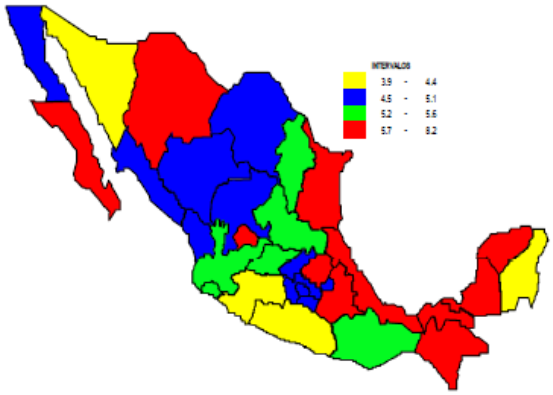


Figura 3. Mortalidad por leucemias en niños y adolescentes (RCNA), de la Secretaría de Salud de 2005 a 2009. Fuente: (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011) Con permiso de los autores.

Un análisis epidemiológico realizado por el Sector Salud, (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011) indica que de las neoplasias malignas en niños hay una incidencia general a nivel mundial de 100 a 150 casos anualmente. Sin embargo, en países en vías de desarrollo se han notificado tasas menores, de alrededor de 45 casos lo que conduce a suponer que existe un sub-registro considerable en estos países (Costa Rica, Venezuela, Panamá, México, Argentina, Uruguay, Colombia). Otro aspecto interesante que mencionan estos autores, es que a pesar de que se desconocen las causas del cáncer en los niños, existen suficientes evidencias para poder afirmar que la exposición a compuestos ambientales como los derivados del benceno (Garcia Zarate et al., 2015) y los plaguicidas, así como la exposición a campos electromagnéticos, pueden ser causantes de neoplasias en la población infantil, lo que lleva a suponer que el cáncer en niños es prevenible (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011).

4. Discusión

Los estudios de cáncer entre los trabajadores agrícolas son difíciles de realizar e interpretar dada la naturaleza única de este grupo ocupacional. La temporalidad e intermitencia en el empleo, altos niveles de pobreza, la carencia de registro en los servicios médicos (IMSS, Seguro Popular) y la poca documentación oficial, dificultan el llevar a cabo estudios epidemiológicos. Sin embargo en términos numéricos, esta fuerza laboral está en alto riesgo de exposición a numerosas sustancias tóxicas, entre otros riesgos, incluyendo la excesiva luz solar, calor,

maquinaria peligrosa, gases, fertilizantes, polvo y plaguicidas (Mills, Dodge and Yang, 2009).

Mills y sus co-autores (2009), resumen las características de los trabajadores agrícolas, sobre demografía y salud, a partir de la encuesta nacional de trabajadores agrícolas y la encuesta de Trabajadores Agrícolas de California (California Agricultural Workers Survey, CAWS). Sus resultados muestran que muchos de los trabajadores agrícolas en California y el resto de los Estados Unidos, son estacionales y tienen alto riesgo de adquirir numerosas formas de cáncer en comparación con el general de la población; comentan que hay plaguicidas específicos pueden estar asociados con este riesgo. Se han encontrado riesgos elevados para linfomas y cáncer de próstata, cerebro, leucemia, cuello uterino y cáncer de estómago (Mills, Dodge and Yang, 2009).

Con la metodología de autopsia oral, González-López et al. (2009), evalúan las causas de mortalidad por cáncer de seno de 81 mujeres, encontrando que la edad al momento de morir fue de 53 ± 15; 25 % tenían antecedentes familiares directos de cáncer de mama, 31 % sobrepeso (25), en 17 % (14), la detección del tumor fue hecha por personal de salud. El promedio en años de sobrevida posterior al diagnóstico fue de 2.3 años (González-López et al., 2009).

Similarmente, Chávez-García, Zonana-Nacach y Duarte (2007) evaluaron las causas de muerte mediante autopsia verbal de 87 personas fallecidas por cáncer cervicouterino (CaCu) en Tijuana, Baja California. Dentro de los factores de riesgo para contraer CaCu se especificó que 32 % (28) fue el hábito de fumar, 50 % (44), por tener más de cinco hijos, 42 % (37), atribuible a iniciar la vida sexual activa antes de los 17 años, 52 % (45), por tener dos o tres parejas sexuales. 59 % (51) de las mujeres con CaCu se habían realizado un Papanicolaou, 90 % (79), conocía su enfermedad, 34 % (30), supo que tenía CaCu apenas un año antes de morir y 86 % (75), recibió atención médica (Chávez-García, Zonana-Nacach and Duarte, 2007). No obstante en estos dos estudios no se explora la exposición a plaguicidas como factor de riesgo.

En torno a los estudios de biomonitoreo, Castañeda-Yslas, et al., (2016) evaluaron el efecto genotóxico en mucosa bucal de mujeres agricultoras y niños hijos de jornaleros en el valle agrícola de Maneadero, Baja California en comparación con mujeres y niños no expuestos. Se encontraron diferencias entre los agricultores y las mujeres no expuestas; también se detectó mayor daño genético en niños hijos de jornaleros que en niños no expuestos (Castañeda-Yslas et al., 2016). Por lo que trabajar en el campo es un riesgo de daño genotóxico. Por otra parte, Palacio-Mejía et al., (2003), analizan variables socioeconómicas y concluye que tener bajo ingreso y vivir en zonas de alta marginalidad incrementan el riesgo de mortalidad en mujeres por cáncer cervicouterino (Palacio-Mejía et al., 2003).

En un informe de la Secretaría de Salud de México (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011), se sostiene que correlacionar la exposición a plaguicidas con determinadas enfermedades es muy difícil, porque no existen normas uniformes y métodos para la gestión de información relacionada con la enfermedad y mortalidad. El informe recomienda la expansión del seguimiento de la salud pública de enfermedades de la niñez y otros resultados de salud que están potencialmente relacionados con exposiciones a los contaminantes en el medio ambiente. El informe también recomienda fortalecer redes científicas y médicas para facilitar el intercambio más eficiente de información sobre salud y exposición ambiental de los niños (SINAVE/DGE/SALUD/, 2011)

En el informe sobre cifras de mortalidad en México 1990 a 2000 que publica la revista del Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública de la cámara de diputados, se puede extraer parte de la información sobre la evolución de distintos tipos de cáncer para los estados de Baja California y Baja California Sur, ubicándose ésta causa entre la segunda y la tercera causa de mortalidad, con tasas de mortalidad que oscilan entre 52.1 % a 65.5 %; no obstante no muestran datos desagregados sobre leucemias, que son uno de los más vinculados con la exposición a plaguicidas, (CESOP, 2004).

Zúñiga-Violante et al., (2012) en un biomonitoreo de casos y controles con jornaleros del Valle de San Quintín Baja California, revelan que la exposición ambiental y ocupacional a plaguicidas se relaciona con altos niveles de daño genotóxico en hombres y mujeres trabajadores en comparación con controles no jornaleros, resaltando el hecho de que son las mujeres las más afectadas, con tendencia a aumentar el daño conforme se incrementa el tiempo de permanecer en el trabajo agrícola. En un estudio complementario, Arellano-García et al., (2012) estudiaron el daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California, puntualizando que estas alteraciones pueden tener efectos transgeneracionales dado que la mayoría de los plaguicidas utilizados en la agricultura de la región, tienen la capacidad de actuar como disruptores endócrinos (Zúñiga-Violante et al., 2012; Arellano-García et al., 2012b).

Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez y Fajardo-Gutiérrez, (2005), describen la epidemiología de las leucemias agudas en México, puntualizando que el cáncer es la segunda causa de muerte en la población de 1 a 15 años de edad y entre estos, las leucemias agudas son las más frecuentes en niños menores de 15 años y su frecuencia se ha incrementado en todo el mundo; específicamente, la frecuencia de las leucemias agudas se ha incrementado y mencionan como los factores de riesgo más consistentes las exposiciones ocupacionales, exposición a plaguicidas y la exposición in útero a rayos X, en cambio se menciona que factores como la exposición a campos electromagnéticos, la dieta, el tabaquismo y alcoholismo en los padres, no han arrojado resultados consistentes, porque la mayoría de las veces no se evalúa la interacción entre la susceptibilidad a la leucemia aguda y los factores

ambientales, situación que podría conducir al mejor entendimiento de los mecanismos causales de la enfermedad. Llama la atención que Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez y Fajardo-Gutiérrez (2005) se muestren cautelosos para admitir que dichos factores causen las leucemias agudas, pero en cambio recomienda una postura enérgica para disminuir la exposición a los mismos y dictaminar medidas preventivas más adecuadas (Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez and Fajardo-Gutiérrez, 2005)

4.1 Escasez de datos y subregistros

Fajardo-Gutierrez et al. (1999), en una análisis epidemiológico de las neoplasias malignas en niños señala que mundialmente hay una incidencia general anual de 100 a 150 nuevos casos cada año. Sin embargo, en países en vías de desarrollo se han notificado tasas de incidencia anual mucho menores, de alrededor de 45 casos nuevos al año (Costa Rica, Venezuela, Panamá, México, Argentina, Uruguay, Colombia), lo que conduce a que hacen sospechar existe un sub-registro considerable en (Fajardo-Gutiérrez et al., 1999).

Otro aspecto interesante que mencionan Fajardo-Gutierez, et al (1999), es que a pesar de que se desconocen las causas del cáncer en los niños, existen suficientes conocimientos teóricos para poder afirmar que la exposición a compuestos ambientales como los derivados del benceno y los plaguicidas, así como la exposición a campos electromagnéticos, pueden ser causantes de neoplasias en la población infantil, lo que lleva a suponer que el cáncer en el niño es prevenible (Fajardo-Gutiérrez et al., 1999).

Baja California y Baja California Sur se ubican entre los estados de la República Mexicana con alta tasa media de mortalidad anual (TMMA) por leucemias agudas en niños menores de 20 años, la cual fue estudiada por Rizo-Ríos et al., (2004).

Por otra parte, Reyna y López-Badilla, (2002) midieron la concentración del gas radioactivo radón en los interiores de los hogares de Mexicali; con el propósito de establecer la relación entre el nivel de éste gas al interior del domicilio, con los casos de muerte por cáncer de pulmón. Los datos revelaron que en los hogares de los fallecidos por cáncer pulmonar, las concentraciones de radón eran elevadas en comparación con los hogares en donde no hubo casos de muertes por este padecimiento (Carranza-Reyna and Badilla-López, 2002).

En un estudio publicado sobre labio paladar hendido (LPH) en México, encontraron poca relación con el abuso de psicotrópicos y alcohol por parte de los padres y resalta el hecho de que el número de casos se relacionó más con la cantidad de residuos sólidos y residuos urbanos (González-Osorio et al., 2011).

El único estudio localizado sobre el tema de cáncer y plaguicidas en la región de Baja California, fue realizado por Hernández-Morales el al. (2009), es un

estudio descriptivo, transversal, relacional, de casos y controles; el cual incluyó la aplicación de un interrogatorio a madres de 47 niños diagnosticados con algún tipo de leucemia y sus respectivos controles, con la finalidad de explorar los principales factores de riesgo para desarrollar algún tipo de leucemia.

Una revisión de artículos sobre los factores de riesgo para el cáncer de mama en México en contraste con poblaciones de México-americanas encontró en un total de 23 artículos revisados, solo 4 hacen referencia a plaguicidas como el DDT y el alcohol. No obstante los factores de riesgo mayormente detectados son la obesidad, la poca actividad física y la historia familiar de cáncer. En contraste los efectos protectores más comentados son embarazos a temprana edad y lactancia de al menos seis meses (Grajales Pérez et al., 2014).

Montaño-Soto et al (2014), en un estudio de casos y controles en el valle de Maneadero, Baja California con 48 mujeres, previa firma de consentimiento informado, evaluaron los efectos al material genético (ADN) causados por la exposición ocupacional a plaguicidas en mujeres: 26 colocados en el grupo expuesto y 22 en el grupo control. Se recogió información socio-demográfica mediante cuestionario y el daño del ADN se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis. El estudio reveló que las mujeres expuestas a productos químicos agrícolas tienen significativamente mayor daño al ADN $p < 0.05$) en comparación con el grupo de control. Estos resultados sugieren que la genotoxicidad se asocia con la exposición ocupacional y ambiental a agroquímicos (Montaño-Soto et al., 2014).

Aristizabal et al. (2015), en una colaboración binacional para mejorar la calidad de la atención médica para pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia, dan cuenta de las disparidades a ambos lados de la frontera San Diego-Tijuana y en un periodo de cinco años, logran aumentar la sobrevida de los pacientes y otros aspectos de la calidad de la atención de más de 600 pacientes incorporados al programa (Aristizabal et al., 2015). Con base en lo anteriormente expuesto, y a partir de lo que se desprende de los resultados y la discusión de los mismos, es factible proponer las siguientes conclusiones y recomendaciones.

5 Conclusiones

La mayor parte de las investigaciones publicadas y analizadas en este trabajo, sobre la relación entre cáncer y plaguicidas, fueron de corte sociológico y utilizando metodologías cualitativa.

Aunado al subregistro de casos de cáncer en general, hay carencia de estudios en Baja California y Baja California Sur que planteen estudios sobre la relación entre exposición a plaguicidas y los distintos tipos de cáncer, en especial aquellos que se han relacionado por largo tiempo con estos contaminantes en

diferentes grupos poblacionales, como es el caso de los niños, las mujeres y los adultos mayores.

Estudios sobre las directrices y políticas públicas encaminadas a proteger a los niños de los peligros ambientales, señalan que en México se carece de herramientas en las políticas públicas para proteger a la población en general de los riesgos ambientales, pero especialmente a los niños.

Existe la necesidad de realizar estudios longitudinales que den cuenta de los efectos transgeneracionales por exposición a plaguicidas, que contemplen la evaluación de biomarcadores de exposición como el contenido de contaminantes en sangre u otros tejidos humanos, así como de efecto, por ejemplo biomarcadores de daño genético.

Es necesario desarrollar estrategias que permitan involucrar a las comunidades de mayor riesgo en acciones preventivas sobre todo en lo que respecta al uso y manejo de plaguicidas en el hogar y en el trabajo.

Agradecimiento

Los autores agradecen a *International Community Fountation* por el apoyo económico para el proyecto: "Químicos Tóxicos y Cáncer en Baja California".

6. Referencias

Alavanja, M. C. R., Hoppin, J. A. and Kamel, F. (2004). Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annual Review of Public Health*, 25 (1), pp.155–197. [Online]. Available at: doi:10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020.

Annesi-Maesano, I. et al. (2007). Residential proximity fine particles related to allergic sensitisation and asthma in primary school children. *Respiratory Medicine*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.rmed.2007.02.022.

Arellano-García, M. E. et al. (2012a). Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. In: Cedillo, L. and Cano, F. (Eds). *Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas*. INECOL. México, D. F.

Arellano-García, M. E. et al. (2012b). Daño genotóxico en mujeres y hombres expuestos a plaguicidas en cuatro localidades de Baja California. In: *Género, Ambiente y Contaminación por Sustancias Químicas*.

Aristizabal, P. et al. (2015). Improving Pediatric Cancer Care Disparities Across the United States-Mexico Border: Lessons Learned from a Transcultural Partnership between San Diego and Tijuana. *Frontiers in public health*, 3 (June), p.159. [Online]. Available at: doi:10.3389/fpubh.2015.00159.

Badii, M. H. and Landeros, J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCyT/Toxicología de Plaguicidas*, 4 (19), pp.21–34.

Bernes, C. et al. (2013). *Directrices para revisiones sistemáticas y síntesis de las evidencias en gestión medioambiental*. Bangor, UK.

Boyko, A. and Kovalchuk, I. (2011). Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.pbi.2011.03.003.

Braud, T., Nouer, S. and Lamar, K. (2009). Residential proximity to toxic release sites and the implications for low birth weight and premature delivery. *Journal of environmental health*, 73 (6), pp.8–13.

Camarena-Ojinaga, L. et al. (2012). Agroquímicos y mujeres indígenas jornaleras en Baja California. In: *Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas*.

Camarena-Ojinaga, M. de L. et al. (2011). Agroquímicos: aspectos laborales y de salud de las jornaleras indígenas migrantes en Baja California. In: *Género, salud y ambiente laboral*.

Carranza-Reyna, M. A. and Badilla-López, G. (2002). Estudio del efecto del radón en los casos de muerte por cáncer pulmonar en la población de Mexicali, Baja California, México. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 23 (2), p.68.

Castañeda-Yslas, I. J. et al. (2016). Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*. [Online]. Available at: doi:10.1155/2016/7934257.

CESOP. (2004). *Cifras de mortrtalidad en México 1990 2000*.

Chávez-García, V. M., Zonana-Nacach, A. and Duarte, M. E. (2007). Autopsia verbal en cáncer cervicouterino. *Revista Medica del IMSS*, 45 (2), pp.199–204.

Claxton, L. D., Houk, V. S. and Hughes, T. J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 410 (3), pp.237–243. [Online]. Available at: doi:10.1016/S1383-5742(98)00008-8.

Daniels, J. L. et al. (1997). Pesticides and childhood cancers. *Environmental Health Perspectives*, 105 (10), pp.1068–1077.

Fajardo-Gutiérrez, A. et al. (1999). Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 6 (2), pp.75–88.

Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a 'cytome' assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028.

Garcia Zarate, M. A. et al. (2015). Mapa cualitativo para el análisis de riesgo por BTEX por proximidad con gasolineras en la ciudad de Ensenada, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental, ISSN-e 1697-2791, Nº. 15, 1, 2015 (Ejemplar dedicado a: Emergencias y desastres), págs. 4-12*, 15 (15), pp.4–12.

Glascoe, C. A. Von, Ojinaga, L. C. and Garcia, E. A. (2014). *Experiences of Indigenous Female Day Laborers Relating to Work and Health in Northwestern Mexico*. (February).

González-López, J. de J. et al. (2009). Autopsia verbal de mujeres fallecidas por cáncer de mama en Baja California. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 47 (6), pp.591–595.

González-Osorio, C. A. et al. (2011). Estudio ecológico en México (2003-2009) sobre labio y/o paladar hendido y factores sociodemográficos, socioeconómicos y de contaminaci??n asociados. *Anales de Pediatria*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.anpedi.2011.01.011.

Grajales Pérez, E. G. et al. (2014). Factores de riesgo para el cáncer de mama en México: revisión de estudios en poblaciones mexicanas y México-americanas. *Revista CES Salud Pública, ISSN-e 2145-9932, Vol. 5, Nº. 1, 2014, págs. 50-58*, 5 (1), pp.50–58.

Gunier, R. B. et al. (2017). Prenatal residential proximity to agricultural pesticide use and IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspectives*. [Online]. Available at: doi:10.1289/EHP504.

Kisurina-Evgenieva, O. P., Sutiagina, O. I. and Onishchenko, G. E. (2016). Biogenesis of micronuclei. *Biochemistry (Moscow)*, 81 (5), pp.453–464. [Online]. Available at: doi:10.1134/S0006297916050035.

Koepke, R. et al. (2004). Serum DDT and DDE Levels in Pregnant Women of Chiapas, Mexico. *Archives of Environmental Health*. [Online]. Available at: doi:10.1080/00039890409603434.

Lara-Flores, S. (2008). ¿Es posible hablar de un trabajo decente en la agricultura moderno-empresarial en México? *El Cotidiano*, 23, pp.25–33.

Lobo, T. M. and Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18 (2), pp.18–26.

McKenzie, L. M. et al. (2014). Research | Children ' s Health Birth Outcomes and Maternal Residential Proximity to Natural Gas Development in Rural Colorado.

Environmental Health Perspectives. [Online]. Available at: doi:10.1289/ehp.1306722.

Mejía-Aranguré, J. M., Ortega-Álvarez, C. M. and Fajardo-Gutiérrez, A. (2005). Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 1 Revista Médica del IMSS Parte 1*. *Rev Med IMSS*, 43 (4), pp.323–333.

Mills, P. K., Dodge, J. and Yang, R. (2009). Cancer in migrant and seasonal hired farm workers. *Journal of agromedicine*, 14 (2), pp.185–191. [Online]. Available at: doi:10.1080/10599240902824034.

Montaño-Soto, M. et al. (2014). GENOTOXIC BIOMONITORING AND EXPOSURE TO PESTICIDES IN WOMEN LABORERS AT MANEADERO VALLEY IN BAJA CALIFORNIA, MEXICO. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3 (2), pp.89–96.

Moreno Mena, J. a and López Limón, M. G. (2005). Desarrollo agrícola y uso de agroquímicos en el valle de Mexicali. *Estudios Fronterizos*, 6, pp.119–153.

Norton, S. B. et al. (1992). A framework for ecological risk assessment at the EPA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 (12), pp.1663–1672. [Online]. Available at: doi:10.1002/etc.5620111202.

Palacio-Mejía, L. S. et al. (2003). Cervical cancer a disease of poverty mortality diferences beteen urban. *Salud Publica de Mexico*, 45 (3), pp.315–325.

Ramos, I. N. et al. (2008). Environmental risk factors of disease in the cameron park colonia, a hispanic community along the Texas-Mexico border. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 10 (4), pp.345–351. [Online]. Available at: doi:10.1007/s10903-007-9087-1.

Di Renzo, G. C. et al. (2015). International Federation of Gynecology and Obstetrics opinion on reproductive health impacts of exposure to toxic environmental chemicals. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 131 (3), pp.219–225. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.ijgo.2015.09.002.

Rizo-Ríos, P. et al. (2005). Mortalidad por leucemias en menores de 20 años: México 1998-2002. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 62 (1), pp.9–18.

SINAVE/DGE/SALUD/. (2011). Perfil epidemiológico del Cáncer en niños y adolecentes en México. *Sinav/Dge/Salud*, Ciudad de México: SECRETARÍA DE SALUD.

Tubbs, A. and Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.cell.2017.01.002.

Von-Glascoe, C. A. et al. (2018). Health inequalities and processes of social exclusion among migrant female day workers in Northwest Mexico. *European Journal of Public Health*, 28 (1), p.128.

VoPham, T. et al. (2015). Linking pesticides and human health: A geographic information system (GIS) and Landsat remote sensing method to estimate agricultural pesticide exposure. *Applied Geography*. [Online]. Available at: doi:10.1016/j.apgeog.2015.04.009.

Zuñiga-Violante, E. et al. (2015). *Distribución de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el valle agrícola de Maneadero , Baja California , México Distribution of organic and inorganic pollutants in the agricultural valley*. pp.13–24.

Zúñiga-Violante, E. et al. (2012). Daño genético y exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas del Valle de San Quintín, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental*, 12 (2), pp.93–101.

Capítulo 8

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE CONTAMINANTES AMBIENTALES MEDIANTE EL ENSAYO FETAX

Itzayana Pérez-Alvarez[1*]

Hariz Islas-Flores[1]

Leobardo Manuel Gomez-Oliván[1]

Germán Chamorro Cevallos[2]

[1] Laboratoro de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón S/N, Colonia Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca de Lerdo, Estado de México.

[2] Laboratorio de Toxicología Preclínica, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa S/N, Delegación Gustavo A. Madero, México, DF, C.P. 07738, México.

* itzayana_1893@yahoo.com.mx.

Resumen

El ensayo FETAX (ensayo de teratogénesis de embriones de rana-*Xenopus*) es una prueba útil para evaluar la toxicidad de sustancias puras, mezclas complejas y sedimentos, durante etapas tempranas del desarrollo de la rana *Xenopus laevis*, esta prueba se centra en la organogénesis, proceso más sensible durante el desarrollo de todos los organismos debido a la falta de madurez de los sistemas de defensa. Este ensayo cuenta con la opción de agregar un sistema de activación metabólica que simula los procesos de biotransformación que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, ha sido utilizado en diversos estudios toxicológicos para la evaluación de contaminantes presentes en el medio ambiente debido a sus diversas ventajas: exposición durante tiempos cortos (96h), costos relativamente accesibles y reproducibilidad entre otras. El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es destacar la utilidad y flexibilidad que ha demostrado tener este ensayo, además de su aplicación en la evaluación del riesgo ambiental de varias sustancias.

Palabras clave: FETAX, *Xenopus laevis*, teratogénesis.

1. Introducción

Desde hace aproximadamente 50 años existe una demanda creciente de diversos recursos materiales, mismos que han originado la necesidad de fabricar productos nuevos para satisfacer las necesidades de la población, lo que da como resultado problemas de contaminación. Los cuerpos de agua son uno de los recursos más afectados debido a la presencia de varios productos provenientes de procesos industriales, descargas domésticas y hospitalarias, los cuales resultan ser tóxicos para el medio ambiente y pueden generar efectos adversos en varios organismos (Dumont, Bantle, & Linder, 2003).

Para evaluar los efectos de dichos contaminantes en el ambiente, se utilizan varias herramientas para la identificación, cuantificación y evaluación del riesgo (Committee on Methods for Acute Toxicity Tests with Aquatic Organisms, 1975), los cuales han contribuido a que a lo largo de la historia se desarrollen algunos programas de protección ambiental y manejo adecuado de sustancias tóxicas. Entre estas herramientas se encuentra el uso de bioensayos, que generalmente evalúan los efectos adversos generados en una especie, bajo condiciones controladas en laboratorio y cuyo objetivo principal es mostrar los efectos tóxicos de una sustancia o mezcla de sustancias. Un bioensayo utilizado durante las últimas décadas es el ensayo FETAX, el cual tiene el potencial de evaluar distintos tipos de muestras, evidenciado efectos adversos generados en la fase de organogénesis.

1.1 Ensayo FETAX: historia y desarrollo

Durante 1970-1980, se desarrollaron diferentes tecnologías en todo el mundo, razón que propició la búsqueda de recursos energéticos; Estados Unidos fue uno de los países más productivos. El principal objetivo de las industrias era obtener recursos energéticos para cumplir con los requerimientos industriales para manufactura de diversos productos, la provisión de servicios e incluso cubrir necesidades domésticas, dicha situación llevó a la generación de una variedad de contaminantes, llamando la atención de muchas organizaciones de investigación ambiental, entre las que se encontraba la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Bergman, 1985). En ese momento, ya se habían desarrollado algunos ensayos biológicos para la evaluación del riesgo ambiental, entre ellos la prueba de Ames para evaluar la mutagenicidad (Ames & McCann, 1975) y la de carcinogenicidad (Hsie *et al.,* 1978), el cultivo celular y las pruebas de toxicología acuática en organismos como *Daphnia magna* y *Daphnia pulicaria* (Biesinger & Christensen,

1972), también algunos ensayos en peces como *Pimephales promelas*, pero ninguno de ellos fue útil para evaluar la toxicidad durante el desarrollo embrionario.

James Dumont y sus colaboradores se centraron en el desarrollo de una prueba de toxicidad aguda en la cual emplearon embriones de anfibios como organismos bioindicadores; este proyecto fue diseñado y llevado a cabo en el laboratorio nacional de Oak Ridge en Tennessee, y su principal objetivo fue evaluar la toxicidad del carbón y los productos de conversión de aceite y combustibles. Con dicho estudio comenzó el desarrollo del ensayo FETAX, mismo que se publicó en 1983. Después de la estandarización de la prueba, sugirieron utilizarla para la evaluación de diferentes tipos de muestras (suelo, agua, efluentes, sedimentos, etc.) (Bruner *et al.*, 1998) como una herramienta para la evaluación del riesgo ambiental (Bantle & Sabourin, 1991).

Las primeras pruebas se llevaron a cabo siguiendo la metodología propuesta por Dumont en 1980, centrándose en el estudio de los efluentes y productos de desecho provenientes de industrias productoras de combustibles, que en su mayoría eran mezclas de diferentes sustancias orgánicas e inorgánicas en rangos de concentración variable. El primer estudio que se llevó a cabo duró 96 horas, utilizando agua ácida proveniente de los procesos de gasificación de carbono para obtener combustible (Schultz *et al.*, 1982), para lo cual se seleccionaron 50 ovocitos para cada concentración probada, con 4 réplicas. Los resultados obtenidos revelaron efectos dependientes de la concentración en términos de mortalidad, desarrollo anormal, malformaciones e inhibición del crecimiento (Dumont & Schultz, 1980).

Estos estudios se propagaron y replicaron para la evaluación de varias sustancias y productos provenientes de diferentes procesos industriales; los resultados observados en cada prueba fueron totalmente diferentes en términos de los parámetros evaluados y llevaron a la siguiente proposición: "Cada sustancia o mezcla causará efectos característicos y propios en los embriones expuestos, en caso de usar sustancias que tengan un mecanismo de acción similar los resultados podrían ser similares" (Rogers y Kavlock, 1996). Una vez que se realizaron las pruebas en mezclas y extractos, se procedió a realizar ensayos de compuestos puros, que se realizaron utilizando sustancias que previamente se clasificaron como compuestos no teratógenos en mamíferos. Se probaron un total de 41 sustancias, 85% de ellas resultaron teratogénicas para *Xenopus laevis* evidenciando respuestas similares a las ya observadas en mamíferos, lo que sugirió que los mecanismos de acción son similares entre estos y los anfibios, principalmente en el desarrollo embrionario. Después de que se realizaron estas pruebas, se inició el proceso de estandarización (*American Society for Testing Materials*, 2012; Bantle *et al.*, 1994).

Durante dicho proceso se especificaron los requisitos mínimos necesarios para llevar a cabo este ensayo: la duración de la prueba sería de 96 horas clasificándola como una prueba de toxicidad aguda, los embriones deberían seleccionarse en la fase de blástula media a gástrula temprana, y se utilizarían 20-25 embriones para cada concentración probada, por triplicado, manteniendo una temperatura de 22±2 °C. Además se debería usar una solución de cultivo estandarizada; aunado a la determinación de cinco parámetros finales: mortalidad evaluación diaria durante 96 h mediante la concentración letal media CL_{50}, el número de embriones con malformaciones, así como su tipo a través de la concentración efectiva para malformaciones CE_{50}, el índice teratogénico obtenido del cociente de la mortalidad y las malformaciones ($IT = CL_{50} / CE_{50}$) y la concentración mínima para inhibir el crecimiento misma que se obtiene de la medición de las larvas de la cabeza a la cola.

Posteriormente, la *American Society for Testing Materials* (ASTM) publicó el protocolo FETAX, que especifica los detalles para complementar dicho ensayo, así mismo, se publicó un atlas de anormalidades en la década de 1990; y se realizaron estudios interlaboratorio para corroborar la confiabilidad y repetibilidad de la prueba (Bantle *et al.,* 1994). Los 8 laboratorios que participaron inicialmente colaboraron realizando la misma prueba, hicieron mejoras a la metodología, modificaciones que fueron publicadas en 1998. Además se realizó el estudio empleando otras especies de anfibios y se agregó un sistema de activación metabólica (Fort *et al.,* 1998) para simular los procesos de embriogénesis que se llevan a cabo en organismos mamíferos y se estableció el uso de un agente tóxico de referencia para proporcionar una mayor confiabilidad al ensayo. Finalmente, el ensayo FETAX se confirmó como una herramienta confiable, repetible y útil para predecir la toxicidad de una sustancia o mezcla tóxica para el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (Bantle *et al.,* 1999).

Desde entonces se han realizado varias pruebas, para evaluar mezclas complejas (Dumont *et al.,* 1983), sustancias puras y suelos; además se ha utilizado para la evaluación de sistemas de tratamiento de aguas residuales, con el propósito de estimar la calidad de los procesos y el agua que fluye hacia los cuerpos de agua, así como para evaluar los efectos del riesgo ecológico en los organismos acuáticos, principalmente anfibios.

Los estudios ecotoxicológicos emplean en su mayoría organismos juveniles o adultos. Los estudios enfocados en etapas tempranas del desarrollo son escasos; a pesar de que durante la organogénesis los organismos son muy sensibles y el daño puede permanecer durante el resto de su vida o inclusive causar la muerte; por lo anterior ha sido importante la evaluación de diversos contaminantes presentes en el

ambiente utilizando el ensayo FETAX, algunos de los cuales incluyen la utilización de embriones de *Xenopus laevis* expuestos a aguas provenientes de minas (Dawson, McCormick, & Bantle, 1985), industria y plantas de tratamiento de aguas residuales, así como también sedimentos que contienen metales (Herkovits *et al.*, 1997) y plaguicidas (Yu *et al.*, 2013), sustancias altamente persistentes en el ambiente. Desde la década de 1980 hasta el año 2000 se estimó que habían sido evaluados 40 compuestos heterocíclicos, 29 amidas e hidrazidas, 24 ácidos fenólicos y ácidos carboxílicos, 22 alcoholes, 20 sales, 45 productos farmacéuticos, 17 compuestos de síntesis química, 13 pesticidas, 11 aditivos alimentarios y 7 colorantes. A continuación se mencionan algunos estudios en los cuales se ha utilizado este ensayo para la evaluación de distintos tipos de contaminantes.

1.2 Evaluación de plaguicidas

Los plaguicidas pueden definirse como un grupo de compuestos con un rango amplio de actividad, pueden utilizarse como herbicidas, fungicidas, nematicidas, reguladores de crecimiento de plantas entre otros, y pueden clasificarse por su modo de acción o por su naturaleza química (Arias-Estévez *et al.*, 2008; McKnight *et al.*, 2015), a pesar de su amplio uso, también son conocidos sus efectos negativos sobre organismos silvestres y seres humanos, y siguen siendo tema de interés para realizar diversos trabajos de investigación, entre los cuales el ensayo FETAX ha sido una herramienta útil de la evaluación de toxicidad en etapas tempranas del desarrollo. A continuación se muestran algunos estudios en los cuales se demuestran los potenciales efectos tóxicos de este tipo de sustancias.

a. α-cipermetrina

Es un plaguicida piretroide que actúa por contacto e ingestión sobre el sistema nervioso central y periférico de lepidópteros, hemípteros y otros órdenes de importancia agrícola; al realizar la evaluación de este compuesto en *Xenopus laevis* expuesto durante 96 h se obtuvo una CL_{50} de 30.6 µg/L, los embriones sufrieron malformaciones axiales, así como alteraciones en su comportamiento, espasmos y convulsiones. En larvas expuestas a este compuesto durante 96 h se obtuvo una CL_{50} de 6.9 µg/L, indujo cambios en el comportamiento, hipersensibilidad, espasmos, convulsiones y alteraciones en el nado al igual que malformaciones axiales (Yu *et al.*, 2013).

b. Endosulfán

Es un plaguicida organoclorado utilizado como insecticida cuyo uso es restringido ya que es capaz de generar diversas afectaciones en el humano,

principalmente en el sistema endocrino, inmunológico y neurológico además de causar daño severo al hígado (*Agency for Toxic Substances & Disease Registry*, 2011). Generó una CL_{50} de 1266 µg/L, ocasionó retraso en el crecimiento, letargia y malformaciones axiales severas, así como hemorragia en cola y aleta durante la etapa embrionaria. Al exponer a los organismos en su etapa larvaria, se obtuvo una CL_{50} de 121µg/L, de igual manera se presentaron alteraciones en el comportamiento, alteraciones en la prueba de nado e inactividad (Yu *et al.,* 2013).

c. Malatión

Es un plaguicida organofosforado utilizado para el control de insectos, cumple su función actuando por contacto, inhalación e inclusive ha sido utilizado para el control de piojos en humanos. Al igual que otros plaguicidas afecta el sistema nervioso, puede generar problemas respiratorios y gastrointestinales *(Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 2003). Al exponer a embriones de *Xenopus laevis* se obtuvo una CL_{50} de 5396 µg/L, de igual manera se observó un incremento en la mortalidad durante las últimas horas de exposición y generó malformaciones a las concentraciones más elevadas probadas en un periodo de 72h. En larvas expuestas a malatión se obtuvo una CL_{50} de 6756 µg/L, se identificaron malformaciones axiales y anormalidades en el nado (Yu *et al.,* 2013).

Al comparar los tres plaguicidas (α-cipermetrina, endosulfán, malatión) las malformaciones más frecuentes observadas tanto en embriones como en larvas fueron en intestino, malformaciones axiales y edema; de igual manera fueron capaces de inducir una significativa inhibición del crecimiento; además las alteraciones en el comportamiento fueron comunes ante la exposición a plaguicidas ya que actúan como disruptores de los canales de sodio dependientes de voltaje que se encuentran en las membranas de las células nerviosas, de igual manera la sobrestimulación de músculo debida a la inhibición de la acetil colinesterasa causa doblamiento de la cola de embriones y larvas (Yu *et al.*, 2013).

d. Clorpirifós

Es un plaguicida organofosforado utilizado como insecticida y para controlar plagas de nematodos, con anterioridad fue utilizado en las viviendas para el control de plagas, sin embargo sus efectos tóxicos han generado una reducción en su uso pues genera neurotoxicidad (Whitney *et al.,* 1995), desordenes inmunológicos y malformaciones. Fue capaz de causar efectos en el comportamiento asociados a un daño neurológico. Las principales alteraciones generadas en *Xenopus laevis* por este plaguicida tras 120 h de exposición corresponden a defectos neuromusculares espasmos, temblores parálisis y fallas al nadar, efectos que siguieron un comportamiento concentración-dependiente. Además dieron lugar a

malformaciones en intestino y alteraciones axiales, daños en somitas y daños a nivel de tejido en miocitos y miotomas, estos efectos pueden terminar en distrofia muscular y comprometer el desarrollo de los organismos (Bonfanti *et al.,* 2004).

e. Ácido giberelico

Es un fitorregulador de crecimiento de acción hormonal que estimula y regula el desarrollo de las plantas (*University of Hertfordshire*, 2018), al exponer a *Xenopus laevis* a este compuesto durante 96 h se obtuvo una CL_{50} de 1117.5 mg/L y un IT de 1.69, se mostró un comportamiento concentración-dependiente en cuanto a la incidencia de malformaciones en los embriones tales como edema, doblamiento de cola, microftalmia y microcefalia (Pekmezekmek *et al.,* 2013).

f. Triadimefon y Triadimenol

Son derivados de triazoles utilizados como agentes antifúngicos, interfieren con la biosíntesis de esteroides como lanosterol y ergosterol que constituyen en mayor medida la pared fúngica y por esta razón son utilizados ampliamente en la agricultura *(United States Environmental Protection Agency*, 2016). Al evaluar estos compuestos durante un periodo de 96 h utilizando el ensayo FETAX y como bioindicador a *Xenopus laevis*, el triadimefon resultó con un IT mayor a 3 que lo categoriza como un agente teratógeno; el cual ocasionalmente generó acortamiento de la parte anterior de la cabeza y una ligera protrusión de la mandíbula no móvil. Los elementos mandibulares como articulaciones no fueron evidentes, las vesículas cerebrales estaban presentes pero anormalmente dobladas en dirección ventral como consecuencia de anormalidades craneofaciales severas. En el caso del triadimenol las malformaciones a nivel mandibular fueron menos severas; los defectos en la mandíbula y parte dorsal-anterior de la cabeza al igual que edema y reducción en tamaño se observaron ocasionalmente para ambos compuestos (Groppelli *et al.,* 2005).

g. Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) y 2,4-D (ácidodiclorofenoxiacético),

Son herbicidas que han sido detectados en aguas profundas y superficiales, debido a su uso frecuente que permite la entrada de manera directa o indirecta al medio ambiente (Pimentel & Levitan, 1986). Al exponer a embriones de *Xenopus laevis* durante 96 h a estos herbicidas se obtuvieron los siguientes resultados: para Atrazina CL_{50} de 100 mg/L, CE_{50} 33 mg/L, IT 3, mientras que para 2,4-D se obtuvo una CL_{50} de 254 mg/L, CE_{50} de 245 mg/L y un IT de 1.04; lo que indica que ambos herbicidas poseen bajo riesgo teratógeno, debido a que los efectos embriotóxicos y teratogénicos ocurrieron a concentraciones elevadas (Morgan, 1996).

h. Glifosfato

Es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial en campos de cultivo y en el sector doméstico (Benbrook, 2016). Es un compuesto lipofílico y su tiempo de vida media es de 2 a 14 días, además ha sido detectado en concentraciones de 0.7 mg/L en campos de cultivo(Peruzzo, Porta, & Ronco, 2008). Debido la exposición a este compuesto durante 96 h se produjeron anormalidades como edema, alteraciones craneofaciales, microftalmia, estrechamiento de ojos y malformaciones severas a concentraciones elevadas. Se obtuvo una CL_{50} de 24,78 mg/L, CE_{50} de 7.8 mg/L, además se obtuvo una concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMIC) de 5 mg/L además de un IT de 3.4, mismo que indica que la sustancia es altamente teratogénica, evidenciando el potencial tóxico de este compuesto en *Xenopus laevis* (Bonfanti *et al.,* 2018).

1.2 Metales pesados

a. Cromo

Es un metal ampliamente distribuido a nivel mundial y en ambientes acuáticos puede ser detectado en concentraciones traza, sin embargo, es capaz de provocar efectos tóxicos, específicamente el cromo (VI) que es un mutágeno cuya actividad toxica ha sido demostrada en bioensayos realizados empleando bacterias y mamíferos. Por otra parte es capaz de causar malformaciones esqueléticas y alta mortalidad en embriones de ratón (Trivedi *et al.*, 1989).

Al exponer a embriones de rana *Xenopus laevis* a cromo (VI) durante 96 h se obtuvo una CL_{50} de 890 µM, una CE_{50} de 260 µM y un IT de 3.42, ubicando al cromo (VI) como un metal que posee un alto riesgo teratogénico. Generó diversas malformaciones en intestino, cola y aleta además de edema múltiple acompañado de un severo retraso en el crecimiento.

Se evidenció un proceso de bioacumulación, mismo que variaba de acuerdo con la fase de desarrollo del organismo. Durante las primeras fases el cromo se concentra principalmente en la capa protectora del embrión, posteriormente su concentración permanece en la larva, los órganos en los que se observó mayor concentración de este metal fueron abdomen, cabeza y cola (Bosisio *et al.,* 2009).

b. Níquel

Es un metal ampliamente utilizado en la industria para la producción de baterías, recubrimientos anticorrosivos, obtenido en procesos de minería, utilizado para galvanoplastia entre otras actividades (Raval, Shah, & Shah, 2016), razón por la

cual es eliminado de manera constante al ambiente en donde puede llegar a generar daños. Durante la exposición de *Xenopus laevis* a Ni^{2+} durante 101 h generó daños principalmente en ojo, a concentraciones de 4.5 µmol/L, los daños manifestados fueron microftalmia, hipopigmentación focal, y quistes en el plexo coroideo y la retina, habiendo daño también en el iris, engrosamiento del nervio óptico, desplazamiento lateral y/o dorsal de los ojos y daño craneofacial. La severidad de las malformaciones así como su incidencia siguió una relación concentración-dependiente (Hauptman *et al.,* 1993).

c. Cadmio

El cadmio es un metal ampliamente utilizado en procesos industriales, por lo que se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente. Es un metal no esencial y los principales órganos afectados por la exposición son el hígado y el riñón; puede entrar en contacto con diversos organismos a través del consumo de agua o alimentos contaminados (Okorie *et al.,* 2014).

Ante la exposición de *Xenopus laevis* a este metal durante 96 h se obtuvieron una CL_{50} de 32 µmol/L, CE_{50} de 3.7 µmol/L, CMIC de 18 µmol/L y un IT de 8.6, lo que lo ubica como un agente teratógeno. Las malformaciones encontradas siguieron un comportamiento concentración-dependiente y fueron principalmente en intestino, notocorda y aleta, displasia facial, anormalidades en ojo y cardiomegalia (Sunderman, Plowman, & Hopfer, 1991). Adicionalmente se ha detectado que este metal es capaz de generar problemas en el proceso de eclosión de embriones a concentraciones bajas (0.6 ppm) además de generar un disminución de crecimiento larvario (Haywood *et al.,* 2016).

d. Cobalto

Es un metal utilizado principalmente en la manufactura de aleaciones, por lo que se encuentra en diversos ambientes. Es capaz de producir daños a nivel reproductivo, asma alveolitis entre otras patologías (Domingo, 1989). Por la exposición de *Xenopus laevis* a $CoCl_2$ durante 96 h se logró obtener la CL_{50} de 10.4 mM/L, la CE_{50} de 25 µM/L, y un IT de 416. Se observó un patrón concentración-dependiente en la incidencia y severidad de malformaciones, el intestino fue el órgano mayormente afectado. También se hallaron malformaciones oculares como microftalmia y disminución en la distancia interocular, axiales en notocorda y cola, displacía craneofacial y malformaciones cardiacas (Plowman *et al.,* 1991).

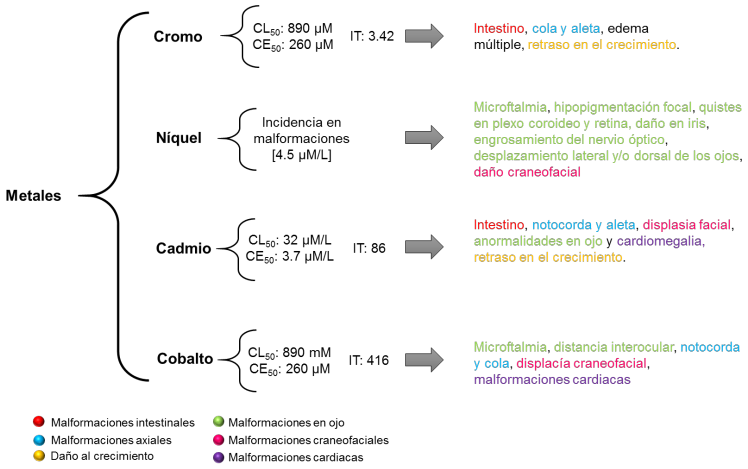


Fig. 1 Efectos tóxicos generados por metales en embriones de *Xenopus laevis*. Fuente: elaboración propia.

En la figura 1 se muestran en resumen los efectos tóxicos generados por metales en *Xenopus laevis*, es evidente que todos poseen elevado potencial teratogénico. Las afectaciones que comparten estos metales son: intestinales, oculares, axiales, craneofaciales, cardiacas y disminución del crecimiento. El hecho de que exhiban los mismos efectos tóxicos puede deberse a que su toxicidad se da por mecanismos similares; son capaces de bioacumularse, inhibir procesos fisiológicos, reproductivos y causar daño histológico.

1.3 Aditivos alimenticios

a. Ácido cítrico (E330)

Está presente en altas concentraciones en frutas como limón y limas, es un conservador natural y se utiliza como saborizante, tiene diversos usos en la industria alimenticia, cosmética e incluso textil (Nica & Woinaroschy, 2010). Se consideraba un compuesto no tóxico, sin embargo en diversos estudios se ha demostrado que a largo plazo puede generar efectos adversos en diversos organismos principalmente mamíferos. En *Xenopus laevis* causó diversas malformaciones en intestino, malformaciones oculares como microftalmia, en riñón, edema y anormalidades en las somitas, a través del ensayo FETAX se obtuvo una CL_{50} de 0.0124 g/L, sin embargo, las malformaciones fueron poco frecuentes razón por la cual no se obtuvo un valor de CE_{50} e IT, por otro lado, la CMIC fue de 0.010 g/L (Boğa-Pekmezekmek *et al.*, 2013).

1.4 Fármacos

a. Paracetamol

Es un antiinflamatorio no esteroideo de amplio uso y consumo a nivel mundial. Tiene intermediarios altamente electrofílicos que son capaces de unirse covalentemente a macromoléculas nucleofílicas de importancia biológica y generar daño (Nunes *et al.,* 2014). Al realizar la evaluación de daño se obtuvieron los siguientes parámetros, una CL_{50} de 191.1 mg/L, CE_{50} de 143.3 mg/L y un IT 1.3. Con base en los resultados obtenidos el paracetamol se puede clasificar como un agente con bajo potencial teratógeno, sin embargo, es capaz de generar malformaciones en ausencia de mortalidad. Las malformaciones observadas fueron en intestino, craneofaciales, cardiacas, edema pericárdico y oftálmico (Fort *et al.,* 1992). En otro estudio se encontró que no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo, sin embargo, todos los embriones mostraron malformaciones como doblamiento de la cola edemas y anormalidades en el enrollamiento del intestino, en cuanto al crecimiento no se encontraron diferencias con respecto al grupo testigo (Sean *et al.,* 2006).

b. 2 fenoxietanol (Etilen glicol monofenil éter)

Es un agente ampliamente recomendado para generar una inducción a la anestesia así como inmovilización por periodos cortos de tiempo en peces y anfibios (Ross & Ross, 2008). Al realizar la evaluación obtuvieron una CL_{50} de 588 mg/L, CE_{50} de 384 mg/L, CMIC de 300 mg/L; las malformaciones más frecuentes fueron edema severo y malformaciones axiales, el IT fue 1.69, clasificando así al fenoxietanol como un agente con potencial teratógeno para *Xenopus laevis* (Vrskova & Modra, 2012).

c. Eugenol

Es en un 80-90% la sustancia activa del aceite de clavo, mismo que es utilizado como anestésico debido a su baja incidencia en cuanto a reacciones adversas en peces y anfibios (Ke *et al.,* 2018). Al exponer embriones de *Xenopus laevis* a este compuesto se obtuvo una CL_{50} de 21.60 mg/L, acompañada de una CE_{50} de 35.71 mg/L. Las alteraciones más frecuentes fueron malformaciones axiales como doblamiento, malformación de intestino, microftalmia y edema. El valor obtenido para la CMIC fue de 20 mg/L finalmente el IT fue 0.61; los valores obtenidos ante la exposición a eugenol evidencian que no representa riesgo teratogénico para *Xenopus laevis* (Vrskova & Modra, 2012).

d. Ritodrina

Es un fármaco utilizado como tocolítico para la prevención de parto pretermino. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la relajación del musculo liso uterino (Aronson, 2016). Al realizar la evaluación de riesgo teratogénico se obtuvo una CL_{50} de 28.571 mg/L, debido a la baja frecuencia de malformaciones no se obtuvo la CE_{50}; sin embargo, las malformaciones que se presentaron incluyeron problemas en intestino, microftalmia, malformaciones en las somitas y edema. Se obtuvo una CMIC de 12 mg/L; sin IT por lo que puede asumirse que la ritodrina es un agente con bajo potencial teratogénico para *Xenopus laevis* (Boğa - Pekmezekmek *et al.,* 2015).

e. Nifedipino

Es un fármaco bloqueador de los canales de calcio. Inhibe el influjo de calcio, regularmente utilizado para tratar hipertensión aguda. Suele relajar todos los músculos lisos incluyendo aquellos en el útero, inhibiendo por tanto la labor de parto y las contracciones uterinas (Reid y Struthers, 1983). Tras la exposición de *Xenopus laevis* a este fármaco se obtuvieron los siguientes resultados: una CL_{50} de 0.606 µg/L, CE_{50} 0.006 µg/L, siendo las malformaciones más frecuentes en cola, quistes axiales, esqueléticas y dérmicas además de la notable inhibición del crecimiento con una CMIC de 0.0001 µg/L, e IT de 101. Debido al valor tan elevado de este parámetro y correlacionándolo con los protocolos para realizar el ensayo FETAX el nifedipino se ubica como un agente con alto potencial teratogénico para esta especie (Boğa-Pekmezekmek *et al.,* 2015).

f. Celecoxib

Es un antiinflamatorio no esteroidal que inhibe selectivamente la COX-2 y se utiliza como antiinflamatorio y analgésico (Puljak *et al.,* 2017). Al exponer embriones de rana *Xenopus laevis* se obtuvo una CL_{50} de 8.99 mg/L, una CE_{50} de 5.8 mg/L y un IT de 1.54, que ubica a este fármaco como teratógeno para esta especie; generando diversas malformaciones siendo las más frecuentes en intestino, edema, hemorragia y anormalidades en el corazón y vasos sanguíneos. El rango de mortalidad y malformaciones se incrementó de acuerdo con la concentración. Los sistemas principalmente afectados fueron el cardiovascular debido a la inducción de efectos en la pared vascular durante el desarrollo, que culminó en hemorragia y edema, además de afectaciones importantes en el sistema digestivo (Yoon *et al.,* 2018).

g. Dihidroartemisina (DHA)

Es un sesquiterpeno de tipo lactona obtenido de *Artemisa annua*. Sus principales derivados semisinteticos son: artesunato, arteméter y dihidroartemisina, que son utilizados como agentes antimalaria (Price, 2000). Este fármaco indujo diversos efectos tóxicos en larvas de *Xenopus laevis* expuestas durante 24 y 78 h, generando fallas cardiacas y una depleción de glóbulos rojos primitivos, sin embargo los glóbulos rojos definitivos no se vieron severamente afectados y posteriormente se recuperaron. No se observaron áreas necróticas, pero si presentaron defectos cardiacos. La artemisina puede inducir embriotoxicidad interviniendo en los procesos metabólicos de los glóbulos rojos primitivos activos, al finalizar el estudio se observó un ritmo cardiaco normal al igual que un desarrollo y crecimiento normal (Longo *et al.,* 2008).

h. Citostáticos

5-flourouracilo, capecitabina, cisplatino, etoposido, e imatinib.
Al exponer a *Xenopus laevis* a estos fármacos ninguno indujo mortalidad estadísticamente significativa con respecto al grupo testigo en concentraciones de 0.01 mg/L a 50 mg/L (dependiendo del fármaco), el crecimiento embrionario tampoco se vio afectado. El único fármaco con el cual se obtuvo la CE_{50} fue el 5 fluorouracilo con un valor de 15.18 mg/L; mientras que para el resto de los fármacos obtuvo la concentración más baja a la cual se observan efectos adversos (LOAEC), para capecitabina 20 mg/L, 5-Fluorouracilo 50 mg/L y finalmente etoposido 30 mg/L. Sin embargo indujeron frecuencias elevadas en cuanto a malformaciones, mismas que incrementaban en incidencia conforme se aumentaba la concentración de fármaco, lo que indica que tienen efectos teratogénicos. Las más frecuentes fueron: edema abdominal, doblamiento axial, daño en cabeza ojos y corazón.

Los anti metabolitos de 5-fluorouracilo y su profármaco capecitabina inhiben la síntesis de timidina vía timidilato sintasa, lo que puede determinar la activación de algunas vías moleculares que producen el edema abdominal. Se ha comunicado que el 5-fluorouracilo y su mecanismo de toxicidad crónica/subletal está relacionado con alteraciones en procesos de metabolismo primario, división celular y señalización celular, así como funciones del sistema inmune y desarrollo, genera cambios histopatológicos en el hígado y riñón en pez cebra (Kovacs *et al.,* 2016). *Xenopus laevis* es sensible a fármacos antineoplásicos, ya que estos son capaces de inducir malformaciones complejas (Isidori *et al.,* 2016).

i. Inhibidores selectivos de la receptación de serotonina (ISRS).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la receptación de 5-HT de manera potente y selectiva, bloqueando las bombas de transporte de serotonina en el espacio sináptico, por lo que se incrementan los niveles de serotonina. Su principal actividad es la antidepresiva (Schloss & Williams, 1998). Se muestran los resultados obtenidos de la exposición de *Xenopus laevis* a 3 ISRS distintos ver Tabla 1.

Tabla 1. Datos de toxicidad en embriones de *Xenopus laevis* expuestas a ISRS durante 96 h.

ISRS	CL_{50} (mg/L)	CE_{50} (mg/L)	CMIC (mg/L)	IT	Malformaciones
Fluoxetina	7.5	4.9	4	1.5	Cola, faciales, lóbulo óptico y edema en cabeza
Paroxetina	5.12	4.1	3.0	1.2	Doblamiento en cola y malformaciones en intestino
Sertralina	3.9	3.3	2	1.2	Doblamiento en cola y edema torácico

Relacionando los resultados mostrados con los criterios establecidos en el protocolo para el ensayo FETAX, los ISRS poseen bajo riesgo teratogénico, sin embargo, poseen elevada letalidad (Richards & Cole, 2006b).

j. Atorvastatina

Es un regulador lipídico y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima HMG CoA reductasa, misma que impide la síntesis del colesterol en el hígado (Von Keutz & Schluter, 1998). Posterior a la exposición de *Xenopus laevis* a atorvastatina durante 96 h se obtuvo una CL_{50} de 38.6 mg/L, CE_{50} de 23.1 mg/L, CMIC de 30 mg/L y un IT de 1.6. La malformación más frecuente fue enrollamiento anormal de intestino.

k. Ibuprofeno

Es uno de los antiinflamatorios no esteroideos más utilizados a nivel mundial, su mecanismo de acción se basa en la inhibición del sistema enzimático ciclooxigenasa, mismo que se encarga de la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas (Roberts, 2001). Las prostaglandinas se encargan de regular diversas funciones fisiológicas que en los anfibios están involucradas en la liberación de neurotransmisores y el transporte de agua e iones a través de la membrana celular. Los resultados obtenidos ante la exposición de *Xenopus laevis* durante 96 h a ibuprofeno fueron los siguientes: CL_{50} 56.7 mg/L, CE_{50} 39.9 mg/L, CMIC 30 mg/L, IT 1.4. La principal malformación observada fue edema torácico, de acuerdo con los criterios establecidos en el protocolo FETAX este fármaco no es teratogénico para *Xenopus laevis* (Richards & Cole, 2006).

l. Ciprofloxacino y levofloxacino

Son compuestos de tipo antibiótico que pertenecen al grupo de las fluoroquinolonas. Su mecanismos de acción se basa en la inhibición de la subunidad A de la ADN girasa en las bacterias, una topoisomerasa que se encarga de cortar y sellar las cadenas de ADN durante la replicación; sin esta enzima el ADN no podría ser replicado, además las quinolonas inhiben la relajación de la estructura del ADN en su forma empacada, lo que incrementa la ruptura de la cadena. No generaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo en cuanto a mortalidad o malformaciones en un rango de concentraciones de 1.0 mg/L hasta 100 mg/L durante un periodo de exposición de 96 h (Richards & Cole, 2006).

m. Cafeína

Es altamente consumida a nivel mundial, actúa en el organismo como un antagonista de los receptores de adenosina, por tanto contrarresta los efectos sedantes de la adenosina en el sistema nervioso central, además de incrementar los niveles de norepinefrina y la actividad neuronal en ciertas regiones del cerebro. Se encuentra en algunas plantas, ha sido adicionada a los alimentos y bebidas desde hace algunos años, actúa como un estimulante del sistema nervioso central (EFSA, 2005). Los embriones expuestos a este fármaco presentaron hipopigmentación pero no se observaron otras anormalidades (Richards & Cole, 2006). Sin embargo en otro estudio después de 96 h de exposición se encontró una CL_{50} de 0.48 mg/mL, CE_{50} de 0.12 mg/mL y CMIC de 0.05 mg/mL. Las malformaciones más frecuentes se presentaron en intestino, defectos craneofaciales, microftalmia, microencefalia, edema visceral y cráneo facial, boca, hemorragia y acortamiento musculo-esquelético. Como se ha mencionado en algunos estudios al agregar un sistema de activación metabólico a este ensayo incrementó el potencial embriotóxico de la

cafeína, sin embargo al someter a los metabolitos de la cafeína al ensayo FETAX ninguno de ellos mostró actividad teratogénica mayor que el compuesto original (Fort *et al.,* 1998).

1.5. Misceláneos

a. Nicotina y cotinina

La nicotina es un compuesto que se encuentra en el tabaco, es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y unirse a los receptores colinérgicos (Drug and Therapeutics Bulletin, 2014). Su principal producto de biotransformación es la cotinina, misma que es útil para la determinación de exposición al tabaco. Los resultados obtenidos ante la exposición de *Xenopus laevis* durante 96 h a estos dos compuestos dieron como resultado una CL_{50} de 141 mg/L, CE_{50} de 0.45 mg/L y CMIC de 0.625 mg/L, acompañada de diversas malformaciones como doblamiento de cuerpo, malformaciones en mandíbula e hiperplasia branquial, microcefalia, intestino, inflamación cardiaca acompañada de edema y mocroftalmia; mientras que para la cotinina se obtuvo una CL_{50} de 4.290 mg/L, CE_{50} de 740 mg/L y CMIC 250 mg/L. Las malformaciones más frecuentes fueron acortamiento esquelético lateral y ventral y anormalidades en intestino, microcefalia malformaciones en mandíbula y boca, ojo y edema, además de malformaciones cardiacas (Dawson *et al.,* 1988).

b. 4-bromobenceno.

Es un compuesto utilizado como agente hepatotóxico, se sabe que su potencial tóxico se debe a la unión covalente que forma con compuestos hepáticos de importancia, generando lipoperoxidación, disfunción mitocondrial y fallas en la homeostasis de calcio (Yoshioka *et al.,* 2017). Al probar su potencial teratógeno en embriones de rana *Xenopus laevis* y durante 96 h de exposición los resultados fueron los siguientes: CL_{50} 2,800 mg/L, CE_{50} 280 mg/L, CMIC 500 mg/L, y un IT de 10, acompañado de malformaciones en intestino, defectos craneofaciales y edema oftálmico, principalmente. La bioactivación de este compuesto aumenta significativamente su potencial tóxico. El 4-bromobenceno tiene un potencial teratógeno significativo, sin embargo al ser activado metabólicamente se incrementa notablemente su potencial embriotóxico, es capaz de generar efectos nefrotóxicos y hepatotóxicos. Después de su biotransformacion a bromofenol y bromohidroxiquinona, el 4 bromobenceno es capaz de unirse covalentemente al Ca-ATPasa presente en el retículo endoplásmico y a la membrana celular, lo que da lugar a una disminución en la expulsión de calcio desde la célula lo que lleva a fallas en la homeostasis celular (Fort *et al.,*1996).

c. Compuestos de tipo retinoico.

Las cianobacterias son capaces de producir diversos compuestos de tipo biológico, mismos que han sido poco caracterizados. Sin embargo, algunos pueden generar efectos tóxicos, entre ellos los retinoides, entre los que se incluyen el retinol, retinal y ácido retinoico, mismos que han demostrado ser capaces de generar efectos adversos en humanos en concentraciones elevadas, sin embargo una deficiencia de los mismos puede generar efectos teratogénicos (Collins & Mao, 1999).

Al exponer embriones de rana *Xenopus laevis* a exudados de *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Microcystis aeruginosa*, se obtuvieron los siguientes resultados: LOEC para malformaciones de 2.5 µg/L en el caso de equivalentes de retinol y 5 µg/L para ácidos retinoicos. Los exudados de las dos cianobacterias produjeron diversas malformaciones en cola, intestino y ojo además de interferencia en el crecimiento de los embriones. Para todos los ácidos retinoicos se obtuvo una CL_{50} de 20 µg/L y CE_{50} de 11.9 µg/L. Este estudio confirmó la capacidad de ciertas cianobacterias para producir y liberar compuestos de tipo retinoico al ambiente, mismos que pueden llegar a generar efectos adversos en el desarrollo de anfibios (Smutná *et al.*, 2017).

d. Nanopartículas de plata recubiertas con polietilenimina

Las nanopartículas de plata han sido hasta ahora de las más utilizadas como agentes antimicrobianos, se comercializan dos tipos distintos de recubrimientos, los que están cargados negativamente como el citrato y los que están cargados positivamente como la polietilenimina.

Al realizar el ensayo FETAX utilizando nanopartículas de plata con un recubrimiento de polietilenimina exponiendo a *Xeopus laevis* durante 96 h se encontró una CL_{50} de 0.385 mg/L, CE_{50} 0.240 mg/L con lo que se obtuvo un IT de 1.60, mismo que ubica a las nanopartículas de plata con recubrimiento de polietileimina como agente con potencial teratógeno, las principales malformaciones observadas fueron craneofaciales, cardiacas, abdominales e intestinales, debido a la falta de plegamiento en el intestino, fue el órgano de mayor interés en este estudio. Los iones de plata pudieron retrasar el periodo de morfogénesis del epitelio intestinal afectando el tiempo de elongación de las células endodérmicas y generando un mal doblamiento de este órgano. Con los resultado obtenidos se evidenció que este tipo de nanopartículas son capaces de cruzar la barrera del epitelio intestinal y generar efectos tóxicos en *Xenopus laevis*. Es de importancia destacar que dependiendo el tipo de recubrimiento que posean las

nanopartículas pueden tener un mayor o menor potencial teratógeno (Colombo *et al.*, 2017).

e. Efectos agudos de nanomateriales Fe_2O_3, TiO_2, ZnO y CuO.

Actualmente, los nanomateriales se utilizan para generar innovaciones científicas en ingeniería, química, e incluso medicina. Los nanomateriales que contienen óxidos de metales en su estructura pueden producir diversos efectos tóxicos en organismos acuáticos, como afectaciones en funciones mitocondriales, anormalidades y mortalidad.

Se examinaron los efectos de nanomateriales que contenian Fe_2O_3, TiO_2, ZnO y CuO durante un periodo de 96 h; no se observaron cambios en cuanto a mortalidad en los embriones expuestos, sin embargo, se observaron diversas malformaciones gastrointestinales y espinales principalmente. A continuación se menciona la CE_{50} para cada nanomaterial probado: ZnO 10.3 mg/L, CuO, Fe_2O_3 y TiO_2 >1000mg/L, mientras que la concentración mínima inhibitoria del crecimiento se obtuvieron los siguientes resultados: ZnO y CuO 10mg/L, Fe_2O_3 y TiO_2 1000mg/L. Con estos resultados puede concluirse que algunos nanomateriales son capaces de generar efectos negativos en fases tempranas del desarrollo de anfibios como *Xenopus laevis*, sin embargo, los estudios realizados en cuanto a este tipo de materiales son escasos (Nations *et al.*, 2011).

f. Colorantes textiles

Rojo astrazon (FBL), azul astrazon (FGRl), rojo remazol (RR), azul turquesa ramazol (G-A), rojo cibacron (FN-R).

Aproximadamente de un 10 a un 15 % de los colorantes son eliminados en los efluentes de industrias textiles (Sumathi *et al.*, 2001). Tras la exposición de *Xenopus laevis* a distintos colorantes durante 96 h (FBL, FGRI, RR, G-A, FN-R) el valor de CL_{50} más bajo fue de 4.73 mg/L por la exposición a rojo de astrazon, la toxicidad del resto de los colorantes textiles en el siguiente orden FGRL>G-A>FBL>FN-R>FN-3G>RR, siendo FGRL el que posee mayor toxicidad y RR el que posee la menor. El colorante azul astrazon fue el compuesto más teratogénico de los 6 probados. Las malformaciones identificadas fueron microftalmia, edema en cabeza y en saco vitelino, malformaciones en ojo, ciclopia, microcefalia, despigmentación y doblamiento de la cola. Más de una de éstas se presentó en los embriones que fueron expuestos a los colorantes en concentraciones elevadas; el IT más alto obtenido correspondió a azul de astrazon y el más bajo a rojo remazol; los radios de malformaciones fueron concentración-dependinetes con un 100% de malformaciones en las concentraciones más elevadas de cada colorante. El edema

fue la malformación más frecuente y específicamente el de cabeza fue el más común. El grado de inhibición del crecimiento también mostro una tendencia concentración-dependiente en los 6 colorantes probados.

Todos los colorantes utilizados en este estudio mostraron efectos tóxicos y/o teratogénicos; además los valores de IT indican que deben ser considerados como sustancias tóxicas para el desarrollo de anfibios. Los colorantes a bajas concentraciones pueden generar fallas en la comunicación celular y por tanto resultar en la aparición de malformaciones en ojos y edema en cabeza, así como doblamiento de cola, mientras que a concentraciones más elevadas inducen microcefalia, microftalmia, despigmentación y daño ocular (Birhanli & Ozmen, 2005).

g. Lixiviados de colillas de cigarrillo

Las colillas de cigarrillo poseen impacto tóxico en el ambiente debido a su persistencia y su composición química. La mayoría de sus compuestos se lixivian hacia ambientes acuáticos, contaminando sistemas y poniendo en riesgo a los organismos acuáticos (Slaughter *et al.,* 2011). Al exponer a embriones de *Xenopus laevis* a lixiviados de colillas de cigarrillo común (RCB), cigarrillo mentolado (MCB) y cigarrillo electrónico (ECB) durante 96 h, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos de toxicidad en embriones de *Xenopus laevis* expuestas a lixiviados de colilla de cigarrillo (RCB, MCB, ECB) durante 96 h.

Lixiviados de colillas de cigarrillo	**CL_{50} (Colillas/L)**	**CE_{50} (Colillas/L)**	**IT**	**CMIC (Colillas/L)**	**Malformaciones**
Cigarrillo común (RCB)	0.68	0.34	1.95	0.25	Notocorda, enrollamiento anormal de intestino, malformaciones faciales, restricción del crecimiento
Cigarrillo mentolado (MCB)	1.140	0.30	3.77	0.5	Edema, intestino, corazón, craneofaciales
Cigarrillo electrónico (ECB)	26.8	15.58	1.72	10	Cola, edema leve, mal doblamiento en

Los lixiviados de cigarrillo común y de cigarrillo mentolado demostraron poseer riesgo teratogénico para *Xenopus laevis* y organismos acuáticos. Los lixiviados de cigarrillo mentolado mostraron poseer mayor toxicidad posiblemente debido a la interacción de sus componentes con el mentol; por otra parte, los lixiviados de cigarrillo electrónico son 10 veces menos tóxicos que los cigarrillos tradicionales, sin embargo, aún poseen un ligero riesgo teratogénico (Parker & Rayburn, 2017).

2. **Conclusiones**

Desde su implementación, el ensayo FETAX ha demostrado ser una herramienta útil para la evaluación del riesgo tóxico de diversas sustancias durante fases vulnerables del desarrollo de anfibios, es posible obtener información en cuanto a la mortalidad, malformaciones e inhibición del crecimiento producidos por el xenobiótico de interés, dichos parámetros son importantes en estudios toxicológicos. Por otra parte, este ensayo posee diversas ventajas:

- Debido a las características anatómicas del organismo modelo, es posible observar las fases del desarrollo embrionario fácilmente, con un microscopio estereoscópico.
- Consta de 96 horas de duración.
- Es relativamente sencillo de llevar a cabo, siempre y cuando se tomen en cuenta los puntos críticos establecidos en el protocolo (ASTM E 1439-12)
- Es económico comparado con otros ensayos.
- Además de la evaluación de compuestos puros, permite evaluar mezclas complejas poco caracterizadas y sedimentos.

Este ensayo es una herramienta útil para evidenciar efectos tóxicos generados por xenobióticos pertenecientes a diversas clases en anfibios, así como para tomar medidas en cuanto al desarrollo de metodologías para la detección de contaminantes en cuerpos de agua y métodos de remoción de los mismos.

3. Referencias

Agency for Toxic Substances & Disease Registry. (2011). Toxic Substances Portal: Endosulfan. Retrieved October 17, 2018, from https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=113

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2003). Toxic substances portal: Malathion. Retrieved October 17, 2018, from https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=522&tid=92

American Society for Testing Materials. (2012). Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay - Xenopus (FETAX), E1439-12. *ASTM Standards on Biological Effects and Environmental Fate*, *11*(05). https://doi.org/10.1520/E1439-12

Ames B. N., McCann J., and Y. E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, *35*, 247-364.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *123*(4), 247–260. https://doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011

Aronson, J. K. (2016). Ritodrine. In J. K. B. T.-M. S. E. of D. (Sixteenth E. Aronson (Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs* (pp. 211–212). Oxford: Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01412-8

Bantle, J. A., Burton, D. T., Dawson, D. A., Dumont, J. N., Finch, R. A., Fort, D. J., … Maurice, M. A. (1994). Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, *14*(3), 213–223.

Bantle, J. A., Finch, R. A., Fort, D. J., Stover, E. L., Hull, M., Kumsher-King, M., & Gaudet-Hull, A. M. (1999). Phase III interlaboratory study of FETAX. Part 3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, *19*(6), 447–472.

Bantle, J., & Sabourin, T. (1991). Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *American Society for Testing and*

Materials E1439, *98*(Reapproved 2004), 1–20. https://doi.org/10.1520/E1439-98R04.10.1520/E1439-12.2

Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, *28*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0

Bergman, H. L. (1985). *Effects of Aqueous Effluents from In Situ Fossil Fuel Processing Technologies on Aquatic Systems* (Vol. DOE/LC/104). Laramie, WY.

Biesinger, K. E., & Christensen, G. M. (1972). Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of Daphnia magna. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *29*(12), 1691–1700. https://doi.org/10.1139/f72-269

Birhanli, A., & Ozmen, M. (2005). Evaluation of the toxicity and teratogenity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-xenopus. *Drug and Chemical Toxicology*, *28*(1), 51–65. https://doi.org/10.1081/DCT-200039689

Boğa Pekmezekmek, A., Binokay, U. S., Akillioğlu, K., & Sertdemir, Y. (2013). Evaluation of E330-induced developmental toxicity using FETAX. *Turkish Journal of Biology*, *37*(3), 265–272. https://doi.org/10.3906/biy-1204-24

Boğa Pekmezekmek, A., Binokay, U. S., Seçilmiş, M. A., Kumcu, E., Şimşek, E., Akillioğlu, K., … Özaykan, B. (2015). Evaluating the Teratogenicity of Ritodrine and Nifedipine using a Frog Embryo Teratogenesis assay (FETAX). *Drug and Chemical Toxicology*, *38*(3), 254–265. https://doi.org/10.3109/01480545.2014.947423

Bonfanti, P., Colombo, A., Orsi, F., Nizzetto, I., Andrioletti, M., Bacchetta, R.,& Vismara, C. (2004). Comparative teratogenicity of Chlorpyrifos and Malathion on Xenopus laevis development. *Aquatic Toxicology*, *70*(3), 189–200. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.09.007

Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., & Colombo, A. (2018). A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in Xenopus laevis. *Aquatic Toxicology*, *195*, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.007

Bosisio, S., Fortaner, S., Bellinetto, S., Farina, M., Del Torchio, R., Prati, M., … Sabbioni, E. (2009). Developmental toxicity, uptake and distribution of sodium chromate assayed by frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *Science of the Total Environment*, *407*(18), 5039–5045. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.047

Bruner, M. A., Rao, M., Dumont, J. N., Hull, M., Jones, T., & Bantle, J. A. (1998). Ground and Surface Water Developmental Toxicity at a Municipal Landfill: Description and Weather-Related Variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *39*(3), 215–226. https://doi.org/10.1006/eesa.1998.9999

Collins, M. D., & Mao, G. E. (1999). Teratology of retinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *39*, 399–430. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.399

Colombo, A., Saibene, M., Moschini, E., Bonfanti, P., Collini, M., Kasemets, K., & Mantecca, P. (2017). Teratogenic hazard of BPEI-coated silver nanoparticles to Xenopus laevis. *Nanotoxicology*, *11*(3), 405–418. https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1309703

Committee on Methods for Acute Toxicity Tests with Aquatic Organisms. (1975). *Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians*. (Ecological research series EPA-600/3-75-009 96, Ed.). https://doi.org/10.1520/E0729-96R14.2

Dawson, D A, McCormick, C. A., & Bantle, J. A. (1985). Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay--Xenopus (FETAX). *Journal of Applied Toxicology : JAT*, *5*(4), 234–244.

Dawson, Douglas A., Fort, D. J., Smith, G. J., Newell, D. L., & Bantle, J. A. (1988). Evaluation of the developmental toxicity of nicotine and cotinine with frog embryo teratogenesis assay: Xenopus. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, *8*(6), 329–338. https://doi.org/10.1002/tcm.1770080603

Domingo, J. L. (1989). Cobalt in the environment and its toxicological implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *108*, 105–132.

Drug and Therapeutics Bulletin. (2014). Nicotine and health. *Drug and Therapeutics Bulletin*, *52*(7), 78–81. https://doi.org/10.1136/dtb.2014.7.0264

Dumont, J. N., Schultz, W. T., Buchanan, Michelle V., & Kao, G. L. (1983). Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX) — A Short-Term Assay Applicable to Complex Environmental Mixtures. In M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff, & S. Nesnow (Eds.), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III* (pp. 393–405). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3611-2

Dumont, J. N., Bantle, J. A., & Linder, G. (2003). The History and Development of FETAX (ASTM Standard Guide, E-1439 on Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus). *Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations*, *ASTM STP 1*.

Dumont, J. N., & Schultz, T. W. (1980). Effects of coal-gasification sour water on Xenopus laevis embryos. *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering*, *15*(2), 127–138. https://doi.org/10.1080/10934528009374918

EFSA, E. F. S. (2005). What is caffeine ? How does the body process caffeine ? What are the risks ? Why did EFSA carry out its risk assessment ? How much caffeine do we consume ? *EFSA Scientific Opinion on the Safety of Caffeine*, 1–4. https://doi.org/10.2805/618813

Fort, D J, Stover, E. L., Bantle, J. A., Rayburn, J. R., Hull, M. A., Finch, R. A.,& Gaudet-Hull, A. M. (1998). Phase III interlaboratory study of FETAX, Part 2: interlaboratory validation of an exogenous metabolic activation system for frog embryo teratogenesis assay--Xenopus (FETAX). *Drug and Chemical Toxicology*, *21*(1), 1–14. https://doi.org/10.3109/01480549809017846

Fort, D J, Stover, E. L., Propst, T. L., Faulkner, B. C., Vollmuth, T. A., & Murray, F. J. (1998). Evaluation of the developmental toxicity of caffeine and caffeine metabolites using the frog embryo teratogenesis assay--Xenopus (FETAX). *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *36*(7), 591–600. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00021-0

Fort, Douglas J., Propst, T. L., & Stover, E. L. (1996). Evaluation of the developmental toxicity of 4-Bromobenzene using frog embryo teratogenesis assay?Xenopus: Possible mechanisms of action. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, *16*(6), 307–315. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(1996)16:6<307::AID-TCM3>3.0.CO;2-M

Fort, Douglas J, Rayburn, J. R., & Bantle, J. A. (1992). Evaluation of Acetominophen-Induced Developmental Toxicity using FETAX. *Drug and Chemical Toxicology*, *15*(4), 329–350.

Gaudet-Hull, A. M., Rayburn, J. R., Bantle, J. A., Burton, D. T., Turley, S. D., Dawson, D. A.,& Buchwalter, D. (1994). Fetax interlaboratory validation study: Phase II testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *13*(10), 1629–1637. https://doi.org/10.1002/etc.5620131012

Groppelli, S., Pennati, R., De Bernardi, F., Menegola, E., Giavini, E., & Sotgia, C. (2005). Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on Xenopus laevis development: craniofacial defects. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *73*(4), 370–381. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.04.004

Hauptman, O., Albert, D. M., Plowman, M. C., Hopfer, S. M., & Sunderman, F. W. J. (1993). Ocular malformations of Xenopus laevis exposed to nickel during embryogenesis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *23*(6), 397–406.

Haywood, L. K., Alexander, G. J., Byrne, M. J., Cukrowska, E., Haywood, L. K., Alexander, G. J., … Cukrowska, E. (2016). Xenopus laevis embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc , copper , lead and cadmium Xenopus laevis embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc , copper , lead and cadmium, *7020*(February). https://doi.org/10.1080/15627020.2004.11657213

Herkovits, J., Cardellini, P., Pavanati, C., & Perez-Coll, C. S. (1997). Susceptibility of early life stages of Xenopus laevis to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *16*(2), 312–316. https://doi.org/10.1002/etc.5620160229

Hsie, A. W., O'Neill, J. P., Sebastian, J. R. S., Couch, D. B., Brimer, P. A., Sun, W. N. C., … Hsie, M. H. (1978). Quantitative Mammalian Cell Genetic Toxicology: Study of the Cytotoxicity and Mutagenicity of Seventy Individual Environmental Agents Related to Energy Technologies and Three Subfractions of a Crude Synthetic Oil in the CHO/HGPRT System. In *Application of Short-Term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures* (pp. 291–315). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3611-2_12

Isidori, M., Piscitelli, C., Russo, C., Smutná, M., & Bláha, L. (2016). Teratogenic effects of five anticancer drugs on Xenopus laevis embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *133*, 90–96. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.044

Ke, C., Liu, Q., Li, L., Chen, J., Zhao, C., Xu, J.,& Li, L. (2018). Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets. *Aquaculture*, *484*, 338–342. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.034

Kovacs, R., Bakos, K., Urbanyi, B., Kovesi, J., Gazsi, G., Csepeli, A., … Horvath, A. (2016). Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research International*, *23*(15), 14718–14729. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5036-z

Longo, M., Zanoncelli, S., Della Torre, P., Rosa, F., Giusti, A. M., Colombo, P.,& Olliaro, P. (2008). Investigations of the effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus

(FETAX). *Reproductive Toxicology*, *25*(4), 433–441. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.02.004

McKnight, U. S., Rasmussen, J. J., Kronvang, B., Binning, P. J., & Bjerg, P. L. (2015). Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environmental Pollution*, *200*, 64–76. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.02.015

Morgan, M. K. (1996). Teratogenic Potential of Atrazine and 2,4-D Using Fetax. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *48*(2), 151–168. https://doi.org/10.1080/009841096161401

Nations, S., Wages, M., Canas, J. E., Maul, J., Theodorakis, C., & Cobb, G. P. (2011). Acute effects of Fe(2)O(3), TiO(2), ZnO and CuO nanomaterials on Xenopus laevis. *Chemosphere*, *83*(8), 1053–1061. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.061

Nica, A., & Woinaroschy, A. (2010). Environmental assessment of citric acid production. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, *72*(3), 45–56.

Nunes, B., Antunes, S. C., Santos, J., Martins, L., & Castro, B. B. (2014). Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? Ecotoxicology and Environmental Safety, 107, 178–185. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.027xic potential of paracetamol to freshwater organisms: A heada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *107*, 178–185. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.027

Okorie, O. E., Bae, J. Y., Lee, J. H., Lee, S., Park, G. H., Mohseni, M., & Bai, S. C. (2014). Effects of different dietary cadmium levels on growth and tissue cadmium content in juvenile parrotfish, oplegnathus fasciatus. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *27*(1), 62–68. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11222

Parker, T. T., & Rayburn, J. (2017). A comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of Xenopus laevis embryos. *Toxicology Reports*, *4*(June 2013), 77–82. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.01.003

Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *156*(1), 61–66. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015

Plowman, M. C., Peracha, H., Hopfer, S. M., & Sunderman, F. W. (1991). Teratogenicity of cobalt chloride inXenopus laevis, assayed by the FETAX

procedure. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, *11*(2), 83–92. https://doi.org/10.1002/tcm.1770110204

Price, R. N. (2000). Artemisinin drugs: novel antimalarial agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *9*(8), 1815–1827. https://doi.org/10.1517/13543784.9.8.1815

Puljak, L., Marin, A., Vrdoljak, D., Markotic, F., Utrobicic, A., & Tugwell, P. (2017). Celecoxib for osteoarthritis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *5*, CD009865. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009865.pub2

Raval, N. P., Shah, P. U., & Shah, N. K. (2016). Adsorptive removal of nickel (II) ions from aqueous environment : A review, *179*, 1–3.

Reid, J. L., Millar, J. A., & Struthers, A. D. (1983). Nifedipine--studies on its mechanism of action and interaction with other circulatory control mechanisms in man. *Postgraduate Medical Journal*, *59 Suppl 2*, 98–103.

Richards, S. M., & Cole, S. E. (2006). A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to Xenopus laevis larvae. *Ecotoxicology*, *15*(8), 647–656. https://doi.org/10.1007/s10646-006-0102-4

Roberts J.L., & Morrow J.D. (2001). Analgesic–antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In L. L. E. Gilman A.G., Hardman J.G. (Ed.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (10th ed, pp. 687–731). New York, NY.: McGraw Hill.

Rogers J. M., & Kavlock R. J. (1996). Developmental Toxicology. In and D. J. Klaassen C. D., Amdur M. O. (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology* (Fifth Edit). New York, NY.: McGraw-Hill.

Ross, L. G., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. (L. G. Ross & B. Ross, Eds.). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1002/9781444302264

Schloss, P., & Williams, D. C. (1998). The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, *12*(2), 115–121. https://doi.org/10.1177/026988119801200201

Schultz, T. W., Dumont, J. N., Clark, B. R., & Buchanan, M. V. (1982). Embryotoxic and teratogenic effects of aqueous extracts of tar from a coal gasification electrostatic precipitator. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, *2*(1), 1–11.

Slaughter, E., Gersberg, R. M., Watanabe, K., Rudolph, J., Stransky, C., & Novotny, T. E. (2011). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, *20 Suppl 1*, i25-9. https://doi.org/10.1136/tc.2010.040170

Smutná, M., Priebojová, J., Večerková, J., & Hilscherová, K. (2017). Retinoid-like compounds produced by phytoplankton affect embryonic development of Xenopus laevis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *138*(August 2016), 32–38. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.018

Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., & Rajaguru, P. (2001). Genotoxicity of textile dye effluent on fish (Cyprinus carpio) measured using the comet assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *66*(3), 407–414.

Sunderman, F. W. J., Plowman, M., & Hopfer, S. (1991). Embryotoxicity and Teratogenicity of Cadmium Chloride in Xenopus laevis,Assayed by the FETAX Procedure. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *21*(6), 381–391. https://doi.org/0091-7370/91/1100-0381

Trivedi, B., Saxena, D. K., Murthy, R. C., & Chandra, S. V. (1989). Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered hexavalent chromium in mice. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *3*(4), 275–278.

United States Environmental Protection Agency. (2016). Pesticides: registration. Retrieved October 16, 2018, from https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/triadimefon_triadimenol_fs.html#health

University of Hertfordshire. (2018). PPDB: Pesticide Properties DataBase. Retrieved September 17, 2018, from https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/371.htm

von Keutz, E., & Schluter, G. (1998). Preclinical safety evaluation of cerivastatin, a novel HMG-CoA reductase inhibitor. *The American Journal of Cardiology*, *82*(4B), 11J-17J.

Vrskova, D., & Modra, H. (2012). Evaluation of the developmental toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil anaesthetics using the Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX). *Veterinarni Medicina*, *57*(5), 245–250. https://doi.org/10.17221/5955-VETMED

Whitney, K. D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *134*(1), 53–62. https://doi.org/10.1006/taap.1995.1168

Yoon, Y.-H., Kim, J. Y., Bae, Y. C., Nam, S.-W., Cho, H.-J., Lee, S., & Park, M.-J. (2018). Evaluation of the toxic effects of celecoxib on Xenopus embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.002

Yoshioka, H., Nonogaki, T., Fukuishi, N., Shinohara, Y., Hwang, G.-W., Ohtani, K., & Miura, N. (2017). Chronotoxicity of bromobenzene-induced hepatic injury in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, *42*(2), 251–258. https://doi.org/10.2131/jts.42.251

Yu, S., Wages, M. R., Cai, Q., Maul, J. D., & Cobb, G. P. (2013). Lethal and sublethal effects of three insecticides on two developmental stages of xenopus laevis and comparison with other amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(9), 2056–2064. https://doi.org/10.1002/etc.2280

Capítulo 9

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CYP1A EN PECES PLANOS EN EL SURESTE DEL GOLFO DE MÉXICO

Wendy Donaji Nicolás-González [1]

Isajav Rivas-Reyes [1]

Mayra Alejandra Cañizares-Martínez [1]

Mercedes Quintanilla-Mena[1]

Victoria Patiño-Suárez[1]

Marcela Del Río-García[1]

Omar Zapata-Pérez[1†]

Carlos Puch-Hau[1*]

[1] Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Departamento de Recursos del Mar, Unidad Mérida. Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Apdo. Postal 73-Cordemex, 97310 Mérida, Yucatán, México.

* cashi026@hotmail.com

Resumen

La evaluación de la exposición de los organismos a sustancias químicas puede determinarse a nivel molecular a través de biomarcadores moleculares involucrados con la biotransformación de xenobióticos. En este estudio, se evaluaron los niveles de expresión génica de Citocromo P450 1A (CYP1A) en peces planos colectados en dos zonas al sureste del Golfo de México (Sonda de Campeche [SC] y norte de la Península de Yucatán [PY]) como posibles respuestas a la presencia de xenobióticos. Los resultados señalan que en la "Sonda de Campeche" la mayoría de los peces presentan ciertos niveles de expresión de CYP1A, sin embargo, estas expresiones fueron bajas en todas las estaciones con respecto a otros puntos del Golfo de México; esto, sugiere que los peces pueden estar respondiendo a una exposición crónica o en su caso, a la baja presencia de contaminantes. En contraste con la "zona norte de la Península de Yucatán", un menor número de organismos presentaron niveles de expresión de este biomarcador, sin embargo, en dos estaciones (PY 6 y PY 8) los niveles de ARNm de CYP1A, fueron mayores a los registrados en la "Sonda de Campeche". La prueba de krustal wallis demostró diferencias significativas tanto en las estaciones de la SC (H: 34.48, P: 0.0009) como en las de la PY (H: 14.04, P: 0.0001). Este estudio genera información relevante sobre las condiciones de salud de los organismos presentes en la Sonda de Campeche y establece la línea base ambiental de la Península de Yucatán.

*Palabras clave***:** monitoreo ambiental, contaminación, lenguados, hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1. Introducción

El Golfo de México posee importantes recursos naturales cuya correcta explotación puede generar notables beneficios económicos y sociales (Albert y Benítez, 2005). Es una de las regiones petroleras más grandes del mundo, especialmente la región sureste que contiene más del 80% de las reservas total del crudo y gas natural (Brooks, 1990). México es uno de los principales productores de petróleo que exporta a diferentes países como Latinoamérica, Estados Unidos, Canadá, Europa y Asia (Ponce y Botello, 2005).

Desafortunadamente, esta y otras actividades como el turismo, la industria y la agricultura, introducen al Golfo de México diversos contaminantes entre los que se encuentran los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs, pos sus siglas en ingles), compuestos halogenados, bifenilos policlorados (PCBs, por sus siglas en ingles) y metales pesados que afectan a los organismos de los ecosistemas acuáticos (Celis-Hernández et al., 2013). Con respecto a la presencia de hidrocarburos en mar abierto, tanto en la región del Golfo de México como del Caribe mexicano, existen áreas localizadas donde los niveles de éstos compuestos rebasan los criterios actuales y superan el valor de 10 µg/L, establecido por la UNESCO (1976). Estos sitios específicos corresponden a la Sonda de Campeche, frente a la laguna de Términos en donde se ubican la mayoría de las plataformas petroleras y también frente al puerto de Veracruz (Ponce y Botello, 2005).

La evaluación del estado de salud de estos ecosistemas a través del efecto de los contaminantes en los peces, representa un importante aspecto para la protección ambiental y la conservación de los recursos marinos (Gold-Bouchot et al., 2017; Puch-Hau et al., 2018), por tal motivo, diferentes genes biomarcadores de contaminantes, han sido utilizados como herramientas para los estudios de toxicología ambiental. Entre estos biomarcadores moleculares, CYP1A es ampliamente utilizado debido a que está involucrado en el metabolismo de diversos compuestos tóxicos, tales como PCBs, PAHs, pesticidas organoclorados y dioxinas (Higgins y Hayes 2011; Uno et al., 2012; Kim et al., 2013). CYP1A, forma parte de la fase I del sistema de biotransformación de xenobióticos que a través de reacciones oxidativas, reductoras e hidrolíticas convierten a las moléculas xenobióticas en sustancias más solubles en agua permitiendo de esta manera que sea más fácil su excreción (Krom et al., 2017).

Entre las diferentes especies de peces marinos utilizados en el monitoreo ambiental, los peces planos son buenos candidatos puesto que sus hábitos,

alimentación y vida adulta se encuentre en el bentos y por ende, están expuestos a los contaminantes que se acumulan en el fondo marino (Puch-Hau et al., 2018).

Debido a que el Golfo de México es considerado una zona económicamente activa, en donde la pesca y la producción petrolera generan grandes divisas al país; éstas actividades en conjunto con la industria, agricultura, minería y ganadería, tienen por consecuencia la producción de substancias tóxicas las cuales son liberadas directa o indirectamente sobre las aguas nacionales, por lo que cada vez es más importante realizar análisis sobre la situación actual de las condiciones ambientales. En este estudio, a través de la expresión génica de CYP1A en peces planos, se realizó un monitoreo en dos zonas ubicadas al sureste del Golfo de México (Sonda de Campeche y zona norte de la Península de Yucatán), con el objetivo de conocer el estado de salud actual de ambas zonas y sentar la línea base ambiental. Lo anterior contribuirá al desarrollo de medidas precautorias y de mitigación que ayuden a reducir el riesgo ecológico por contaminación en diferentes zonas y de la biota presente en estos ecosistemas.

2. Material y métodos

2.1 Área de muestreo

Se realizaron dos campañas oceanográficas para recolectar muestras. La primera campaña fue denominada "Jorge Carranza Fraser del Instituto Nacional de Pesca" (JCFINP1707), para el monitoreo del área aledaña a la zona de exclusión al sureste del Golfo de México a bordo del buque de investigación oceanográfica pesquera (BIPO). Se muestrearon 19 estaciones a lo largo de la SC, al Sur del Golfo de México (figura 1). En cada estación se realizaron arrastres de 1 milla náutica con una red camaronera tipo semiportugal y se capturaron aproximadamente 10 peces planos por estación, siguiendo lo estipulado por el Programa de Monitoreo Ambiental en el Golfo de México desde 1999.

La segunda campaña denominada "GoMex V" forma parte del programa de monitoreo ambiental del Golfo de México. En esta campaña se muestrearon 15 estaciones a lo largo del norte de la PY los cuales se ilustran en la figura 1. En esta ocasión las características del arrastre fueron similares, pero en esta campaña se seleccionaron aproximadamente 5 peces planos por estación, siguiendo lo establecido en el Programa de Monitoreo Ambiental en el Golfo de México desde 1999.

Los peces planos recolectados fueron medidos y disectados al momento de la colecta, extrayendo una porción de hígado (mayor actividad de CYP1A), este se colocó en tubos criogénicos de 2 ml (Corning®), y se almacenaron en un ultracongelador (Thermo Fisher Scientific LLC, modelo ULT2586-6-A42) a -80°C, hasta su posterior procesamiento en laboratorio (Zapata-Pérez et al., 2010).

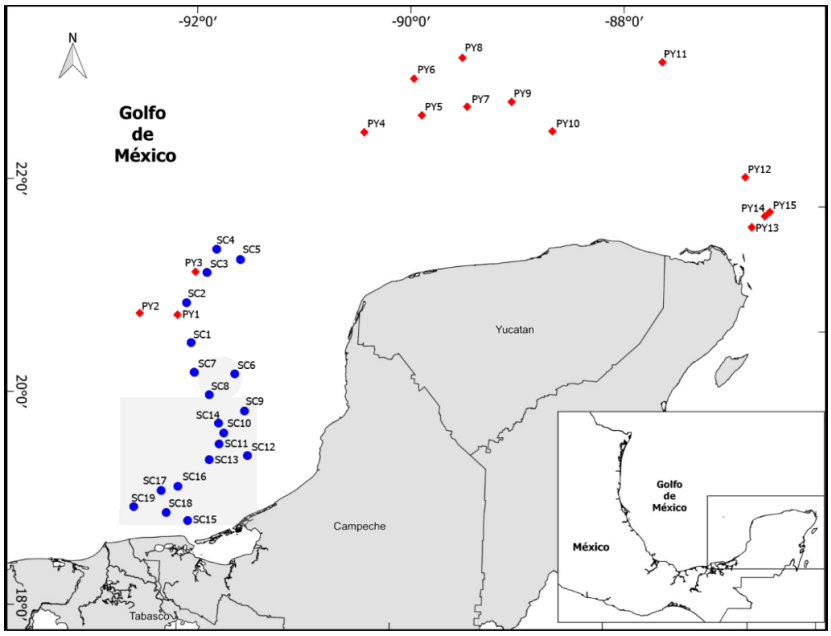


Figura 1. Distribución geográfica de los puntos muestreados en ambas zonas al sureste del Golfo de México (Rojo: estaciones de PY, azul: estaciones de SC. La zona sombreada representa la zona de exclusión petrolera). Elaboración propia

2.2 Extracción de ARN

Las muestras de hígado se procesaron en el laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Mérida.

El ARN se extrajo utilizando un kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero, el tejido fue macerado con un mortero y posteriormente se agregaron 175 µl de buffer de lisis para romper las membranas celulares y poder extraer la mayor cantidad de ARN posible. A las muestras se le agregó 350 µl de RNA Dilution Buffer (Promega®) y se incubó a 70 C en el baño maría (Isotemp 205) por 5 min. Luego, se colocaron en la centrífuga (Centrifuge 5804 R 15 amp versión de Eppendorf®) a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) por 40 min a 4°C, para la separación de la materia orgánica del ARN. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo eppendorf de 1.7

ml, se adicionó 200 µl de EtOH al 100% y se mezcló por inversión tres veces. Las muestras se colocaron en unas columnas que constan de un tubo colector y la columna con filtro y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 2 min a 25°C. Se prosiguió a hacer un lavado con RNA Wash Solution (RNA Wash Solution – 206 ml y EtOH al 95% - 350 ml) y se centrifugó nuevamente con el programa anterior. Posteriormente se adicionó 50 µl de DNAse mix (Yellow Core Buffer – 40 µl, $MnCl_2$ 0.09 M – 5 µl y DNAse I – 5 µl), con la finalidad de eliminar el ADN en la muestra, y se dejó incubar por 15 min a 25°C. Luego, se agregó 200 µl de DNAse Stop Solution, para inactivar a la enzima, y se centrifugó con el programa anterior. Finalmente se realizaron tres lavados adicionales con RNA Wash Solution, y el ARN se eluyó con 40 µl de Nuclease-Free Water.

La pureza y concentración de las muestras fueron medidas por espectrofotometría con ayuda del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se utilizó la relación de las absorbancias a 260/280 y 260/230 con el rango de 1.9 a 2.0 para verificar la ausencia de proteínas y solventes, respectivamente. Posteriormente se verificó la integridad del ARN extraído por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando bromuro de etidio como reportero.

2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para llevar a cabo los análisis de expresión génica de CYP1A, 2.5 µg de ARN fueron convertidos en ADNc. Para esto, se ocupó H_2O ultrapura y 1 µl de oligo d(T) 10 µM. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 70°C durante 5 min. Seguidamente, fueron colocadas en un cooler a – 20 C y se le adicionó 4 µl de buffer de reacción x5, 2.5 µl de $MgCl_2$ (25mM), 1 µl de dNTPs (10 mM) y 1 µl de transcriptasa inversa por muestra. Las reacciones se colocaron en un termociclador (2720 Thermal Cycler de Appied Biosystems®) para que la síntesis de ADNc se realizara bajo las siguientes condiciones: 25°C por 5 min, 42°C por 90 min, 70°C por 15 min y finalmente a 4°C. La calidad de la síntesis del ADNc fue verificado amplificando el gen de la β-actina. Los productos amplificados fueron visualizados en una electroforesis con un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR–TR)

Los niveles de expresión de CYP1A fueron determinados por PCR en Tiempo Real (PCR-TR) utilizando el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Appied Biosystems®-Life Techonologies) y el método de cuantificación absoluta. Esta técnica permitió determinar el número de copias del transcripto en muestras

desconocidas (esto con la finalidad de conocer la expresión real de CYP1A que hay en cada muestra), al ser interpoladas en un rango de estándares de concentraciones conocidas.

Los estándares, fueron generados con diluciones seriales 1:10 (1000 pg – 0.0001 pg) de plásmidos recombinantes, en donde la eficiencia y el coeficiente de correlación fueron evaluados. Los estándares y las muestras fueron analizados por triplicado.

La PCR–TR fue realizada a partir de 1 µl de ADNc, 7 µl de H2O libre de DNAsa, 1 µl de cada cebador (500 nM [inicio: ATCCCTATCCTCCAGTTCC y termino: AGTCTGTGATGTCTCGGATG) y 5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosytems).

2.5 Análisis estadísticos

Con ayuda del programa Infostat (versión 2017e) se realizaron las pruebas de Shapiro–Wilks para comprobar la normalidad de los datos con base a los siguientes criterios: P valor >0.05 = Datos normales y P valor <0.05 = Datos no normales

Posteriormente, si los datos fueron no normales, se empleó un análisis no paramétrico de Kruskall-Wallis para encontrar diferencias entre los niveles de cada mediana de las muestras. Los criterios para este análisis fueron: P valor >0.05 = No existe diferencia significativa y P valor <0.05 = Existe diferencia significativa.

3. Resultados

3.1 Peces colectados en la SC

Se recolectaron 189 peces planos (tabla 1), donde *Cyclopsetta chittendeni* y *Syacium gunteri* fueron más frecuentes, con 79 y 103 individuos, respectivamente. Estas especies estuvieron distribuidas en 14 estaciones de las 19 muestreadas. Por otro lado, *Etropus crossotus* fue la especie menos frecuente en este muestreo con dos individuos recolectados únicamente en la estación SC 6. En cuanto a las características morfométricas, en la tabla 2 se presentan las longitudes totales y peso de los organismos en cada una de las estaciones.

Tabla 1. Frecuencia y características morfométricas de las especies capturadas en la SC.

Estación	Especie	Sexo	Frec.	Lt (cm)	Peso (g)
SC1	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	2	27.75	654
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	3	26.5	350.33
	Syacium gunteri	Macho	5	15.28	48.76
SC2	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	2	29.5	297.25
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	1	20.6	84
	Syacium gunteri	Hembra	1	22.5	105
	Syacium gunteri	Macho	3	25.8	168
	Syacium gunteri	NS	2	24.4	154
	NI	Macho	1	23	122
SC3	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	7	27.31	210.43
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	3	27.7	219.33
SC4	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	2	26.85	186.5
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	1	26.5	155
	Syacium gunteri	Macho	7	27.79	181
SC5	*Syacium gunteri*	Hembra	1	23.6	131
	Syacium gunteri	Macho	8	23.61	133.94
	Syacium gunteri	NS	1	24.6	143
SC6	*Etropus crossotus*	Hembra	1	15.3	30
	Etropus crossotus	NS	1	13	20
	Cyclopsetta chittendeni	Hembra	1	35.1	600
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	2	19.4	80.5
	Cyclopsetta chittendeni	NS	1	32.3	600
SC7	*Syacium gunteri*	Macho	10	28.47	226.4
SC8	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	7	32.66	371.79

	Cyclopsetta chittendeni	Macho	3	33.13	388.33
SC9	Syacium gunteri	Hembra	1	32.8	357
	Syacium gunteri	Macho	9	15.42	50.11
SC10	Syacium gunteri	Macho	10	14.05	36.08
SC11	Cyclopsetta chittendeni	Hembra	3	24.73	156.1
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	1	21.1	88.2
	Syacium gunteri	Macho	5	15.62	51.22
	Syacium gunteri	NS	1	16.2	63
SC12	Syacium gunteri	Macho	10	15.8	51.26
SC13	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	1	36	320
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	1	27.8	234
	Syacium gunteri	Hembra	1	11.9	19.54
	Syacium gunteri	Macho	5	13.6	32.19
	Syacium gunteri	NS	2	12.65	26.89
SC14	*Syacium gunteri*	Macho	3	15.43	48.65
	Cyclopsetta chittendeni	Hembra	5	34.9	504.4
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	1	23.3	276
	Cyclopsetta chittendeni	NS	1	31.5	343
SC15	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	1	21.5	97.5
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	5	21.18	106.4
	Syacium gunteri	NS	4	17.08	64.04
SC16	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	2	20.85	96.25
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	5	24.04	119.67
	Syacium gunteri	Macho	3	13.77	34.31
SC17	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	2	31.5	371.55
	Cyclopsetta chittendeni	Macho	8	29.09	273.58
SC18	*Cyclopsetta chittendeni*	Macho	2	22.35	102.9
	Syacium gunteri	Macho	8	13.33	31.6
SC19	*Cyclopsetta chittendeni*	Hembra	3	28.03	295.14

	Syacium gunteri	Macho	7	14.09	35.06

Lt: longitud total; Ni: no identificado; NS: no sexados

3.2 Peces colectados en el Norte de la PY

Con respecto a la PY, se lograron colectar un total de 99 organismos en las 15 estaciones. Entre las diferentes especies se encuentran: *Syacium gunteri*, *Syacium papillosum*, *Ancyclopsetta dilecta*, *Bothus robinsi* y *Cyclopsetta fimbriata*, siendo *Syacium papillosum* la especie más abundante. Las especies y las medidas morfométricas de las especies se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencia y características morfométricas de las especies capturadas al

Norte de la PY.

Estación	Especie	Sexo	Frec	Lt (cm)	Peso (cm)
PY 1	*Syacium gunteri*	NS	3	12.47	33.33
PY 2	*Syacium papillosum*	Hembra	2	23.5	95
	Syacium papillosum	Macho	2	25.5	133
	Syacium papillosum	NS	1	22	90
PY 3	*Syacium gunteri*	Macho	1	28	190
	Syacium gunteri	NS	1	18	50
	Syacium papillosum	Hembra	1	21.5	80
	Syacium papillosum	Macho	2	22.1	115
PY 4	*Syacium gunteri*	Hembra	1	21	80
	Syacium papillosum	Hembra	2	18.25	40
	Syacium papillosum	Macho	2	23	10
	Syacium papillosum	NS	1	22	60
PY 5	*Syacium papillosum*	Hembra	2	24.25	105
	Syacium papillosum	Macho	3	26.7	126.67
PY 6	*Syacium papillosum*	Hembra	4	23.88	110
	Ancyclopsetta dilecta	NS	2	22.9	100

PY 7	*Syacium papillosum*	Hembra	2	21.2	40
	Syacium papillosum	Macho	1	25.1	100
	Syacium papillosum	NS	3	25.5	96.67
PY 8	*Syacium papillosum*	NS	4	26.25	137.5
	Ancyclopsetta dilecta	Macho	1	23	100
	Ancyclopsetta dilecta	NS	3	23.5	96.67
PY 9	*Syacium papillosum*	NS	1	22	80
	Bothus robinsi	Hembra	3	16	36.67
	Bothus robinsi	NS	6	16.68	36.67
PY 10	*Syacium papillosum*	Hembra	1	26	110
	Syacium papillosum	Macho	8	26.18	123.75
	Cyclopsetta fimbriata	NS	1	26	110
PY 11	*Syacium papillosum*	Macho	2	23.25	90
	Syacium papillosum	NS	3	22.33	60

Tabla 2. (Continuación). Frecuencia y características morfométricas de las especies capturadas al norte de la PY.

PY 12	*Syacium gunteri*	NS	1	28	200
	Syacium papillosum	Hembra	2	25	105
	Syacium papillosum	NS	7	25.5	122.86
PY 13	*Syacium papillosum*	Hembra	1	23	100
	Syacium papillosum	NS	1	29	200
	NI	Hembra	1	17	50
	Bothus robinsi	Hembra	2	18.5	70
PY 14	*Syacium gunteri*	Hembra	1	22.5	90
	Syacium papillosum	Macho	1	28.5	190
	Syacium papillosum	NS	3	26	99
PY 15	*Cyclopsetta fimbriata*	Hembra	1	25.5	100
	Cyclopsetta fimbriata	NS	1	26	110
	Syacium papillosum	Hembra	3	21.83	93.33

	Syacium papillosum	Macho	1	28	200	
	Syacium papillosum	NS	4	25		122.5

Lt: longitud total; Ni: no identificado; NS: no sexados

3.3 Niveles de expresión de CYP1A en la SC

Niveles de expresión de CYP1A fueron detectados en los peces planos de las estaciones muestreadas en la SC. Los organismos de la estación SC 1 presentaron mayor expresión de CYP1A, con un promedio de 5,538 copias del transcrito/µg de ARN, seguido por la estación SC 6 con 3,306 copias del transcrito/µg de ARN. Con respecto a las estaciones SC 5 y SC 11, no se detectaron niveles de expresión de este biomarcador, lo cual se traduce con un valor de cero en número de copias/µg de ARN (figura 2a). A pesar de que en la mayoría de las estaciones se detectaron niveles de expresión, estos fueron bajos con respecto a otros sitios del Golfo de México. A su vez, en la figura 2b, se muestra la ubicación geográfica de las estaciones, así como los niveles de expresión representados por el tamaño del círculo. La región sombreada en gris, represente la zona de exclusión de PEMEX.

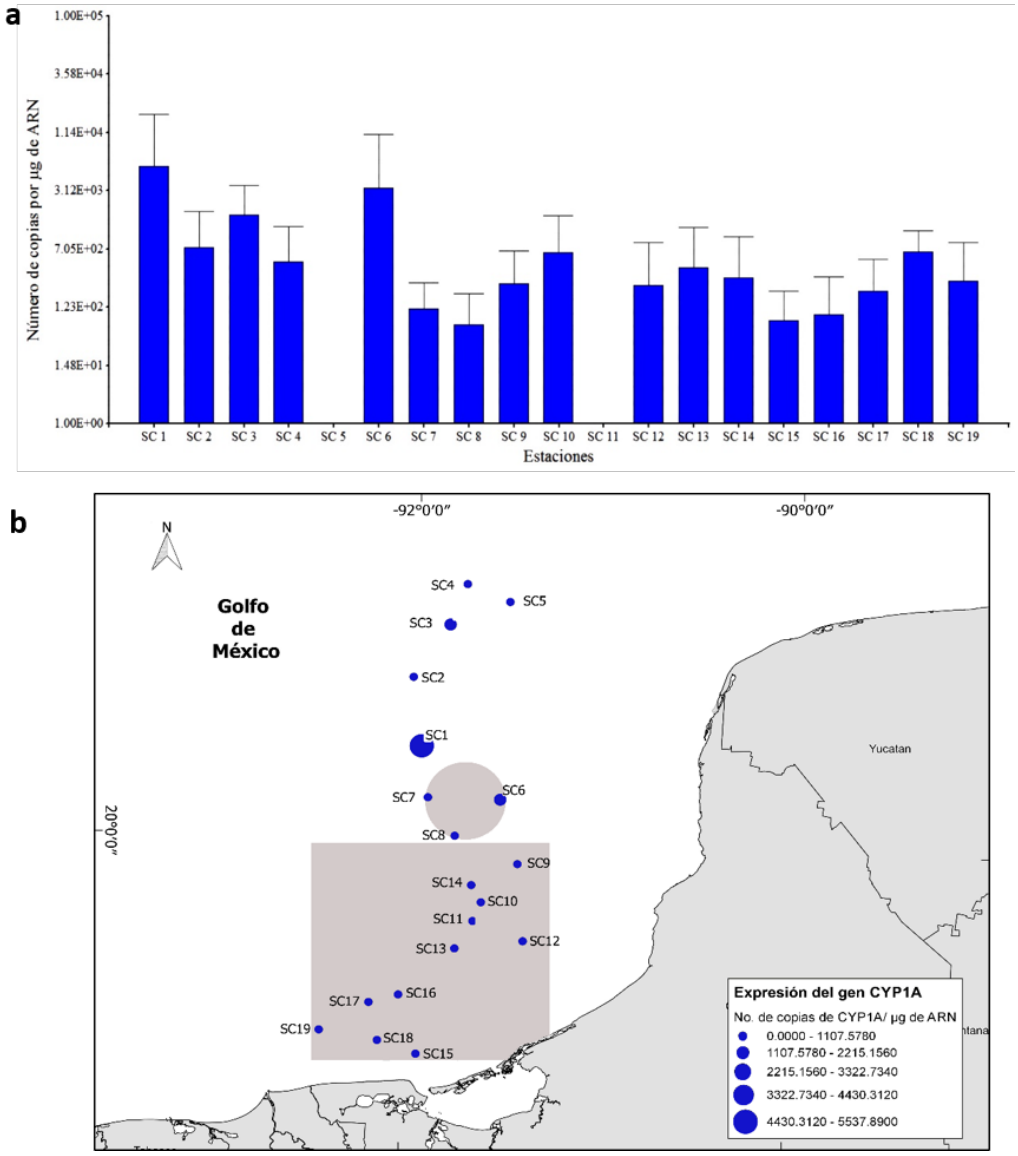


Figura 2. Representación gráfica (a) y espacial (b) del número promedio de copias por µg de ARN en los peces de las estaciones muestreadas en la SC y la zona de exclusión (zona sombreada en gris). Elaboración propia

3.4 Niveles de expresión de CYP1A al Norte de la Península de Yucatán

En esta zona las variaciones de los niveles de expresión fueron más notorias, siendo PY 6 la estación en donde los peces presentaron niveles más altos de todo el muestreo con 38,599 copias/µg de ARN, seguida por la estación PY 8 con un valor de 34,490 copias/µg de ARN, ocupando el segundo lugar en todo el muestreo. Los

peces de la estación PY 2 presentaron un valor promedio de expresión de 1,290 copias/µg de ARN, representando el tercer lugar para esta zona (figura 3a). En la mayoría de las estaciones no se detectaron niveles de expresión de CYP1A, lo cual se traduce con un valor de cero en número de copias/µg de ARN. En la representación espacial, se puede observar que las dos estaciones con mayores niveles de expresión, estuvieron situadas en las zonas más profundas de la Península de Yucatán, mientras que los menores niveles, en aguas más someras (figura 3b).

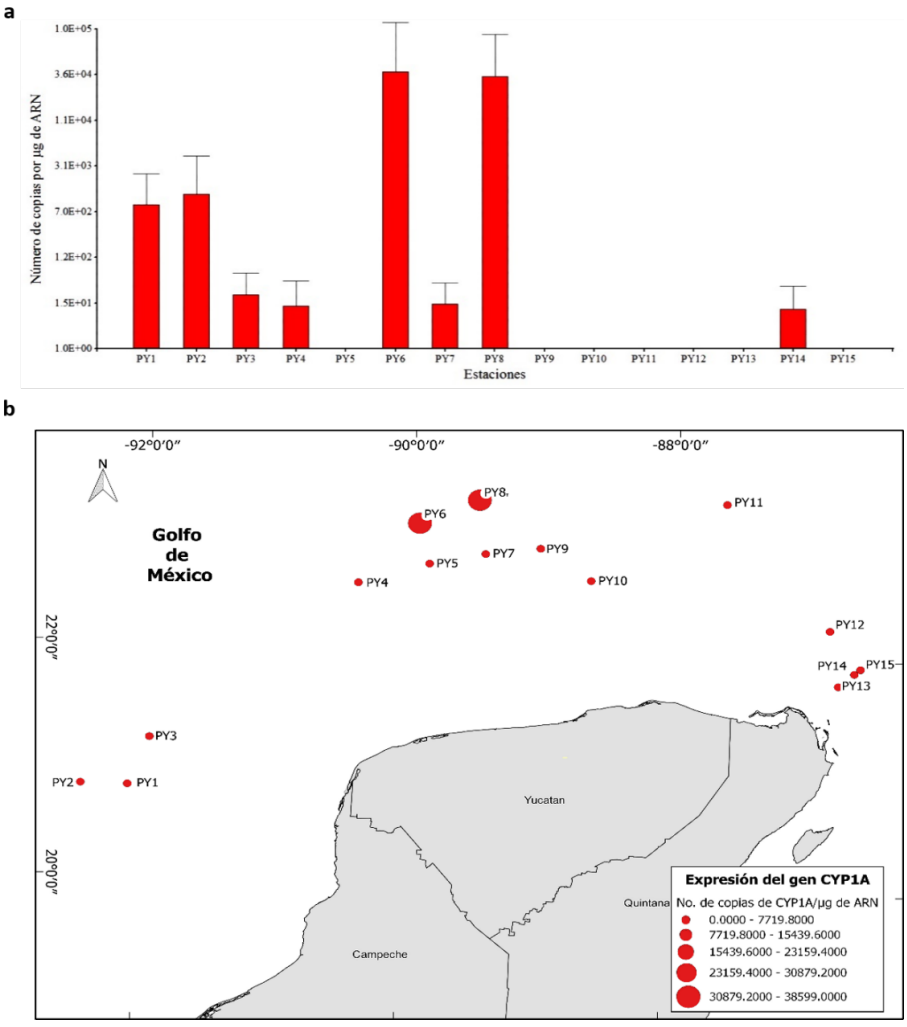


Figura 3. Representación gráfica (a) y espacial (b) del número promedio de copias por µg de ARN de las estaciones muestreadas en al norte de la Península de Yucatán. Elaboración propia.

3.5 Análisis estadísticos de los niveles de expresión de CYP1A en la SC

La estación SC 1 registro un valor máximo de 27,795 copias/µg de ARN y un valor mínimo de 0 copias/µg de ARN. En la estación SC 3 se obtuvo la mediana más alta de la zona con 1,047 copias/µg de ARN, mientras que la mediana más baja fue de 35 copias/µg de ARN para la estación SC 9 (sin contar las estaciones con valor 0). La media máxima fue de 5,538 copias/µg de ARN en la estación SC 1 y la media mínima fue de 68 copias/µg de ARN en la estación SC 8. Los resultados de la prueba de Shapiro-Wills muestran una W= 0.25 con un valor P=0.0001, es por esto que se demostró que los datos no tienen una distribución normal; por lo que se procedió a realizar una prueba para datos no normales, con la prueba de Kruskal Wallis obteniéndose un valor H de 34.48 y un valor P de 0.0009. Como resultado se obtuvo que hay diferencia significativa entre los datos de las estaciones de la SC.

3.6 Análisis estadísticos de los niveles de expresión de CYP1A en la PY

En esta zona el valor máximo fue 192,519 copias/ µg de ARN presente en la estación PY 6 y el mínimo fue 0 copias en todas las estaciones. En cuanto a la media, el valor máximo obtenido fue de 38,599 copias/µg de ARN perteneciente a la estación PY 6 y el valor mínimo fue 0 copias en la mayoría de las estaciones. Por último, la mediana con valor máximo de 11,167 copias/µg de ARN fue registrada en la estación PY 8 y el mínimo fue de 0 copias registrado en el resto de las estaciones. La prueba de Shapiro-Wills arrojó una W= 0.23 y un valor P=0.0001, por lo que se comprobó que los datos de esta zona no tienen una distribución normal, al igual que los de la SC. De igual forma se realizó la prueba de Kruskal Wallis donde el valor H fue de 11.95 y el valor P fue de 0.01, lo resultados obtenidos demuestran que existe diferencia significativa en los datos de esta zona.

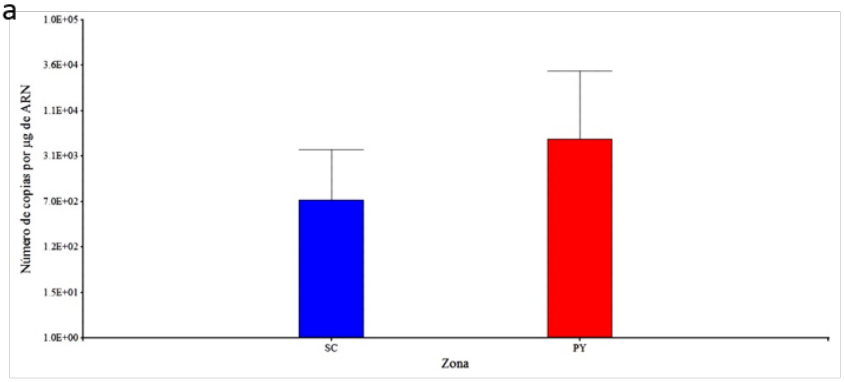
3.7 Comparación de la expresión de CYP1A entre ambas zonas al sureste del Golfo de México

Se analizaron 285 peces planos, colectados en 34 estaciones distribuidas en dos zonas al sureste del Golfo de México. En la zona PY, se presenta una media con un valor de 5,222 copias/µg de ARN y un valor máximo de 192,519 copias/µg de ARN. Con respecto a la SC la media fue de 744 copias/µg de ARN y un valor máximo de 27,795 copias/µg de ARN. Los resultados obtenidos a partir de esta comparación, nos permitieron observar que en la PY los valores de expresión de CYP1A fueron superiores a los obtenidos en la SC; estos fueron identificados principalmente en dos de las 15 estaciones. En el caso de la SC, a pesar de que en

la mayoría de las estaciones se detectaron niveles de expresión, estas fueron más bajos a las detectadas en la PY. La prueba de normalidad de Shapiro-Wills reveló que, los datos no presentan una distribución normal, por lo que se realizó la prueba de Kruskal Wallis revelando que existe diferencias significativas entre ambas zonas (valor de H: 14.04 y valor de P: 0.0001) (figura 4 a).

En la zona norte de la PY, las dos estaciones en donde los peces presentaron los valores más altos de expresión de CYP1A están situadas en sitios más lejanos de la costa, en tanto que en la SC, las estaciones con mayor nivel de expresión están ubicadas en los alrededores de la zona de exclusión, más alejadas a la costa. En la SC en el 89% de las estaciones la amplificación de CYP1A fue detectada en los organismos, a pesar de estos resultados, los valores fueron menores a los de la PY (figura 4b).

a



b

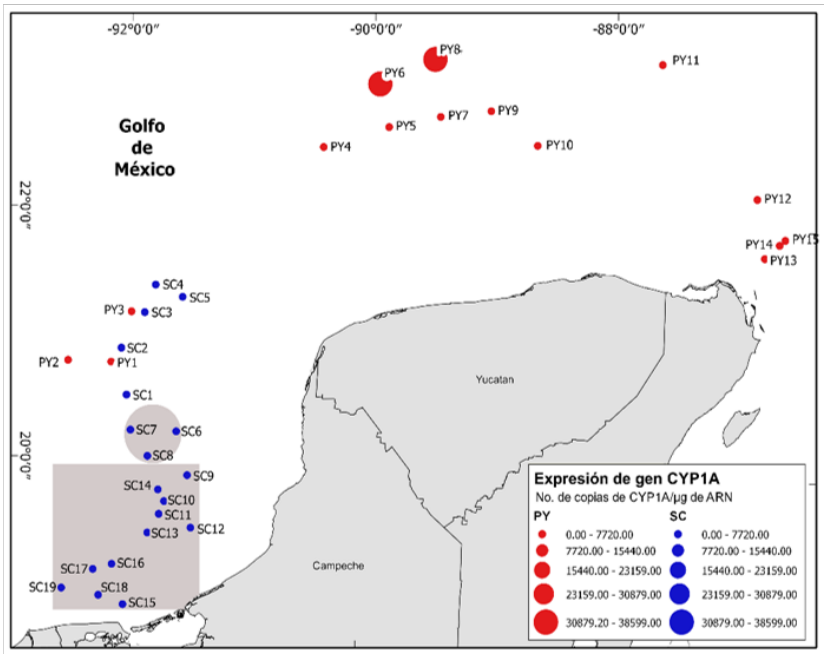


Figura 4. Representación gráfica (a) y espacial (b) del número promedio de copias por µg de ARN en los peces colectados en las estaciones muestreadas en ambas zonas al sureste del Golfo de México. (SC: Sonda de Campeche, PY: Norte de la Península de Yucatán). El área sombreada en gris representa la zona de exclusión. Elaboración propia

4. Discusión

La contaminación marina por petróleo y sus derivados en las costas mexicanas es el problema de mayor importancia ecológica en la actualidad, al igual que la contaminación causada por la urbanización e industrialización, los cuales propician efectos tóxicos en los ecosistemas y organismos que se encuentren en dicho cuerpo de agua (Van der Oost et al., 2003; Yu et al., 2008; Gao, 2013; Williams y Hubberstey 2014).

En este estudio, en casi todas las estaciones muestreadas en la zona SC se detectaron niveles de expresión de CYP1A, siendo en la mayoría de ellos relativamente bajos, amplificando en un total de 17 estaciones de las 19 muestreadas. Los mayores niveles de expresión obtenida en la estación SC1 pueden sugerir la presencia de contaminantes en este sitio, posiblemente ocasionadas por la actividad petrolera o por acción de las corrientes marinas que mueven los contaminantes de una zona a otra, o inclusive por las descargas de los ríos que traen consigo un complejo de sustancias químicas. A pesar de estos resultados, los niveles de expresión de CYP1A en los peces, fueron muy bajos comparados con otras zonas del Golfo de México. Cabe mencionar que se encontraron diferencias significativas (H: 34.48, P: 0.0009) entre los niveles del ARNm de CYP1A en los peces provenientes de las diferentes estaciones en la SC. En la zona PY, en poco más del 50% de las estaciones se pudieron determinar niveles de expresión de CYP1A con diferencias significativas entre ellas (H: 14.04, P: 0.0001), siendo en la mayoría de ellos relativamente bajos, pero a diferencia de la zona anterior, aquí resaltaron dos estaciones con los valores más altos en todo el estudio, las cuales correspondieron a la PY 6 y PY 8.

En un estudio realizado por Vázquez-Botello y colaboradores (1993) se demostró que en la zona SC se registra la mayoría de los HAPs disueltos en las aguas, esto es posiblemente debido a las aportaciones de la actividad petrolera del lugar, de igual forma se demostró que la concentración de contaminantes en los sedimentos de la zona coinciden con lo encontrado en columna de agua y esta zona

también recibe descargas frecuentes de los sistemas Grijalva-Usumacinta, siendo el segundo sistema de agua dulce más grande del Golfo de México. Por otra parte, Ponce y Botello (2005) reportan que, de forma global, el estado de Campeche ocupa el primer lugar en las concentraciones de hidrocarburos dispersos en aguas costeras y marinas de los estudios realizados hasta el momento con un promedio de 48 µg/L. Es probable que debido a que la SC es una zona con una alta actividad petroquímica, los bajos niveles de expresión de CYP1A en los peces, podría estar asociado con una exposición crónica en la cual los peces se han ido adaptando.

Por otra parte, existen otros motivos por los que la amplificación del gen se obtuvo en niveles bajos. Uno de ellas, es que varias proteínas inductoras de CYP1A pueden inhibir la actividad EROD en microsomas de hígado de peces expuestos a altas concentraciones de xenobióticos, como algunos HAPs (Haasch et al., 1993). Otra opción, podría ser el hecho de que muchos xenobióticos han mostrado su efecto inhibitorio sobre la actividad del CYP1A en hígado de peces, como lo son los metales pesados, compuestos similares a las dioxinas, PAHs, β-naftoflavona o Benzo[a]pireno a altas concentraciones, entre otros (Gravato y Santos, 2002; Viarengo, et al., 1997). Por otro lado, se ha reportado que los inductores proteicos son también sustratos enzimáticos y parecen ser retenidos por los microsomas, inhibiendo la actividad enzimática (Stegeman y Hahn, 1994). Una última opción, podría ser que el receptor AhR (Aril Hidrocarbono) el cual induce la expresión de CYP1A, se agote debido a una exposición crónica (Wirgin y Waldman, 1998).

En cuanto a lo obtenido en la zona norte de la PY, la expresión de CYP1A fue detectada en un menor número de estaciones en comparación con la SC. Con respecto a lo anterior, Ponce y Botello (2005) mencionan que a pesar de ser una región donde no se extrae el energético, es un área expuesta al tráfico cada vez más intenso de embarcaciones transportadoras del hidrocarburo provenientes de Aruba, Curazao, Maracaibo, Trinidad y Tobago, los cuales utilizan al Canal de Yucatán como ruta frecuente para llevar a América del Norte. Esto nos hace suponer que debido a esta acción, los altos niveles detectados en las dos estaciones de la PY, pueden estar asociados con algún evento puntual de contaminación ocasionada por algún buque de transporte de hidrocarburos. En el estudio de Quintanilla (2015) se obtuvieron resultados similares a los que presento en este trabajo, en la zona equivalente a la SC las ampliaciones fueron prácticamente imperceptibles, caso contrario a la zona equivalente a la PY donde las amplificaciones fueron más elevadas a la zona anterior.

El gen CYP1A se eligió para este estudio de peces planos en el Golfo de México por su comportamiento que tiene hacia varios HAPs (activación y metabolismo). La SC es una zona altamente productiva en actividades petroleras,

por el contrario la zona norte de la PY es un lugar donde no hay actividades petroleras, pero si es una zona importante para el traslado de este producto. Sin embargo, los organismos de la SC tuvieron un menor número de copias por estación, pero más estaciones amplificaron en comparación con los organismos de la PY, en donde dos estaciones demostraron tener números de copias más altos (siendo las estaciones más altas de todo el trabajo) pero menos estaciones amplificadas.

Por último, las variaciones en los niveles de expresión de CYP1A, también pueden deberse a cuestiones biológicas de los peces, tales como el sexo, la talla, la edad e inclusive la especie, sin embargo, en los estudios de monitoreo ambiental tanto nacionales como internacionales, estas variables difícilmente pueden ser controladas (Puch-Hau et al., 2017).

5. Conclusiones

La expresión de CYP1A fue detectada y cuantificada en la mayoría de las estaciones muestreadas a lo largo de la SC. Los mayores niveles fueron observados en la estación SC 1 con un valor de 5,538 copias del transcrito/µg de ARN y las menores en SC 5 y SC 11 donde no se detectó un incremento en los niveles de expresión de CYP1A.

Con respecto a la PY, la expresión de CYP1A fue determinada en menor número de estaciones. Las estaciones con mayores niveles de expresión fueron la PY 6 y PY 8 con valores de 38,599 copias del transcrito/µg de ARN y 34,490 copias del transcrito/µg de ARN, respectivamente.

La expresión promedio de CYP1A en los peces colectados en la PY fue la más alta del estudio, a pesar de que un porcentaje menor de estaciones mostraron amplificaciones, los organismos con expresión más alta pertenecieron a esta zona, caso contrario con lo observado en la SC. Los resultados de este estudio generan información relevante sobre el estado de salud actual de la SC y establece la línea base ambiental de la PY.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACyT–SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM). Los autores agradecen al Instituto

Nacional de Pesca y a la Dirección General Adjunta de Investigación Pesquera en el Atlántico por la realización de la campaña oceanográfica "JCFINP/1706" realizada en la Sonda de Campeche.

6. Referencias

Albert, L. A. y Benítez, J. A. (2005). "Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros", en A. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (2005), *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición* (157-176). Campeche: Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche.

Brooks, J. (1990). Classic Petroleum Provinces, Geological Society Special Publication, 50, 1-8.

Celis-Hernández O, Rosales-Hoz L, Carranza-Edwards, A. (2013). Heavy metal enrichment in surface sediments from the SW Gulf of Mexico. Environ Monit Assess 185, 8891–8907.

Gao, K. (2013). "Basal and Pollutant-induced Expression of CYP1A, 1B and 1C isoforms in Fish : Implications for Biomonitoring" [en linea], disponible en http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A617132&dswid=5492

Gold-Bouchot, G., Rubio-Piña, J., Montero-Muñoz, J., Ramírez-Miss, N., Echeverría-García, A., y et al. (2017). Pollutants and biomarker responses in two reef fish species (Haemulon aurolineatum and Ocyurus chrysurus) in the Southern Gulf of Mexico. Mar Pollut Bull, 116:249–25.

Gravato, C. y Santos, M. (2002) Liver phase I and pase II enzymatic induction and genotoxic responses of ânaphthoflavone water-exposed sea bass. Ecotoxicol Environ Safety, 52, 62-68.

Haasch, M., Quardokus, E., Sutherland, L., Goodrich, M. y Lech, J. (1993). Hepatic CYP1A1 Induction in Rainbow Trout by Continuous Flowthrough Exposure to β-Naphthoflavone. Toxicological Sciences, 20(1), 72-82.

Higgins, L.G., Hayes, J.D. (2011). Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. Drug Metab Rev 43, 92–137.

Kim, RO., Kim, B.M., Hwang, D.S., Au, D.W.T., Jung, J.H., Shim, W.J., Leung, K.M.Y., Wu R.S.S., Rhee J.S., Lee, J.S. (2013). Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (CYP1A) gene in the marine medaka, Oryzias melastigma exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. Comp Biochem Physiol C 157, 172–182.

Kronn, F., Streten, C., Harries, S. (2017). A protocol for identifycation suitable biomarkers to asses fish health: A systematic review. Plos ONE 12(4): e0174762.

Ponce, G. y Botello, A. (2005). "Niveles de Hidrocarburos en el Golfo de México", en A. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (2005), *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición* (269-298). Campeche: Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche.

Puch-Hau, C., Quintanilla, M., Rubio-Piña, J., Del Río-García, M., y Zapata-Pérez, O. (2018). Partial mRNA Sequences of the Biomarkers CYP1A, GST, CAT, GR, SOD, GPx, VTG and p53 in Flatfish *Syacium gunteri* from Gulf of Mexico. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 100(6), 798-802.

Puch-Hau, C., Rivas-Reyes, I., Patiño-Suárez, V., y Zapata-Pérez, O. (2017). "Evaluación de la expresión de los biomarcadores moleculares CYP1A, GST, CAT y VTG, en peces bentónicos del sur del golfo de México", en M. Galar, P. Ramírez, E. Gasca, L. Gómez, J. Zavala, M. Arzate y et al., (2018), *Contribuciones al conocimiento de la Ecotoxicología y química ambiental en México* (101-122). Ciudad de Mexico: Instituto Politécnico Nacional.

Quintanilla-Mena, M.A., (2015). Expresión génica en los sistemas antioxidativo, endocrino, de desintoxicación y cambios epigenéticos en el lenguado arenoso (*Syacium gunteri*) colectados en el Golfo de México. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del instituto Politécnico Nacional.

Rendón-von Osten, J. (2005). "Uso de Biomarcadores en Ecosistemas Acuáticos", en A. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (2005), *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición* (121-140). Campeche: Centro EPOMEX. Universidad Autónoma de Campeche.

Stegeman, J. y Hahn, M. (1994). "Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species", en D. Malins y G. Ostrander. *Aquatic Toxicology-Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (87-206). Florida: CRC Press.

Uno, T., Ishizuka, M., Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. Environ Toxicol Pharmacol 34, 1–13.

UNESCO. (1976). *Guide to operational procedures for the IGOSS pilot project on marine pollution (petroleum) monitoring. Manuals and guides*. Paris: Hemmerté

Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13 (2), 57-149.

Vázquez-Botello, A., Ponce-Vélez, G. y Díaz-González, G. (1993). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH´ S) en áreas del Golfo de México. Hidrobiológica, 3(1-2), 1-14.

Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B. y Lafaurie, M. (1997). Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass Dicentrarchus labrax exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. Marine Environmental Research, 44(1), 1-11.

Williams, R. y Hubberstey, A. (2014). Benzo(a)pyrene exposure causes adaptive changes in p53 and CYP1A gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). Aquatic toxicology, 156C, 201–210.

Wirgin, I. y Waldman, J. (1998). Altered gene expression and genetic damage in North American fish populations. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 399(2), 193–219.

Yu, R., Shing-Ng, P., Tan, T., Ho, D., Sun, R., y Chong-Kong, R. (2008). Enhancement of hypoxia-induced gene expression in fish liver by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand, benzo[a]pyrene (BaP). Aquatic toxicology, 90(3), 235–42.

Zapata-Perez, O., Sanchez-Teyer, L., Perez-Nunez, M., Arroyo-Herrera, A., Quiroz-Moreno, A. y Albores-Medina, A. (2010). Response of CYP1A Gene expression in fish liver of catfish (*Ariopsis felis*) from Gulf of Mexico and their relationship with the genetic variability. Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances y environmental engineering, 45(1), 62–67.

Capítulo 10

CAMBIOS EPIGENÉTICOS POSIBLEMENTE ASOCIADOS CON LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES EN PECES DEL NOROESTE DEL GOLFO DE MÉXICO: NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN

Mercedes Quintanilla-Mena[1]

Isajav Rivas-Reyes[1]

Alejandra Cañizares-Martínez[1]

Victoria Patiño-Suárez[1]

Marcela del Río-García[1]

Carlos Puch-Hau[1*]

[1] Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Mérida, Departamento de Recursos del Mar, Laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular. Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Apdo. Postal 73-Cordemex, 97310 Mérida, Yucatán, México.

* cashi026@hotmail.com

Resumen

Los estudios epigenéticos en un contexto toxicológico, como el análisis de la metilación del ADN de organismos en medios contaminados, son de gran interés debido a que la respuesta a este nivel podría contribuir al entendimiento de procesos adaptativos o de desarrollo de enfermedades. Hoy en día el Noroeste del Golfo de México representa un importante papel para el futuro aprovechamiento de petróleo en aguas profundas. Sin embargo, la zona recibe aportes de xenobióticos provenientes del continente, por lo que el conocimiento del estado de salud actual de las poblaciones de peces que habitan en la zona, así como de su vulnerabilidad, es fundamental. En este trabajo se describen los patrones de metilación de 238 peces demersales provenientes del Noroeste del Golfo de México. Se empleó la técnica de ELISA para determinar los niveles de metilación global y se observó un patrón de hipometilación en el genoma de todas las especies colectadas. Dicho patrón podría estar relacionado con procesos adaptativos ante una constante exposición de substancias orgánicas e inorgánicas.

Palabras clave: epigenética, metilación del ADN, Golfo de México, contaminación.

1. Introducción

La epigenética representa implicaciones importantes dentro de un contexto toxicológico, ya que el estrés ambiental induce cambios conformacionales en el ADN de los organismos, los cuales pueden afectar al fenotipo de forma positiva (incremento de la resistencia al estrés) o negativa (inducción de enfermedades) (Vandegehuchte y Janssen, 2014). Por otro lado, también permite la transferencia estable de rasgos potencialmente heredables a generaciones futuras sin requerir algún tipo de mutación en el genoma. Las modificaciones en esta área (debido a cambios ambientales) y su influencia transgeneracional, brindan la plasticidad necesaria que permite a los organismos responder a dichos cambios para poder adaptarse a su entorno, sin embargo, también puede resultar en una baja aptitud y por lo tanto un deterioro poblacional (Hala et al., 2014) (Figura 1).

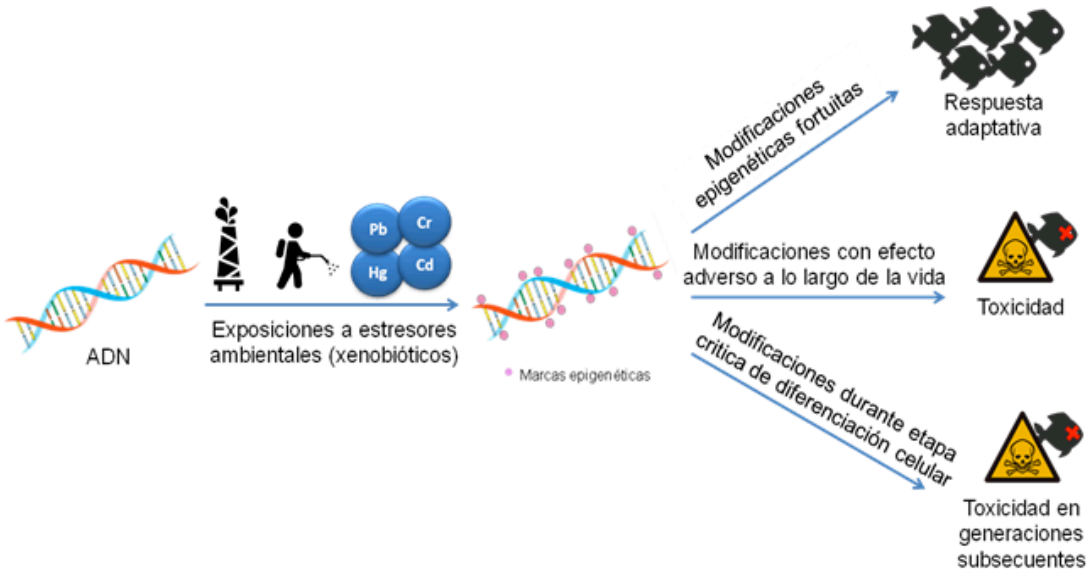


Figura 1. Posibles respuestas epigenéticas en peces ante ambientes contaminados. Modificado de Mirbahai y Chipman, 2014.

Hoy en día, se sabe que los cambios epigenéticos son influenciados por exposiciones químicas (Pilsner et al., 2010; Head, 2014) y se ha descrito que diversos contaminantes conllevan alteraciones de este tipo en organismos acuáticos. Por ejemplo, se han observado modificaciones en el patrón de metilación del ADN (marca epigenética) en varias especies de peces expuestas a substancias toxicas (Shugart, 1990; Aniagu et al., 2008; Wang et al., 2009; Mirbahai et al., 2011; Hala et al, 2014; Kamstra et al., 2014; Olsvik et al., 2014; Pierron et al., 2014).

1.1. Patrones de metilación global del ADN en organismos expuestos a contaminantes

La metilación del ADN representa un mecanismo epigenético el cual consiste en la adición o remoción de grupos metilo a nucleótidos de citosina, ocasionando cambios conformacionales en la molécula; lo anterior propicia cierta regulación en la expresión de genes. Al igual que otros factores epigenéticos, los patrones de metilación son susceptibles a presentar alteraciones durante y después de la exposición a diversos contaminantes de origen antropogénico como metales pesados, compuestos estrogénicos, plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), etc. Dichos cambios tienen la facultad de fijarse y persistir con la división celular aún en ausencia del estresor inicial. Cuando las alteraciones ocurren en líneas germinales, el nuevo patrón de metilación puede ser heredado y así causar serios problemas dentro de poblaciones naturales (Head, 2014).

Los efectos transgeneracionales que los contaminantes inducen en el epigenoma de poblaciones silvestres, representan un gran impacto en el campo de la ecotoxicología. Los estudios de estos cambios han empezado a ser de gran importancia para evaluar las alteraciones que se producen en la expresión génica de organismos con un distinto patrón de metilación a causa de la exposición a substancias toxicas (Aniagu et al., 2008; Mirbahai et al., 2011; Vandegehuchte y Janssen, 2011, 2014; Head, 2014; Lerebours et al., 2014).

Los cambios en el patrón de metilación tienen la propiedad de activar o inhibir la expresión de genes (Figura 2), causando alteraciones no solo en uno sino en varios genes involucrados en importantes funciones biológicas (Lerebours et al., 2014; Liu et al., 2014; Pierron et al., 2014). Así, aquellos genes que se encuentran altamente metilados (hipermetilación) tienden a ser silenciados y genes poco metilados (hipometilación) presentan actividad transcripcional (Pilsner et al., 2010; Mirbahai et al., 2011; Hala et al., 2014; Head, 2014; Vandegehuchte y Janssen, 2014), teniendo de este modo consecuencias en la salud de los organismos.

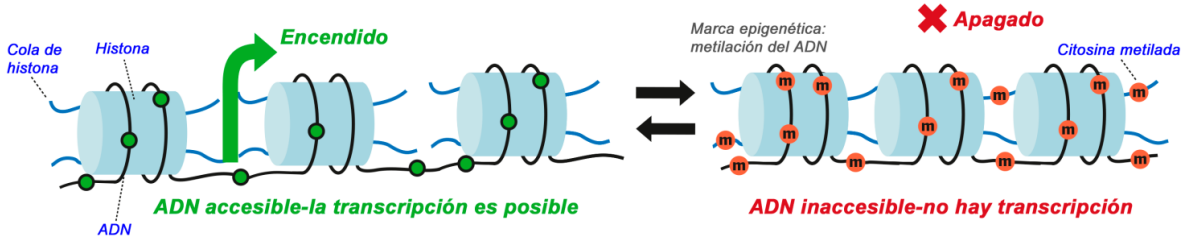


Figura 2. Metilación del ADN. Activación y silenciamiento de genes. Modificado de Biosciences for Farming in Africa 2017

Los organismos acuáticos que se encuentran en estado silvestre, como los peces, no solo están expuestos a un tipo de contaminante sino que sufren exposiciones crónicas a una mezcla de ellos; siguiendo con lo anterior, existe evidencia de que estos compuestos contribuyen a una hipometilación global en

peces (Wang et al., 2009; Mirbahai et al., 2011; Hala et al., 2014; Vandegehuchte y Janssen, 2014). Al respecto, se ha observado que dicho patrón está ligado a cambios de largo plazo en la estabilidad cromosomal, progresión de enfermedades como cáncer y disfunción reproductiva (Aniagu et al., 2008; Mirbahai et al., 2011; Teneng et al., 2011; Kenneth et al., 2013; Basu, Goodrich y Head, 2014), implicando así serios riesgos para las poblaciones y ecosistemas que se encuentran en medios contaminados.

1.2. Importancia y presión ambiental del noroeste del Golfo de México

El Golfo de México (GoM) es una zona económicamente activa y de gran importancia para México en cuanto a la producción y exploración de petróleo. Al respecto, el denominado Cinturón Plegado de Perdido (CPP) es una estructura de contracción tectónica de aguas profundas ubicada al Noroeste de la cuenca y que actualmente es considerado un foco de interés para dicha actividad. En la zona ya se han perforado algunos pozos exploratorios y se ha detectado un gran potencial para la extracción de petróleo ligero (25° a 29° API) y gas húmedo. Las perspectivas de producción a corto plazo contemplan la perforación de 16 pozos y la elaboración de tres centros de producción submarina, un sistema de producción flotante y una plataforma fija a 100 m de profundidad la cual bombee, a través de dos líneas de flujo, la producción hacia Matamoros, Tamaulipas (Gradmann et al., 2009; Martínez, 2015; Johnston, 2017; Secretaría de Energía, 2017).

A pesar de la gran derrama económica que representa la extracción de petróleo en nuestro país, esta actividad en conjunto con muchas otras como la industria y la agricultura (Celis-Hernández et al., 2013), propician la llegada de diversos compuestos tóxicos al medio marino, siendo su efecto poco conocido en las poblaciones expuestas. Si bien, en la zona aún no se extrae petróleo de manera constante, el proceso de exploración de pozos, el acarreo de substancias toxicas (metales pesados, plaguicidas, compuestos orgánicos, etc.) a través de ríos y la cercanía de aguas estadounidenses con una fuerte extracción de hidrocarburos, podrían estar infringiendo estrés por contaminación a las poblaciones silvestres que habitan la zona (Botello et al., 2005, 2015; Celis-Hernández et al., 2013; Martínez, 2015).

Es por lo anterior que los estudios en esta región son fundamentales para establecer una red de monitoreo ambiental que nos permita conocer el estado actual del CPP, previo a futuras actividades de extracción de recursos energéticos y así tener herramientas que contribuyan a entender, prevenir y mitigar posibles impactos a causa de las actividades antropogénicas.

2. Material y Métodos

2.1. Área de Estudio

El GoM es un cuerpo de agua que cuenta con un área aproximada de 1.6 millones de Km^2 con una máxima profundidad de alrededor de 4 km. Sus aguas bañan las costas de Estados Unidos, México y Cuba, recibiendo así descargas de ríos y aguas continentales provenientes de estos países. Sin embargo, el mayor volumen de agua que recibe es a través de la corriente del lazo, la cual transporta agua desde el océano Atlántico con un flujo de tres órdenes de magnitud mayor que el flujo del río Mississippi (Harris et al., 2012), de esta corriente se suelen desprender giros ciclónicos y anticiclónicos que son transportados principalmente hacia las costas de Estados Unidos y al Norte de México, causando un gran dinamismo a lo largo de estas costas (Elliott, 1982; Sturges y Leben, 2000).

Al Noroeste de esta cuenca se encuentra el CPP que como ya se mencionó, representa una zona económicamente atractiva para la extracción de hidrocarburos. Esta región alcanza profundidades de hasta 3.5 km y se encuentra a 100 km de Tamaulipas. En las costas de este estado desembocan ríos importantes como el Bravo, San Fernando y Soto la Marina, que en conjunto con la laguna Madre, aportan al medio marino diversos compuestos orgánicos e inorgánicos (Celis-Hernández et al., 2013; Botello et al., 2015).

2.2. Obtención de las muestras

Se realizaron cuatro cruceros oceanográficos dentro del área del CPP a bordo del buque Justo Sierra en un periodo de dos años durante las épocas de primavera y otoño del 2016 y 2017. Cada campaña oceanográfica fue identificada con el nombre de "Perdido" y fue numerada consecutivamente según el periodo en el que se realizo el crucero. Los primeros dos cruceros se llevaron a cabo en mayo (Perdido-1) y octubre (Perdido-2) del 2016, mientras que los demás se efectuaron en junio (Perdido-3) y septiembre (Perdido-4) del 2017. Durante los cruceros, se obtuvieron muestras de hígado de diversas especies de peces del Noroeste del Golfo de México (frente a las costas de Tamaulipas).

A lo largo de las campañas oceanográficas se establecieron 12 estaciones de muestreo (Figura 3). Estas estaciones fueron definidas por el Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) debido al interés que existe en la zona como futura área de extracción de hidrocarburos y como parte del proyecto "Implementación de redes de observación oceanográficas (físicas, geoquímicas, ecológicas) para la generación de escenarios ante posibles contingencias relacionadas a la exploración y producción de hidrocarburos en aguas profundas del Golfo de México".

En cada estación se colectaron peces planos utilizando una red camaronera de 20 m de largo, la cual se arrastró durante una milla náutica a dos nudos de velocidad, rodeando el punto de muestreo. Se obtuvo un total de 10 especies de peces y 238 organismos a lo largo de las cuatro campañas (Tabla 1). El tejido hepático disectado de cada pez fue preservado en tubos criogénicos de 2 ml (Corning®) y sumergidos en nitrógeno liquido (-120°C) para su posterior procesamiento en laboratorio (Zapata-Perez et al., 2010).

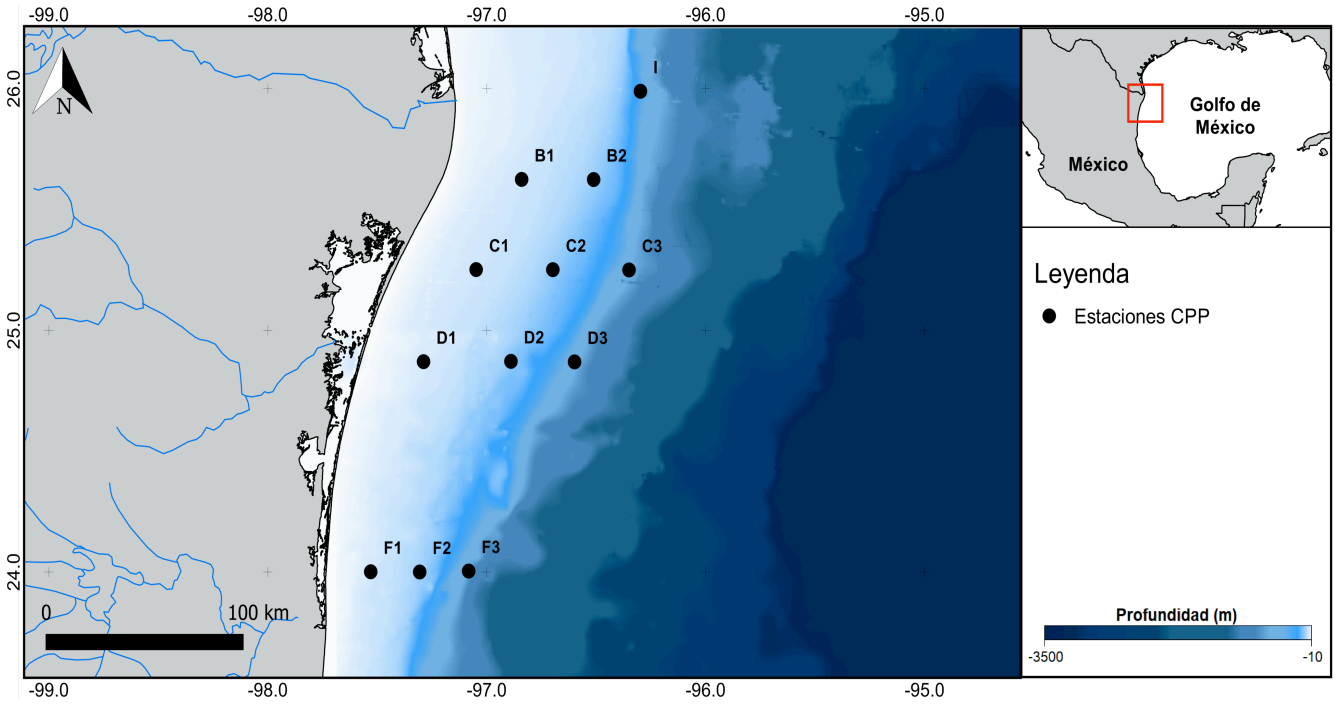


Figura 3. Mapa del área de estudio con las 12 estaciones de muestreo. Elaboración propia

Tabla 1. Información de colecta y especies obtenidas por estación durante los cuatro cruceros realizados en el noroeste del GoM. Elaboración propia

Estación	Longitud	Latitud	No. de peces	Profundidad (m)	Especies
B1	-96.84058	25.624517	31	50	*Cyclopsetta chittendeni* *Syacium gunteri*
B2	-96.51175	25.623883	22	94.8	*Trichopsetta ventralis*
C1	-97.04841	25.251433	32	46	*Cyclopsetta chittendeni* *Syacium gunteri*
C2	-96.69807	25.2511	25	103	*Cyclopsetta chittendeni* *Trichopsetta ventralis* *Anciclopsetta sp.*
C3	-96.35012	25.249833	10	509	*Dibranchus atlanticus* *Epigonus pandionis* *Merlucciues albidus* *Synagrops bellus*
D1	-97.28878	24.870383	30	45	*Cyclopsetta chittendeni* *Syacium gunteri* *Anciclopsetta sp.*
D2	-96.88958	24.871767	29	105	*Cyclopsetta chittendeni* *Anciclopsetta sp.* *Prionotus paralatus* *Trichopsetta ventralis*
D3	-96.59895	24.869517	5	475	*Epigonus pandionis* *Synagrops bellus*
F1	-97.52995	24.00125	27	43.8	*Cyclopsetta chittendeni* *Syacium gunteri* *Anciclopsetta sp.*
F2	-97.30633	24.000333	15	88.9	*Cyclopsetta chittendeni* *Trichopsetta ventralis*
F3	-97.0826	24.004217	7	500	*Epigonus pandionis*
I	-96.29788	25.989116	5	297	*Monolene sessilicauda*
Total	12		238		10

2.3. Extracción de ADN

Se maceraron 25 mg de tejido hepático con nitrógeno líquido (para facilitar la lisis celular) y se extrajo ADN por un método de columnas, utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), siguiendo el protocolo del manual técnico (DNeasy Blood & Tissue Handbook). Las purezas y concentraciones se midieron por espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se verificó la

integridad del ADN genómico por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.2% utilizando bromuro de etidio como reportero.

2.4. Porcentaje de metilación global de ADN

El porcentaje de metilación global de ADN para cada organismo fue obtenido por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en ingles). Esta técnica es sencilla y adecuada para su uso en organismos no modelo (como peces marinos) ya que provee de una descripción generalizada de los niveles de metilación, los cuales contribuyen a detectar cambios a gran escala como los que se presentan durante el desarrollo de enfermedades como cáncer (Metzger y Schulte, 2016). Este ensayo se realizó utilizando el kit 5-mC ELISA (ZYMO RESEARCH CORP), siguiendo el protocolo del manual técnico. En cada placa corrida se incluyó una curva estándar y cada muestra de ADN fue puesta por duplicado. Los resultados fueron medidos por un lector de placas para ELISA (Thermo Scientific Multiskan FC) a 405 nm. A las absorbancias obtenidas se les resto el blanco y se extrapolaron a la curva estándar de porcentajes conocidos (incluida en el kit), la cual presenta una relación logarítmica con una correlación de 0.99 (Figura 4). El cálculo del porcentaje de 5-mC (5´-metilcitosina) para cada una de las muestras, fue obtenido a través de la siguiente fórmula:

$$\%5\text{-mC} = e^{\left\{\frac{\text{absorbancia-intercepto de Y}}{\text{Pendiente}}\right\}}$$

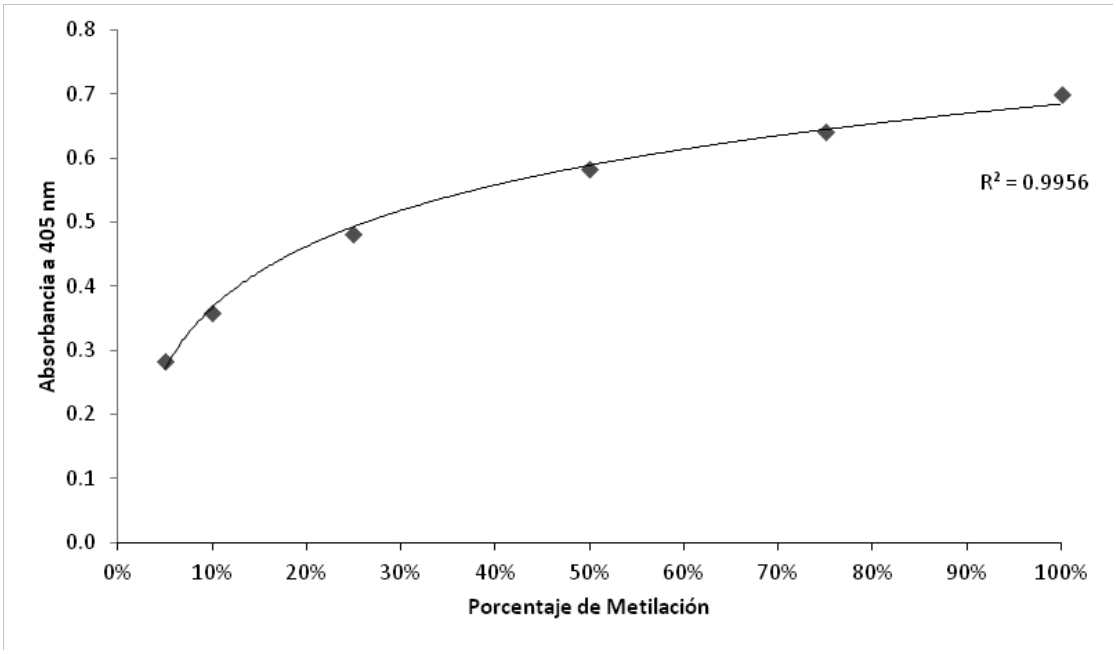


Figura 4. Curva estándar generada a partir de los estándares incluidos en el Kit. Se observa una relación logarítmica con una correlación de 0.99. Elaboración propia

2.5. Análisis Estadísticos

Una vez obtenidos los datos de metilación global de ADN, se realizaron cálculos y gráficos descriptivos para conocer el comportamiento de los mismos. De igual modo, se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis (prueba por rangos) para determinar la variabilidad existente del porcentaje de metilación a lo largo de la zona. Estos cálculos fueron realizados de manera temporal (entre cruceros), espacial (entre estaciones) y entre las especies. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo a través del software estadístico InfoStat versión estudiantil (2015e) y los gráficos fueron construidos a partir de GraphPad Prism (6.01).

3. Resultados

3.1. Comportamiento de la Metilación global de ADN en peces del noroeste del GoM

Se analizó el comportamiento de la metilación global del ADN de manera general en el área del CPP para los cuatro cruceros realizados. Estos se llevaron a cabo en primavera y otoño durante dos años consecutivos y se colectaron entre 40-70 peces por campaña (Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticos de resumen para los niveles de metilación global de ADN en cada campaña oceanográfica realizada en el noroeste del GoM. Elaboración propia.

Crucero	Época	n	Mediana	P(25)	P(50)	P(75)
Perdido-1	Primavera	42	1.39	1.29	1.38	1.54
Perdido-2	Otoño	76	1.27	1.04	1.26	1.39
Perdido-3	Primavera	59	1.25	1.14	1.25	1.4
Perdido-4	Otoño	61	1.06	0.95	1.06	1.42

n: número de organismos; P: percentiles.

Se detectaron niveles muy bajos de metilación (hipometilación) en la zona de muestreo ($\bar{y}$=1.29%; $\tilde{y}$=1.27%) (Tabla 2), siendo la campaña de Perdido-4 la de menores rangos (H=30, *p<0.0001*) (Figura 5a). Por otro lado, analizando los datos de manera temporal, se detecto que los niveles de metilación eran significativamente menores en las campañas realizadas en otoño (H=18.95, *p<0.0001*).

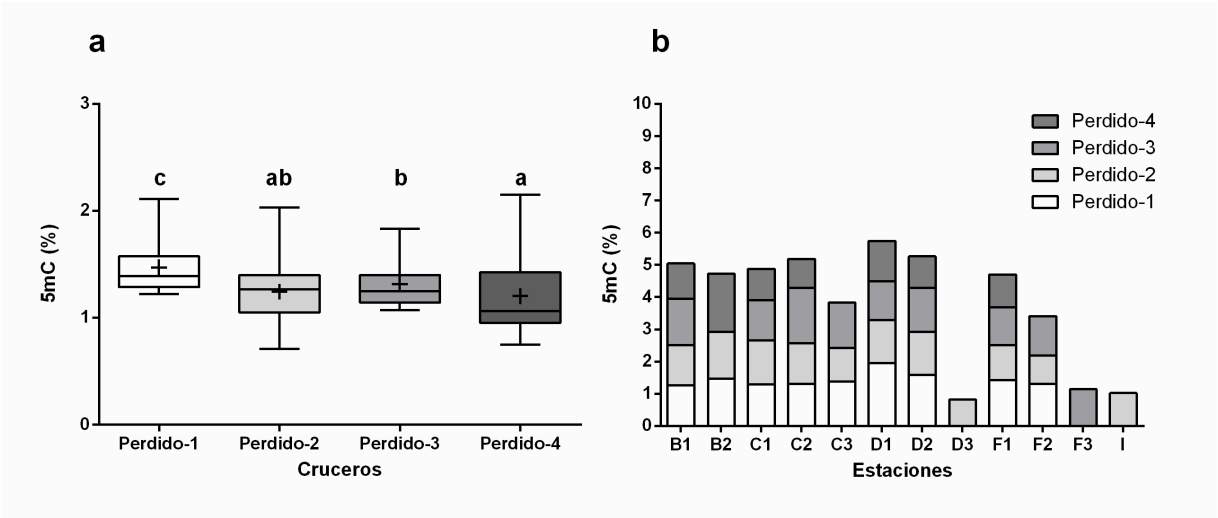


Figura 5. Porcentajes de metilación global del ADN observados en el noroeste del GoM. a) Comparación de los niveles de metilación en cada campaña. La cruz: representa la media, la raya: la mediana y las barras de error: los máximos y mínimos.; b) gráfico de barras acumuladas con niveles medianos de metilación por estación para cada Perdido. Elaboración propia.

A pesar de los bajos niveles detectados en toda la zona, se observa variación en el comportamiento de la metilación a lo largo de las estaciones analizadas para Perdido-2, Perdido-3 y Perdido-4 (Figura 5b). En Perdido-1, a pesar de no detectar evidencia estadísticamente significativa en cuanto dicho comportamiento (H=9.8, *p=0.2785*), se aprecia que la estación D1 tiene niveles mayores de metilación en comparación con las demás estaciones (Figura 5b). Para Perdido-2 y Perdido-4, es la estación B2 la que presenta los mayores niveles (H=31.19, *p=0.0005*; H=35.31, *p<0.0001* respectivamente), mientras que en Perdido-3 la estación D2 muestra los rangos más altos (H=17.64, *p=0.0235*).

Es interesante observar que en los cruceros realizados en otoño, los porcentajes más altos de metilación se encontraron en la parte norte del área de estudio, mientras que para las campañas realizadas en primavera se encontraron estaciones con mayores rangos en la parte media de la zona, cercanas de la Laguna Madre.

Por otro lado, se analizó el comportamiento general de la zona a lo largo de las estaciones durante los dos años de colecta y se observó que en la estación D3 se encuentran organismos con niveles de metilación muy por debajo de lo observado en las demás estaciones, mientras que la estación B2 de nuevo resalta con los mayores rangos de metilación para toda la zona (H=42.96, *p<0.0001*) (Figura 6).

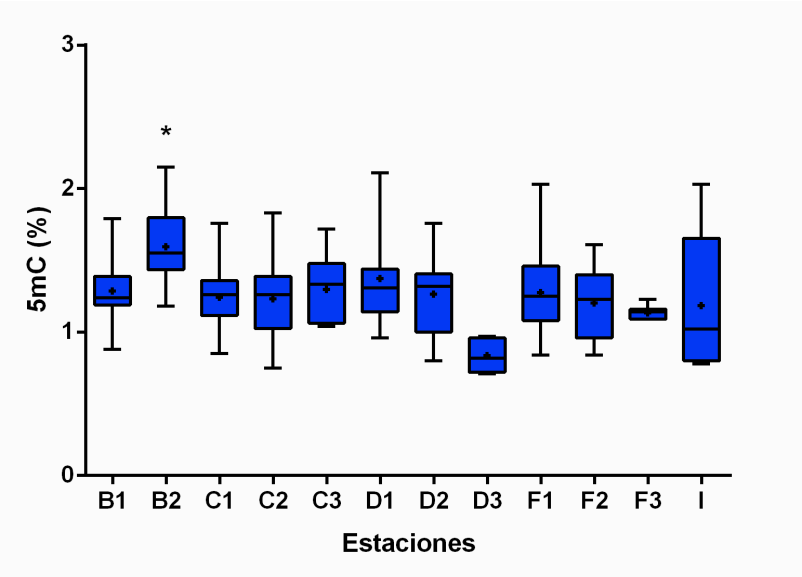


Figura 6. Niveles de metilación del ADN característicos de la zona de Perdido; la cruz: representa la media, la raya: la mediana y las barras de error: los máximos y mínimos. El asterisco denota diferencias significativas. Elaboración propia.

El comportamiento de la variable en peces que habitan el CPP aparenta ser relativamente homogéneo y con niveles bajos de metilación. Sin embargo, se observan variaciones importantes al norte y al centro del área de estudio (Figura 7). Al respecto, los transectos en los que se observó dicha variabilidad son el B y D (Figura 7).

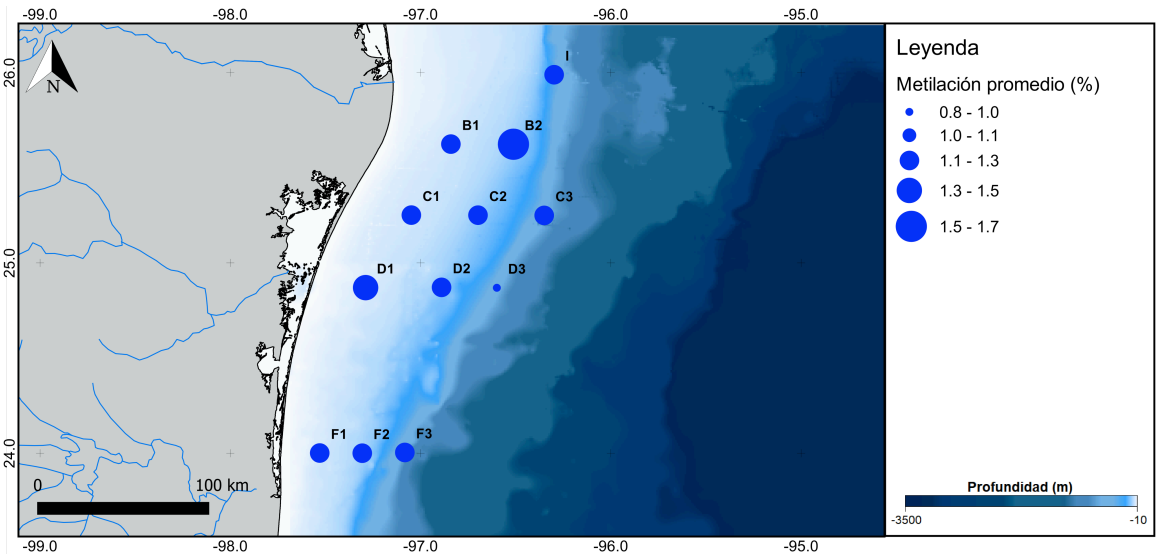


Figura 7. Variación de la metilación en el área de Perdido durante dos años de colecta. Elaboración propia.

3.2. Variación interespecífica del porcentaje de metilación global del ADN en peces del Noroeste del Golfo de México

El análisis de los datos a lo largo de las estaciones, nos permite observar el comportamiento general de la variable en la zona evaluada. Dicho patrón podría verse afectado debido al estrés causado por la exposición a diversas substancias tóxicas presentes en el medio marino. A pesar de que lo anterior proporciona información valiosa para fines de monitoreo ambiental, es importante recordar que se obtuvo más de una especie (Tabla 1) y cada una de ellas puede responder de formas distintas ante el estrés ambiental, siendo más susceptible una especie en comparación con otras. Basándose en dicha premisa, se procedió a realizar un análisis examinando el comportamiento general de cada especie en el Noroeste del Golfo de México.

En total se colectaron diez especies de peces en la zona del CPP; las dos más abundantes fueron lenguados de la familia Paralichthyidae (*C. chittendeni y T. ventralis*) (Tabla 3). Cabe resaltar que todas las especies analizadas presentan hábitos bentónicos, es decir, están en constante contacto con los sedimentos del fondo marino (demersales).

Tabla 3. Especies, profundidades y estadísticos de resumen de los niveles de metilación del ADN de los peces colectados en el CPP. Elaboración propia.

Especies	Prof. (m)	n	Mediana	P(25)	P(50)	P(75)
Anciclopsetta sp.	50-100	6	0.97	0.93	0.96	1.14
Cyclopsetta chittendeni	50-100	101	1.23	1.09	1.23	1.33
Dibranchus atlanticus	509	1	1.38	-	-	-
Epigonus pandionis	500	15	1.07	0.95	1.07	1.14
Merluccius albidus	509	4	1.49	1.33	1.47	1.5
Monolene sessilicauda	297	5	1.02	0.82	1.02	1.28
Prionotus paralatus	100	10	1.34	1.23	1.32	1.55
Syacium gunteri	50	28	1.54	1.41	1.53	1.72
Synagrops bellus	500	2	1.16	0.97	0.97	1.34
Trichopsetta ventralis	100	66	1.37	1.2	1.37	1.56

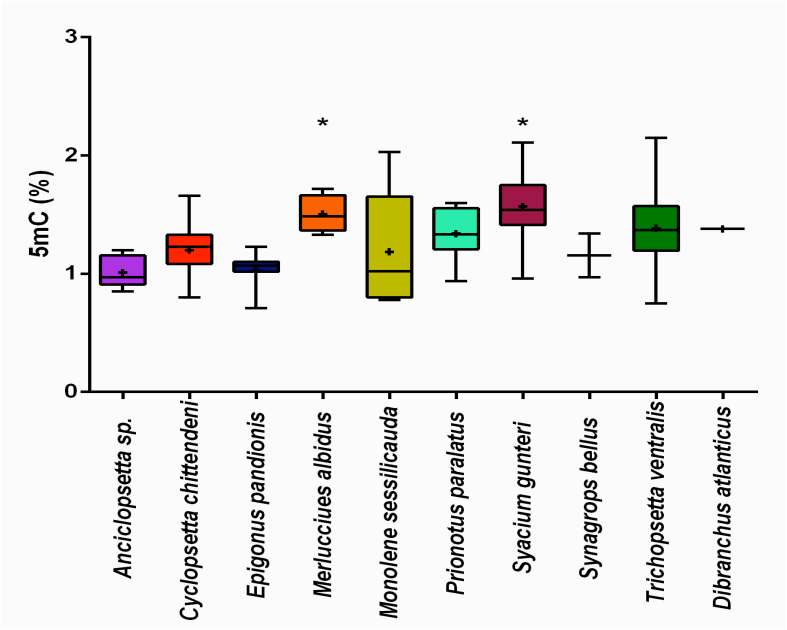


Figura 8. Porcentaje de metilación global del ADN encontrado en las diez especies de peces procedentes del noroeste del Golfo de México. La cruz: representa la media, la raya: la mediana y las barras de error: los máximos y mínimos. Los asteriscos denotan diferencias significativas. Elaboración propia.

El comportamiento por rangos de la metilación del ADN entre las especies presentó diferencias significativas (H=74.01, *p<0.0001*). Al respecto se observa que las especies con rangos de metilación más elevados fueron *S. gunteri* y *M. albidus*, comparadas con las demás, mientras que los menores niveles se observaron en *Anciclopsetta sp.* y *E. pandionis* (Figura 8).

Siguiendo con el análisis por especie, el nivel más bajo de metilación detectado en todo el estudio (0.71%) fue observado en un individuo de *E. pandionis* en la estación D3, mientras que el mayor porcentaje de metilación detectado (2.15%) fue para *T. ventralis* en la estación B2 (Figura 9). La estación D3 llama la atención al presentar los niveles más bajos de metilación de toda la zona para *E. pandionis* y *S. bellus*, mientras que en otras estaciones en donde se capturaron las mismas especies (C3 y F3) se observa un porcentaje de metilación mayor (Figura 9).

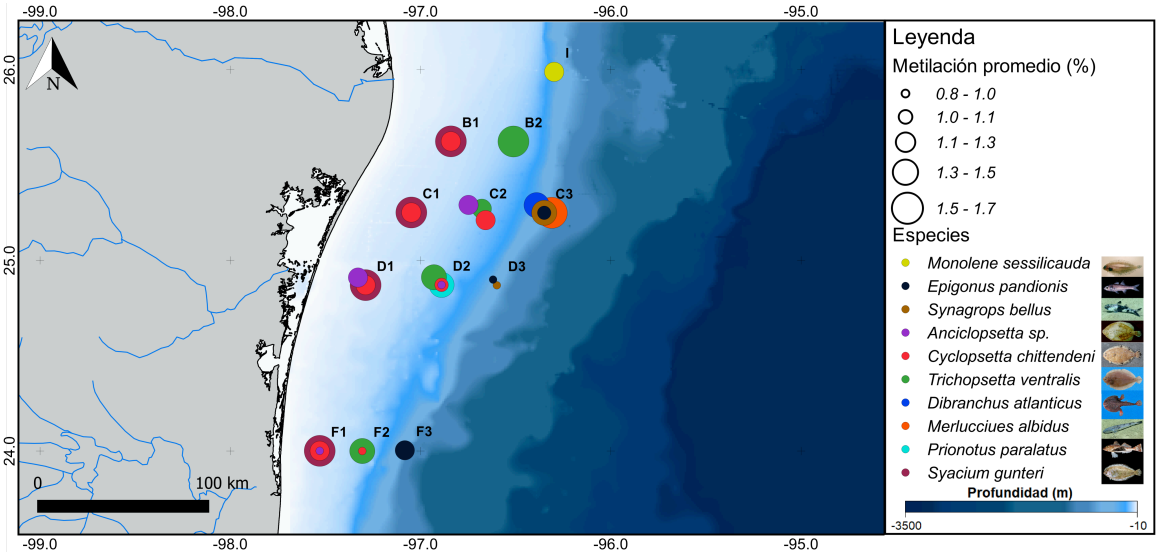


Figura 9. Porcentajes de metilación del ADN por especie a lo largo del CPP. Elaboración propia.

De todas las especies capturadas, tres cuentan con una amplia distribución en la zona (*S. gunteri*, *C. chittendeni y T. ventralis*). De estas, *S. gunteri* presentó los mayores porcentajes de metilación en las estaciones B1, C1, D1 y F1, las cuales se encuentran cercanas a la costa (Figura 9). Dentro de un panorama general, podemos observar que el patrón de metilación de cada especie varía de estación a estación, excepto en *S. gunteri*, en donde su comportamiento es más homogéneo. En el caso de *C. chittendeni* observamos un gradiente de la variable con tendencia a presentar menores rangos de metilación conforme se avanza mar adentro. Por otro lado, *T. ventralis* se encontró en aguas un poco más profundas (~100 m) y retiradas de la línea de costa; en esta especie se observaron mayores niveles en la estación B2 con cierta disminución en los puntos subsecuentes (Figura 9).

4. Discusión

Bajo condiciones normales, en peces se ha reportado que los porcentajes de metilación global se encuentran dentro de un rango del ~7% a 9%. Los valores aquí obtenidos ($\bar{y}$=1.29%, máx.=2.15%, min.=0.71%) suponen que los organismos analizados están presentando hipometilación en su genoma al observarse niveles muy por debajo de los registrados normalmente en peces (Shugart, 1990; Jabbari y Bernardi, 2004; Aniagu et al., 2008; Mirbahai et al., 2011; Potok et al., 2013; Kamstra et al., 2014).

Muchos contaminantes de origen antropogénico han mostrado efectos adversos en el patrón de metilación del ADN de mamíferos, aves, peces y algunos invertebrados acuáticos (Pilsner et al., 2010; Mirbahai et al., 2011; Basu et al., 2013; Basu et al., 2014; Hala et al., 2014; Head, 2014; Vandegehuchte y Janssen, 2014). Estudios experimentales realizados en peces demuestran que la exposición a ciertos compuestos orgánicos, como el benzo(a)pireno, causan niveles bajos de metilación global (≤4%) en el ADN de organismos expuestos (Shugart, 1990; Fang et al., 2013). De igual modo, se ha observado un comportamiento de hipometilación asociado a tumores hepáticos en peces provenientes de ambientes contaminados (Mirbahai et al., 2011).

Teniendo en mente lo anterior, muchas de las actividades económicas desarrolladas en el país suelen aportar al medio marino diversos compuestos tóxicos que alteran al ecosistema y causan estragos en la salud de no solo los organismos silvestres, sino también de las poblaciones humanas (Celis-Hernández et al., 2013; Martínez, 2015; Johnston, 2017). En el área de estudio ya se han detectado concentraciones importantes tanto de HAPs (ΣHAPs >0.40 µg/g: Antraceno, Fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Piereno, Benzo(a)pierno entre otros) como de metales pesados (>50 µg/g: Cr, Ni, V) en sedimentos (Botello et al., 2005, 2015; Celis-Hernández et al., 2013). Por lo que el comportamiento de la variable observado en este trabajo podría sugerir que los organismos de la zona están siendo afectados por la exposición a diversos xenobióticos.

Por otro lado, las condiciones ambientales pueden estar sujetas a diversas variables temporales y espaciales, las cuales propicien en mayor o menor medida la exposición a compuestos tóxicos. Así, la variación particular observada en cada crucero podría estar determinada por el gran dinamismo de la zona en cuanto a corrientes geostróficas (Botello et al., 2015), además, el aporte de contaminantes a través de las escorrentías y desembocaduras de ríos varía según las precipitaciones.

Lo anterior podría influenciar en el nivel de estrés por contaminación que presentan los organismos en un determinando momento. Al respecto, las condiciones de corrientes y precipitaciones para los Perdidos -2, -3 y -4 fueron muy similares ya que se observaron lluvias abundantes en Veracruz y un patrón de corrientes predominantemente de sur a norte. Veracruz es un estado con fuerte actividad industrial, petrolera y agrícola (Celis-Hernández et al., 2013); por lo que los anteriores procesos naturales propiciarían el acarreo de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos del sur del GoM al CPP, explicando así los bajos niveles de metilación para estos cruceros en comparación con Perdido -1.

De todos los cruceros realizados, P4 fue en donde se observaron los menores rangos de metilación; durante el mes que se realizó esta campaña se detectaron precipitaciones intensas a lo largo de toda la costa Este de México, significativamente mayores a lo observado en Perdido -2 y Perdido -3 (Servicio Meteorológico Nacional, 2018), lo que pudo haber ocasionado un importante

aporte de aguas provenientes de ríos y por lo tanto un mayor estrés ambiental por contaminación que representa un fuerte impacto a nivel epigenético.

Para el caso de Perdido 1, en donde se presentan los mayores rangos de metilación, el patrón de precipitaron y corrientes fue distinto a lo observado en los otros cruceros (Servicio Meteorológico Nacional, 2018; CoastWatch Caribb-NOAA AOML, 2018), en este se registraron precipitaciones de moderadas a fuertes en Tamaulipas, bajas en Veracruz y presencia de anillos tanto ciclónicos como anticiclónicos en la zona de estudio. Lo anterior destaca la posibilidad de una menor exposición a contaminantes provenientes del continente y posiblemente una mayor influencia de substancias transportadas por las corrientes; como consecuencia, lo anterior se ve reflejado en una respuesta epigenética distinta a lo observado en las demás campañas.

Pese a lo anterior y analizando la zona en su conjunto, se observa un comportamiento relativamente homogéneo de la metilación en el noroeste del GoM, sin embargo, en la estación D3 el comportamiento se muestra atípico debido a la detección de niveles de metilación extremadamente bajos. Posiblemente dicha estación este experimentando la presencia de compuestos que afecten en mayor medida al patrón global de metilación de todo el genoma (metiloma) de los peces que habitan la zona, sin embargo se requiere de análisis más específicos para corroborar lo anterior.

Por otro lado, cada especie colectada podría estar respondiendo de forma particular a la presencia de xenobióticos, teniendo como resultado unas especies más vulnerables que otras. Por ejemplo, en este trabajo se detectaron tres especies de lenguados con un rango de distribución amplio y compartido (*S. gunteri*, *C. chittendeni y T. ventralis*), haciéndolas candidatas para el monitoreo ambiental en la zona, sin embargo, el comportamiento de cada una varia y puede deberse a la vulnerabilidad que presenta cada especie.

Al respecto, en este trabajo como en otros estudios, ya se han detectado niveles de metilación del ADN más elevados en S. gunteri que en C. chittendeni dentro del GoM (Quintanilla-Mena et al., 2018). Lo anterior sugiere que esta última presenta una mayor susceptibilidad, que junto con su amplia distribución en la zona y constante contacto con sedimentos marinos, podrían hacer de esta una posible especie indicadora para la evaluación del estado de salud de los ecosistemas del Golfo.

Bajo este contexto, si observamos el comportamiento de C. chittendeni, se pueden apreciar menores porcentajes de metilación en estaciones que se encuentran al sur y lejos de las costas. Debido al patrón de corrientes predominantemente detectado, la zona podría estar experimentando aportes de masas de agua provenientes del sur del GoM, por lo que substancias como hidrocarburos y otros xenobióticos podrían estar llegando principalmente al sur del CPP. Como ya se ha mencionado, la exposición a HAPs en peces suele provocar una hipometilación global del ADN, la cual ha sido ligada a enfermedades como

disfunción reproductiva y cáncer (Shugart, 1990; Mirbahai et al., 2011; Fang et al., 2013; Head, 2014; Kamstra et al., 2014; Vandegehuchte y Janssen, 2014).

El comportamiento de la metilación en las especies colectadas cerca de la línea de costa se presenta más estable y con mayores niveles. En dicha zona se han reportado altas concentraciones de metates pesados como níquel y cromo. El origen de estos metales se ha atribuido a aportes locales debido al desarrollo industrial que se lleva a cabo en el estado de Tamaulipas (Ponce-Vélez, Botello y Díaz-González, 2006; Celis-Hernández et al., 2013; Botello et al., 2015)

Diversos estudios han evaluado el efecto que tienen los metales pesados sobre la metilación del ADN y han encontrado que las exposiciones a algunos metales como el arsénico, níquel, cromo y cadmio suelen ocasionar una hipermetilación (mayor contenido de grupos metilo en el ADN) en regiones promotoras de ciertos genes, es decir, ocurre una hipermetilación de manera gen específica. Sin embrago, algunos metales como el arsénico (exposiciones crónicas), el cadmio (exposiciones cortas) y el plomo, también pueden producir una hipometilación global en el ADN.

Siguiendo con lo anterior, es posible que en las estaciones B1, B2, C1, D1 y F1 se encuentren influenciadas por la presencia de los metales antes mencionados, ocasionando un ligero incremento en la metilación debido a una posible hipermetilación de genes específicos, sin embargo se necesitan de más estudios para corroborar lo anterior.

Si bien es cierto que los niveles de metilación se comportan de forma distinta, ya sea a lo largo de las estaciones o desde el punto de vista por especies, en general la mayoría de los organismos presentan patrones bajos de metilación (Kamstra et al., 2014). Hay que tener en mente que las marcas epigenéticas pueden tener un enfoque transgeneracional, es decir, cabe la posibilidad de que las evidencias de hipometilación que se están presentando en las poblaciones del golfo, se deba principalmente al trasfondo histórico de la contaminación en esta cuenca y no necesariamente a eventos de exposiciones recientes.

Algunos estudios realizados en diversas especies se han enfocado en los cambios del metiloma que podrían estar asociados a contaminantes en el medio (Yauk et al., 2008; Pilsner et al., 2010; Mirbahai et al., 2011; Kille et al., 2013; Head, 2014; Lerebours et al., 2014). Dichos estudios concuerdan que los contaminantes ambientales interfieren con el patrón de metilación del ADN en poblaciones naturales. Existe la hipótesis de que estos cambios no siempre culminan en daños irreparables; en peces suele ocurrir una hipometilación, lo que ha llevado a sugerir que la perdida de metilación en el genoma podría permitir la plasticidad fenotípica a través del transcriptoma (activación de genes). Es decir, en un contexto toxicológico dicha perdida puede verse ligada al potencial adaptativo frente a un estrés por contaminantes químicos (Vandegehuchte y Janssen, 2014).

5. Conclusiones

Las poblaciones de peces al Noroeste del GoM presentan hipometilación en su genoma, probablemente a causa de aportes constantes de xenobióticos que recibe la cuenca y que son principalmente acarreados por los ríos.

Las respuestas a nivel epigenético varían a lo largo de las estaciones y entre las especies, lo que da indicios sobre los tipos de contaminantes que pueden encontrarse dentro del área estudiada y sobre la susceptibilidad de los organismos ante posibles impactos ecológicos.

Los cambios en el metiloma de organismos presentes en áreas contaminadas, podrían contribuir al entendimiento de las respuestas adaptativas que les confiere la habilidad de sobrevivir y persistir en estas zonas.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACyT–SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

6. Referencias

Aniagu, S. O.; Williams, T. D.; Allen, Y.; Katsiadaki, I.; Chipman, J. K. (2008) Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (Gasterosteus aculeatus) after exposure to hexabromocyclododecane and 17-β oestradiol, *Environment International*, 34(3), 310–317. doi: 10.1016/j.envint.2007.03.009.

Basu, N.; Goodrich, J. M.; Head, J. (2014) Ecogenetics of mercury: From genetic polymorphisms and epigenetics to risk assessment and decision-making, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1248–1258. doi: 10.1002/etc.2375.

Basu, N.; Head, J.; Nam, D.H.; Pilsner, J. R.; Carvan, M. J.; Chan, H. M.; Goetz, F. W.; Murphy, C.; Rouvinen-Watt, K.; Scheuhammer, A. M. (2013) Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken and yellow perch., *Comparative biochemistry and physiology, Part C*. Elsevier Inc., 157(3), 322–327. doi: 10.1016/j.cbpc.2013.02.004.

Biosciences for farming in Africa (2017). "Epigenetics" [en línea], disponible en http://b4fa.org/topical-issues/epigenetics/

Botello, A. V.; Rendón von Osten, J.; Gold-Bouchot, G.; Agraz-Hernández, C. (2005) *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. 2da ed. . Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología.

Botello, A. V.; Soto, L. a.; Ponce-Vélez, G.; Villanueva F., S. (2015) Baseline for PAHs and metals in NW Gulf of Mexico related to the Deepwater Horizon oil spill, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 156, 124–133. doi: 10.1016/j.ecss.2014.11.010.

Celis-Hernández, O.; Rosales-Hoz, L.; Carranza-Edwards, A. (2013) Heavy metal enrichment in surface sediments from the SW Gulf of Mexico, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(11), 8891–8907. doi: 10.1007/s10661-013-3222-3.

CoastWatch Caribb-NOAA AOML (2018). "OceanViewer" [en línea] disponible en http://cwcgom.aoml.noaa.gov/cgom/OceanViewer/

Elliott, B. a. (1982) Anticyclonic Rings in the Gulf of Mexico, *Journal of Physical Oceanography*, 1292–1309. doi: 10.1175/1520-0485(1982)012<1292:ARITGO>2.0.CO;2.

Fang, X.; Thornton, C.; Scheffler, B. E.; Willett, K. L. (2013) Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier B.V., 36(1), 40–50. doi: 10.1016/j.etap.2013.02.014.

Gradmann, S.; Beaumont, C.; Albertz, M. (2009) Factors controlling the evolution of the Perdido Fold Belt, northwestern Gulf of Mexico, determined from numerical models, *Tectonics*, 28(2), 1–28. doi: 10.1029/2008TC002326.

Hala, D.; Huggett, D. B.; Burggren, W. W. (2014) Environmental stressors and the epigenome, *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier Ltd, 12, e3–e8.

doi: 10.1016/j.ddtec.2012.05.004.

Harris, R.; Pollman, C.; Landing, W.; Evans, D.; Axelrad, D.; Hutchinson, D.; Morey, S. L.; Rumbold, D.; Dukhovskoy, D.; Adams, D. H.; Vijayaraghavan, K.; Holmes, C.; Atkinson, R. D.; Myers, T.; Sunderland, E. (2012) Mercury in the Gulf of Mexico: sources to receptors., *Environmental research*. Elsevier, 119, 42–52. doi: 10.1016/j.envres.2012.08.001.

Head, J. A. (2014) Patterns of DNA methylation in animals: an ecotoxicological perspective., *Integrative and comparative biology*, 54(1), 77–86. doi: 10.1093/icb/icu025.

Jabbari, K.; Bernardi, G. (2004) Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies, *Gene*, 333(SUPPL.), 143–149. doi: 10.1016/j.gene.2004.02.043.

Johnston, D. (2017) Mexico's licensing-Round 1 Phase 4, *Journal of World Energy Law and Business*, 10(4), 367–373. doi: 10.1093/jwelb/jwx015.

Kamstra, J. H.; Aleström, P.; Kooter, J. M.; Legler, J. (2014) Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology, *Environmental science and pollution research international*, 22(21), 16262–16276. doi: 10.1007/s11356-014-3466-7.

Kenneth, R. S.; Teneng, I.; Montoya-Durango, D. E.; Bojang, P.; Haeberle, M. T.; Ramos, I. N.; Stribinskis, V.; Kalbfleisch, T. (2013) "The Intersection of Genetics and Epigenetics: Reactivation of Mammalian LINE-1 Retrotransposons by Environmental Injury", en *Environmental Epigenomics in Health and Disease*, (127–160). Berlin Heidelberg: Springer doi: 10.1007/978-3-642-23380-7.

Kille, P.; Andre, J.; Anderson, C.; Ang, H. N.; Bruford, M. W.; Bundy, J. G.; Donnelly, R.; Hodson, M. E.; Juma, G.; Lahive, E.; Morgan, a. J.; Stürzenbaum, S. R.; Spurgeon, D. J. (2013) DNA sequence variation and methylation in an arsenic tolerant earthworm population, *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, 57, 524–

532. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.10.014.

Lerebours, A.; Stentiford, G. D.; Lyons, B. P.; Bignell, J. P.; Derocles, A. P.; Rotchell, J. M. (2014) Genetic Alterations and Cancer Formation in a European Flat fi sh at Sites of Different Contaminant Burdens, *Environmental science & technology*, 48, 10448–10455.

Liu, Y.; Yuan, C.; Chen, S.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Gao, J.; Wang, Z. (2014) Global and cyp19a1a gene specific DNA methylation in gonads of adult rare minnow Gobiocypris rarus under bisphenol A exposure, *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., 156, 10–16. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.07.017.

Martínez, R. (2015) Mexico opens its deepwater frontiers to new exploration, *Offshore Magazine*, p. 3.

Metzger, D. C. H.; Schulte, P. M. (2016) Epigenomics in marine fishes, *Marine Genomics*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.margen.2016.01.004.

Mirbahai, L.; Chipman, J. K. (2014) Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Elsevier B.V., 764–765, 10–17. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.10.003.

Mirbahai, L.; Yin, G.; Bignell, J. P.; Li, N.; Williams, T. D.; Chipman, J. K. (2011) DNA methylation in liver tumorigenesis in fish from the environment, *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 6(11), 1319–33. doi: 10.4161/epi.6.11.17890.

Olsvik, P. A; Williams, T. D.; Tung, H.; Mirbahai, L.; Sanden, M.; Skjaerven, K. H.; Ellingsen, S. (2014) Impacts of TCDD and MeHg on DNA methylation in zebrafish (Danio rerio) across two generations., *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. Elsevier Inc., 165, 17–27. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.05.004.

Pierron, F.; Baillon, L., Sow, M.; Gotreau, S.; Gonzalez, P. (2014) Effect of Low-Dose Cadmium Exposure on DNA Methylation in the Endangered European Eel, *Environmental science & technology*, 48, 797–803.

Pilsner, J. R.; Lazarus, A. L.; Nam, D.-H.; Letcher, R. J.; Sonne, C.; Dietz, R.; Basu, N. (2010) Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUminometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife., *Molecular ecology*, 19(2), 307–14. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04452.x.

Ponce-Vélez, G.; Botello, A. V; Díaz-González, G. (2006) Organic and inorganic pollutants in marine sediments from northern and southern continental shelf of the Gulf of Mexico, *Int. J. Environment and Pollution*, 295–311. doi: 10.1504/IJEP.2006.009113.

Potok, M. E.; Nix, D. A.; Parnell, T. J.; Cairns, B. R. (2013) Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern, *Cell*. Elsevier Inc., 153(4), 759–772. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.030.

Quintanilla-Mena, M. A.; Gonzalez-Garza, B. I.; Perez-Menendez, A. I.; Zapata-Perez, O. (2018) "Principios epigenéticos en un contexto ecotoxicológico: niveles de metilación global en adn de peces lenguados (familia: paralichthyidae) procedentes del sur del golfo de méxico", en *Contribuciones al Conocimiento de la Ecotoxicología y Química Ambiental Volumen 2 en México*, 123–146.

Secretaría de Energía (2017) "Ronda 2. Aguas Profundas Cuarta Convocatoria. Licitación CNH-R02-L04/2017 Contratos de Licencia para la Exploración y Extracción de Hidrocarburos" [en línea] disponible en http://rondasmexico.gob.mx/r2-l04-bloques/

Servicio Meteorológico Nacional (2018). "Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia" [en línea] disponible en https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias

Shugart, L. R. (1990) 5-Methyl deoxycytidine content of DNA from bluegill sunfish (Lepomis macrochirus) exposed to benzo[a]pyrene, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(2), 205–208. doi: 10.1002/etc.5620090210.

Sturges, W.; Leben, R. (2000) Frequency of Ring Separations from the Loop Current in the Gulf of Mexico: A Revised Estimate, *Journal of Physical Oceanography*, 30(7), 1814–1819. doi: 10.1175/1520-0485(2000)030<1814:FORSFT>2.0.CO;2.

Teneng, I.; Montoya-Durango, D. E.; Quertermous, J. L.; Lacy, M. E.; Ramos, K. S. (2011) Reactivation of L1 retrotransposon by benzo(a)pyrene involves complex genetic and epigenetic regulation, *Epigenetics*, 6(3), pp. 355–367. doi: 10.4161/epi.6.3.14282.

Vandegehuchte, M. B.; Janssen, C. R. (2011) Epigenetics and its implications for ecotoxicology, *Ecotoxicology*, 20(3), 607–624. doi: 10.1007/s10646-011-0634-0.

Vandegehuchte, M. B.; Janssen, C. R. (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. Elsevier B.V., 764–765, 36–45. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.08.008.

Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, J.; Chen, Y.; Zuo, Z. (2009) DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in Sebastiscus marmoratus liver., *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 95(2), 93–8. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.06.008.

Yauk, C.; Polyzos, A.; Rowan-Carroll, A.; Somers, C. M.; Godschalk, R. W.; Van Schooten, F. J.; Berndt, M. L.; Pogribny, I. P.; Koturbash, I.; Williams, A.; Douglas, G. R.; Kovalchuk, O. (2008) Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), pp. 605–610. doi: 10.1073/pnas.0705896105.

Zapata-Perez, O.; Sanchez-Teyer, L. F.; Perez-Nunez, M. T.; Arroyo-Herrera, A. L.; Quiroz-Moreno, A.; Albores-Medina, A. (2010) Response of CYP1A Gene expression in fish liver of catfish (Ariopsis felis) from Gulf of Mexico and their relationship with the genetic variability., *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 45(1), 62–67. doi: 10.1080/10934520903388830.

Capítulo 11

GENES BIOMARCADORES DE CONTAMINANTES: UNA VISIÓN DESDE EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA MOLECULAR, CINVESTAV, MÉRIDA, MÉXICO.

María Victoria Patiño-Suárez[1]

Mayra Alejandra Cañizares-Martínez[1]

Mercedes Quintanilla-Mena[1]

Marcela Del Río-García[1]

Isajav Rivas-Reyes[1]

Omar Zapata-Pérez[1]†

Carlos Puch-Hau1[1]*

[1] Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Mérida, Departamento de Recursos del Mar, Laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular. Km. 6 Antigua Carretera a Progreso, Apdo. Postal 73-Cordemex, 97310 Mérida, Yucatán, México;

* cashi026@hotmail.com

Resumen

Durante los últimos años se han realizado trabajos científicos para evaluar el efecto de las actividades petroleras en el Golfo de México como una forma de generar datos de línea base e indicadores ambientales que permitan identificar áreas impactadas por las actividades derivadas de la explotación petrolera Nacional. Los peces al estar expuestos a contaminantes, responden con cambios a nivel de expresión génica; los cuales se han utilizado como biomarcadores moleculares de estrés químico. En este sentido se puede relacionar el estado de salud de un individuo expuesto a un tóxico con la intensidad de los cambios registrados en estos biomarcadores, por lo que en este capítulo se presenta una visión sobre el uso de genes biomarcadores en el laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular (BIOTOXMOL), de la Unidad Mérida del Cinvestav, como herramientas eficaces para diagnosticar el estado de salud que guardan los ecosistemas marinos ante la presencia de contaminantes como el petróleo y sus derivados. Se presenta un panorama general de la importancia del Golfo de México con énfasis en las actividades petroleras y la toxicidad de los componentes del petróleo en los organismos acuáticos. Se destaca la relevancia de los peces como organismos bioindicadores de contaminación, el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y el uso de biomarcadores para predecir el estado de salud de cualquier ecosistema acuático. Asimismo, se presenta un catálogo de genes biomarcadores asociados a la presencia de hidrocarburos, generado en el laboratorio de BIOTOXMOL, específicos para especies de distintos hábitats del Golfo de México.

Palabras claves: genes biomarcadores, HAPs, Golfo de México, peces centinelas, monitoreo ambiental.

1. El Golfo de México

Diversos escenarios son muestra del impacto de la sociedad sobre la naturaleza y el Golfo de México no es la excepción. Se trata del noveno cuerpo de agua más grande del mundo, con una riqueza de aproximadamente 15,419 especies marinas tropicales reportadas en una extensión territorial de 1.5 millones de km^2 (Felder et al., 2009). Más del 50% de sus litorales están bordeados por estuarios, bahías y lagunas costeras, cuenta con 159,980 km de ríos, destacando el Mississippi, en los Estados Unidos (EE UU) y el Grijalva-Usumacinta, en México (Toledo-Ocampo, 2005, Toledo y Soto, 2014). Este ecosistema es económicamente productivo, posee una alta actividad pesquera, industrial y turística. En materia energética, el Golfo de México es una de las regiones más importantes en infraestructura y producción de petróleo y gas, tanto para los EE UU, como para México (García Cuéllar, et al., 2004; Spies, et al., 2016). En los EE UU, el Golfo de México contribuye con el 17% de la producción total de crudo y con el 5% de la producción de gas natural en seco total. Más del 45% de la capacidad total de refinación de petróleo de los EE UU está ubicada en la costa del Golfo, así como el 51% de la capacidad total de la planta de procesamiento de gas natural (EIA, 2018). En lo que concierne al contexto nacional, México cuenta con 12 Provincias Petroleras, entendiéndose éstas como áreas donde ocurren cantidades comerciales de petróleo o en las que se han identificado condiciones favorables para la acumulación de hidrocarburos (PEP, 2013). La mayoría de estas Provincias se sitúan en el Golfo de México. A principios de la década de los 80´s México figuraba en el panorama internacional con una creciente producción de hidrocarburos, siendo su participación del 5.2% de la producción mundial de crudo y el 2% de gas; este hecho sitúo al país como el quinto productor de petróleo y el octavo productor de gas del mundo. En 2017, de 50 países generadores de petróleo, México participó con el 2.4% de la producción mundial de crudo y, con el 1.11% de la producción mundial de gas, posicionándose en el décimo primero y décimo séptimo productor de petróleo y gas natural, respectivamente (BP, 2018). De la producción nacional de hidrocarburos generada en 2017, el Golfo de México contribuyó con el 98.4% de la producción total de crudo y con el 75.5% de la producción total de gas natural (CNH, 2018).

El Golfo de México ha sido fuente importante en la producción de hidrocarburos; sin embargo, cuando la presencia de éstos en el ambiente excede a la capacidad de la naturaleza para degradarlos y reincorporarlo a los ciclos de transformación de la materia y la energía, se convierten en un contaminante con impactos negativos para la biota (Ibarra-Sarlat, 2003). En este sentido, el Golfo de México, sin distinguir naciones, es una cuenca vulnerable a la descarga de contaminantes procedentes de las operaciones de extracción de petróleo, las cuales conllevan fugas menores de gas e hidrocarburos provenientes de los puntos de explotación petrolera mar adentro, concebidos como "derrames crónicos" (Guízar-

Vázquez, 2015), sin dejar de lado y de manera importante, los derrames accidentales como el Ixtoc-I, en 1979; el Deep Water Horizon, en 2010, y más reciente el Royal Dutch Shell, en 2016 (Beyer, et al., 2016; Crone y Tolstoy, 2010).

Aunado a lo anterior, se suman las descargas de otras fuentes de hidrocarburos de origen antropogénico procedentes de aguas continentales, deposiciones atmosféricas, así como emanaciones naturales.

Para los ecosistemas marinos, los derrames de petróleo representan la mayor amenaza ambiental, incluso derrames del crudo a pequeña escala pueden tener efectos sustanciales en la biota marina localizada, con daños transgeneracionales y en cascadas tróficas, con consecuencias para las poblaciones, comunidades y ecosistemas (Hannam et al., 2010; Centeno-Chalé et al., 2015; Echols et al., 2015; Venn-Watson et al., 2015; Xue et al., 2015; Beyer et al., 2016; Hook et al., 2016; Johansen y Esbaugh, 2017; Khursigara et al., 2017).

Esta situación ha generado inquietud por conocer el impacto ambiental de las actividades petroleras en la zona; por lo que, en los últimos años y con el concurso de Instituciones académicas y de investigación, tales como el Cinvestav, se han realizado una serie de campañas oceanográficas, bajo un esquema de monitoreo ambiental interdisciplinario e interinstitucional, con el afán de estimar la incidencia de los contaminantes de este tipo en la biota marina en el sur del Golfo de México.

2. Toxicidad del petróleo y otras fuentes de hidrocarburos en los sistemas acuáticos.

Por su naturaleza, el petróleo crudo contiene más de un millar de diferentes hidrocarburos (compuestos químicos que contienen únicamente hidrógeno y carbono) y, dependiendo de la fuente, varían grandemente en las cantidades relativas de hidrocarburos individuales, metales traza y contenido de azufre (Goldstein, et al., 2011; Collier et al., 2013). En general, los hidrocarburos constituyen del 50 al 98% de la composición total del petróleo; principalmente compuestos saturados de cadena lineal (alcanos), compuestos cíclicos insaturados (cicloalcanos) y compuestos aromáticos con uno (benceno) o varios anillos bencénicos en su estructura molecular (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos [HAPs]). Los HAPs son contaminantes químicos persistentes que se distribuyen en diversas matrices ambientales, incluyendo sedimentos, suelos, agua y aire (Collier *et al.*, 2013). Diversas evidencias sugieren que estos compuestos son la principal fuente de toxicidad acuática en el petróleo crudo (Hodson, 2017). La toxicidad de los HAPs es variable, depende de su estructura molecular, influyendo factores como el tamaño, la forma de las moléculas, la presencia de sustituyentes en determinadas posiciones de los anillos bencénicos, así como el coeficiente de reparto octanol-agua (KOW) (Pérez-Morales et al., 2016; Hodson, 2017; Richter-Brockmann y Achten, 2018). El petróleo crudo fresco contiene mezclas de HAPs, siendo los más

abundantes, entre 0.2 y 6%, los de bajo peso molecular, constituidos por 2 o 3 anillos (HAPs petrogénicos); mientras que los de alto peso molecular, generalmente entre 4 y 7 anillos, dominan como petróleo temporal al estar sujetos a un proceso de condensación como resultado de una combustión incompleta (HAPs pirogénicos) (Collier et al., 2013; Brette et al., 2017).

Los HAPs han despertado un especial interés en su estudio ya que, varios de estos compuestos, sus productos de transformación y/o sus mezclas representan un riesgo ambiental importante al estar asociados con una amplia gama de disfunciones biológicas en los seres vivos. En los organismos acuáticos, múltiples líneas de investigación a nivel bioquímico, molecular, celular y conductuales han evidenciado afecciones tales como neoplasia, reducción del éxito reproductivo y otros tipos de alteración endocrina, inducción de enzimas de biotransformación, desarrollo embrionario, crecimiento postlarval y condición somática, efectos transgeneracionales, inmunotoxicidad, genotoxicidad, cardiotoxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, neurotoxicidad, entre otras (Bado-Nilles et al., 2009, Hannam et al., 2010; IARC, 2010; Lee et al. 2014; Collier et al., 2014; Lee et al., 2015, Esbaugh et al., 2016; Brette et al., 2017; Hodson, 2017; Incardona, 2017; Richter-Brockmann y Achten, 2018, Philibert et al., 2019).

Los efectos biológicos de los HAPs pueden ser multifacéticos, aditivos, sinérgicos y se pueden superponer (Collier et al., 2014; Brette et al., 2017; Hodson, 2017, Philibert et al., 2019). Por ejemplo, el fenantreno, con una estructura de 3 anillos de benceno, se le ha catalogado como un compuesto inmunotóxico que afecta la actividad de la lisozima plasmática en peces (Bado-Nilles et al., 2009). La modulación de esta proteína podría tener efectos indirectos potenciales a nivel fisiológico (modificando la inducción del citocromo P450 1A [CYP1A]) y de disrupción endócrina (elevando los niveles de cortisol), como se ha visto en peces expuestos a otros xenobióticos (compuestos externos que alteran la fisiología de los organismos) como diclorodifeniltricloroetano (DDT) y policlorobifenilos (PCBs) (Bakirel et al., 2005; Skouras et al., 2003). Hay reportes que señalan al fenantreno como reprotóxico, al actuar como disruptor hormonal (Sun et al., 2011); y diversos estudios lo catalogan como cardiotóxico, al alterar la fisiología celular del músculo cardiaco, pudiendo ser una de las causas mundiales de disfunción cardiaca en peces, lo que tiene severas implicaciones ecológicas (Esbaugh et al., 2016; Brette et al., 2017; Incardona, 2017, Philibert et al., 2019). El deterioro cardíaco causado por la exposición al petróleo en peces también se ha relacionado con alteraciones en el comportamiento natatorio y la disminución de su rendimiento (Brown et al., 2017; Johansen y Esbaugh, 2017) así como cambios en la expresión génica en biomarcadores cardiacos (Incardona et al., 2015; Xu et al., 2017; Perrichon et al., 2018; Philibert, et al., 2019).

Algunos otros HAPs son relativamente inertes, sin embargo, su toxicidad está relacionada principalmente con la capacidad de los organismos para biotransformar el compuesto en metabolitos muy reactivos y altamente tóxicos. Un ejemplo clásico

es el benzo(a)pireno (BaP), con 5 anillos de benceno, el cual es metabolizado vía el CYP1A en diversas sustancias tóxicas y reactivas al oxígeno hasta el producto final 7,8-dihidroxi-9,10epoxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo(a)pireno (BPDE), con propiedades genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Fig.1) (Jeffy et al., 2002; Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004; Solhaug et al., 2005; Collier et al., 2013; Lee, et al., 2015; Philibert et al., 2019).

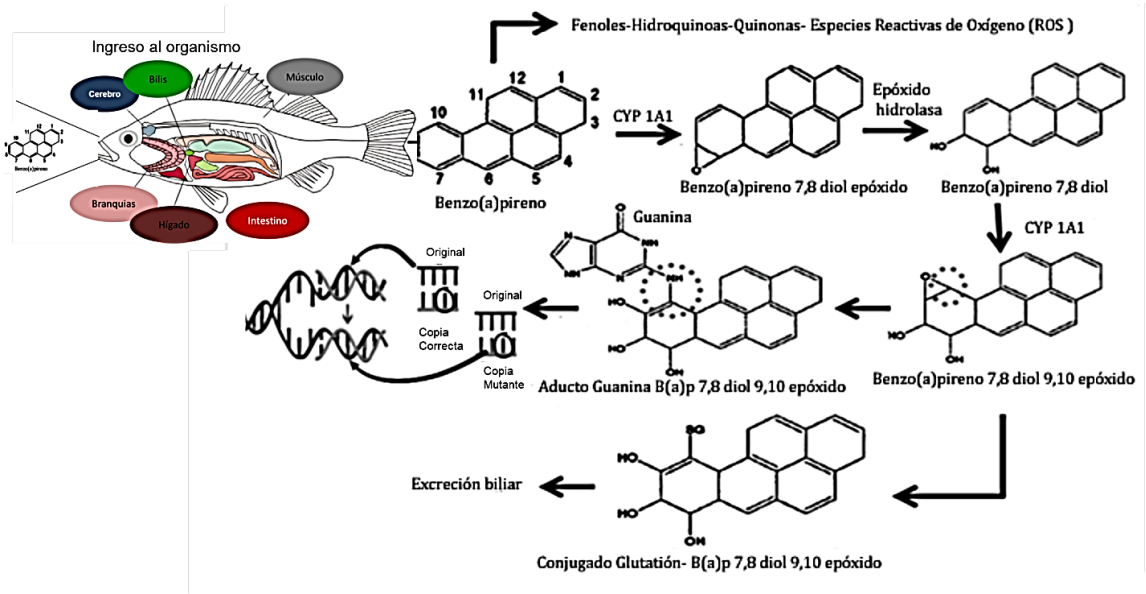


Figura 1. Metabolismo hepático del BaP vía el CYP1A. La biotransformación altera la toxicidad de los compuestos contaminantes, disminuyendo su toxicidad, seguido de su excreción; o se forman metabolitos más reactivos, potencialmente tóxicos, como epóxidos, dioles, fenoles, quinonas y substancias reactivas al oxígeno que pueden desencadenar alteraciones mutagénicas que conducen a procesos carcinógenos. (Adaptado de Quiñones et al., 2006)

Diversos factores influyen en el perfil tóxico de los HAPs en el agua, tales como la naturaleza del petróleo, el efecto de cóctel, la acción de la intemperie (por ejemplo, evaporación por efecto de la temperatura, emulsificación, dispersión natural, sedimentación, etc.), entre otros (Celander, 2011; Jung et al., 2013; Faksness et al., 2015; Esbaugh et al., 2016; Hodson, 2017; Perrichon et al., 2018; Philibert et al., 2019), por lo que dada la diversidad de los HAPs es muy poco probable que su toxicidad sea a través del mismo mecanismo de acción, posiblemente debido a las diferencias en las interacciones con los receptores celulares (Hodson, 2017).

Respecto a su naturaleza, el petróleo crudo proviene de diferentes formaciones geológicas, por lo que su composición química varía; de aquí que el desarrollo de la potencial toxicidad en los organismos difiere en función de la

composición de los HAPs, al ser la principal fuente de toxicidad acuática en el petróleo crudo (Jung et al., 2013; Hodson, 2017).

El efecto de cóctel hace referencia a los miles de compuestos del petróleo que al llegar al mar, por la dinámica de las corrientes oceánicas, se mezclan con otros contaminantes químicos tales como plaguicidas, microplásticos, nanopartículas, disruptores endócrinos químicos, productos farmacéuticos, dispersantes, etc. Los productos de su transformación, ya sea por mecanismos fisicoquímicos (por ejemplo: foto-oxidación, evaporación, dilución) o por efecto de los microorganismos presentes en la columna de agua y/o sedimentos (biodegradación), hacen que su toxicidad aumente debido a las interacciones químicas comúnmente denominadas efecto de cóctel (Celander, 2011).

En cuanto al cambio de la toxicidad por acción de la intemperie, cuando se derrama petróleo éste se somete a varios procesos naturales que cambian tanto su composición química como sus propiedades físicas (Faksness *et al.*, 2015). Sin embargo, estos cambios debidos a la intemperie han sido sujeto de debate. Por un lado, se plantea que si bien el petróleo degradado contiene menos HAPs solubles en agua que el petróleo original, el efecto de la intemperie incrementa los HAPs tricíclicos, los cuales se han considerado como la principal fuente de toxicidad para los peces en los derrames de petróleo crudo (Incardona et al., 2009; Esbaugh et al., 2016). Así por ejemplo, en larvas y embriones de peces expuestos a petróleo la toxicidad aumenta a medida que una mezcla enriquecida con compuestos de 2 anillos (naftalenos) se transforman con la intemperie a uno dominado por 3 anillos (fluorenos, dibenzotofenos y fenantrenos) (Carls et al., 1999; Heintzet al., 1999; Esbaugh et al., 2016). En contraparte se ha sugerido que la intemperie disminuye la toxicidad del petróleo, por la pérdida de los componentes de bajo peso molecular más solubles, al paso del tiempo (Toro et al., 2007; Faksness et al., 2015). De acuerdo con Toro y colaboradores (2007) la idea de que la intemperie aumenta la toxicidad se basa en el uso erróneo de los hidrocarburos totales de petróleo o la concentración total de HAPs, como si se tratara de un solo producto químico que se puede utilizar para medir la toxicidad de una mezcla, independientemente de su composición. Esta controversia pone en cuestión sí la intemperie natural reduce la toxicidad al eliminar los compuestos tóxicos de mayor solubilidad o aumenta la toxicidad al concentrar esos componentes con una mayor toxicidad individual.

Conocer los impactos del petróleo en la biota es complejo ya que el desarrollo de la toxicidad puede surgir de múltiples mecanismos regidos, por un lado, por las interacciones entre los cambios de la intemperie y el efecto de cóctel, asociados a la composición de los HAPs biodisponibles cuando el petróleo se libera o entra en contacto con el agua (Toro et al., 2007; Celander, 2011; Jung et al., 2013; Esbaugh et al., 2016; Hodson, 2017; Incardona, 2017) y por el otro, la susceptibilidad de los organismos a los efectos de su exposición y las diferencias toxicocinéticas. Diversas variables influyen en la susceptibilidad y la toxicocinética tales como la especie y etapa de desarrollo, siendo más vulnerables en etapas

tempranas de desarrollo, la dosis, el tiempo y la ruta de exposición, entre otros (Gravato y Santos, 2002; Crews et al., 2003; Tryphonas et al., 2005; Bado-Nilles et al., 2009; Costa et al., 2011; Karami et al., 2011; Lee et al., 2015; Incardona, 2017; Perrichon et al., 2018). De igual manera, es importante considerar los estresores naturales (flujo de temperatura, cambios en la salinidad, etc.) que pueden actuar sinérgicamente con los contaminantes, influyendo en la susceptibilidad de los organismos a los efectos de los HAPs. Por ejemplo, temperaturas elevadas pueden acelerar el metabolismo, lo que en consecuencia puede incrementar la susceptibilidad de los organismos a la exposición de petróleo (Perrichon *et al.*, 2018).

Un desafío importante ha sido determinar qué compuestos individuales contribuyen a la toxicidad general de mezclas complejas con diferentes composiciones químicas (Brette *et al.*, 2017). Una amplia gama de estudios que investigan los efectos de los HAPs en los organismos acuáticos son abordados desde una perspectiva del efecto de compuestos individuales; sin embargo, las concentraciones de exposición utilizadas a menudo son mucho más altas que las observadas en contaminantes en el medio natural (Collier et al., 2013; Brette et al., 2017). Si bien muchos de los HAPs en la fase disuelta tienen sus propias características de toxicidad únicas (Esbaugh *et al.*, 2016), es necesario evaluar mejor los factores aditivos, antagónicos, así como los efectos sinérgicos de mezclas de HAPs y de éstos en combinación con otros contaminantes (Collier *et al.*, 2013), y bajo concentraciones ambientales realistas.

La naturaleza dominante de los HAPs en los ambientes acuáticos y sus múltiples efectos biológicos hacen que las evaluaciones de su impacto sean de relevancia pero también altamente desafiantes, ya que las interacciones entre los HAPs y otros factores químicos, físicos y biológicos generan incertidumbre en la comprensión de sus efectos ecológicos en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, considerando que la toxicidad de los HAPs representa los efectos integrados de diversas interacciones moleculares de los organismos, desde el punto de vista ecotoxicológico, los biomarcadores, tema del siguiente apartado, han resultado herramientas útiles para estudiar el efecto de la contaminación química en ecosistemas acuáticos, bajo el entendido de que al monitorear los efectos adversos para las especies que ocupan posiciones críticas en el nivel trófico del ecosistema, los resultados se podrían extrapolar, proporcionando una visión de la integridad del ecosistema como un todo (Valavanidis y Vlachogianni, 2010).

3. Biomarcadores

Los biomarcadores, también referidos como bioindicadores o biocriterios, fueron identificados originalmente en el campo de la medicina humana y su uso en el campo de la ecotoxicología se inició a principios de los años 90s. Desde entonces se han establecido diversas definiciones del concepto biomarcador, las cuales han

ido evolucionando de acuerdo con los hallazgos en diferentes campos de estudio (Tabla 1).

En síntesis, un biomarcador es un indicador tanto de la presencia de ciertos compuestos químicos o mezcla de ellos, como de los efectos biológicos subsecuentes indicativos de un estrés químico causado en el organismo. Teóricamente, cada efecto o respuesta biológica desencadenada puede servir como biomarcador, al reflejar ya sea un estado normal, o cambios en los organismos en estudio. Sin embargo, una de las principales características de los biomarcadores es que deben tener una gran asociación o especificidad hacia el contaminante en estudio y no estar fuertemente influenciado por otros factores extrínsecos o intrínsecos de los organismos (Van der Oost et al., 2003; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003; Schirmer et al., 2010; Celander, 2011; Sedeño-Díaz y López-López, 2012, Zapata-Pérez, et al., 2014; Huggett, et al., 2018).

Los contaminantes actúan en el organismo de un individuo generando efectos que comienzan desde un nivel molecular o celular, hasta presentar secuelas visibles a nivel individual, de población y de la comunidad afectando el ecosistema (Van der Oost et al., 2003; Schirmer et al., 2010, Huggett et al., 2018; Kumari y Khare, 2018). En caso de estrés inducido por contaminantes, las respuestas se inician de manera secuencial dentro del sistema biológico. El primer nivel de acción del compuesto tóxico en el organismo empieza con la interacción entre la célula y el compuesto.

En la célula, el contaminante provoca una respuesta biomolecular a pequeña escala dentro de un corto período de tiempo. Miles de moléculas (por ejemplo genes y proteínas) pueden estar involucrados en esta respuesta. En caso de que los efectos no puedan ser compensados por los mecanismos protectores de la célula, las respuestas a nivel celular se traducen a mayores niveles de complejidad, cuyos efectos están en proporción directa a la escala espacial y temporal (Fig. 2).

Tabla 1. Evolución del término biomarcador según autor (Elaboración propia).

Autor	Definición
WHO (1993)	Cualquier medición que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental, ya sea químico, físico o biológico.
Peakall (1994)	Una alteración en las respuestas biológicas, ya sea genética, celular, fisiológica y hasta los cambios de comportamiento de un organismo, relacionadas con la exposición o efectos tóxicos de sustancias químicas ambientales.
Depledge y Fossi (1994)	Una respuesta biológica a un producto o productos químicos que da una medida de la exposición y, a veces, también, de los efectos tóxicos.
Beyer et al. (1996)	Respuestas o efectos biológicos que pueden ser relacionadas con la exposición a uno o varios compuestos químicos del ambiente.

Van Gestel y Van Brummelen (1996)	Cualquier respuesta biológica a una sustancia química del medio ambiente a nivel individual, medida en el interior de un organismo o en sus productos tales como, orina, heces, pelos, plumas, etc., indicando un cambio comparado con su estado normal y que no puede ser detectado en un organismo saludable.
Valavanidis y Vlachogian (2010)	Indicadores mensurables internos de cambios moleculares, celulares, genéticos, inmunológicos y fisiológicos que presentan los organismos vivos, como respuesta a la exposición de contaminantes.
Kumari y Khare (2018)	Cambios cuantificables que ocurren en varios niveles de cualquier organismo vivo que pueden ser respuestas moleculares, fisiológicas o de comportamiento al nivel de organismos completos que residen en los hábitats naturales.

A mayor dosis o tiempo de exposición, los efectos nocivos se incrementan (por ejemplo, alteraciones en la reproducción, susceptibilidad a enfermedades, etc.), impactando en los diferentes niveles jerárquicos de organización biológica (Fig. 2), al punto de ser irreversibles (mortalidad masiva, desaparición de especies, pérdida de la biodiversidad y desequilibrio en las comunidades, entre otros) (Van der Oost et al., 2003; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003, Schirmer et al., 2010; Kumari y Khare, 2018). De aquí que la importancia ecológica de los biomarcadores se incrementa a medida que el contaminante afecta a los niveles más altos de organización biológica, tales como los efectos sobre el comportamiento de los individuos y los efectos sobre la población/comunidad (Peakall, 1994).

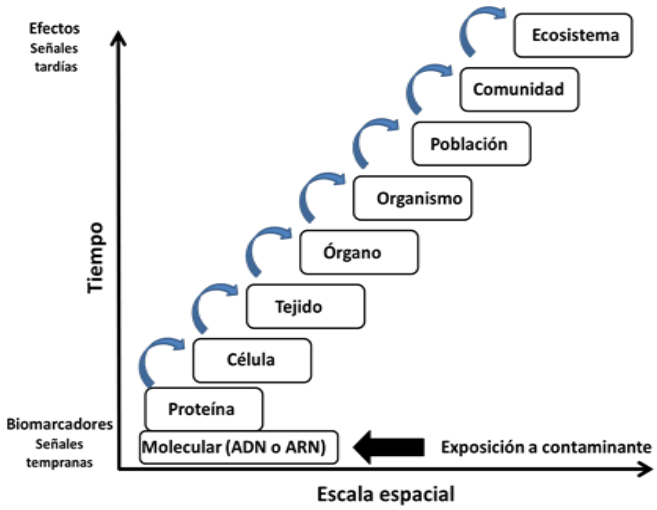


Figura 2. Representación esquemática de los niveles de respuesta de un sistema biológico bajo estrés por contaminación química. (Modificado de Schirmer et al., 2010).

Diferentes tipos de biomarcadores se están utilizando en varios países como una herramienta de pronóstico para evaluar la salud del ecosistema. Cabe señalar que existen distintos tipos de biomarcadores, la ordenación más clásica los agrupa en biomarcadores de exposición, de efecto, de sensibilidad y dentro de estas categorías el carácter es variado, tales como moleculares, bioquímicos, morfológicos, citopatológicos, hormonales, conductuales, genéticos, enzimáticos, etc. (Who, 1993; Kumari y Khare, 2018; Huggett et al., 2018).

Como emisores de los efectos acumulativos de las interacciones de sustancias tóxicas en niveles moleculares o celulares y como integradores de diferentes episodios de la exposición tóxica en el tiempo y el espacio, los biomarcadores de contaminación se han hecho herramientas atractivas en la determinación de riesgo ecológico en los ecosistemas (Depledge y Fossi, 1994); así como indicadores de estrés temprano para la determinación oportuna de cambios negativos del medio ambiente, a fin de prevenir daños irreversibles a nivel poblacional (Schirmer, et al., 2010; Kumari y Khare, 2018). Asimismo, los biomarcadores se han utilizado en especies centinelas (especies representativas de los hábitats que se estudian, por ejemplo, mejillones, almejas, ostras, caracoles, peces, etc.) o en pruebas *in vitro* para estudiar los efectos de determinados contaminantes en la biota, utilizando diferentes enfoques moleculares, tales como expresión génica, daño en el ADN, peroxidaciones de lípidos, biomarcadores de estrés oxidativo, metalotioneínas (MT), proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés, Heat Shock Protein), ensayos bioquímicos, ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas [ELISA], pruebas espectrofotométricas, medición fluorométrica, polarografía diferencial de impulsos, cromatografía de líquidos y de espectrometría de absorción atómica, entre otros (Hartl, 2002, Sarkar, et al., 2006; Sedeño-Díaz y López-López, 2012; Kumari y Khare, 2018). De igual modo, los biomarcadores son herramientas importantes en programas de monitoreo ambiental (Viarengo et al., 2007, Kumari y Khare, 2018), en estudios de campo para caracterizar zonas impactadas por mezclas complejas de contaminantes (Monserrat, 2007), así como, en la dispersión de los contaminantes lejos de su punto de origen, por ejemplo, la medición de los niveles de la integridad del ADN en estrellas de mar (*Asterias rubens*) desde el Mar del Norte y los caracoles marinos (*Planaxis sulcatus*) desde el Mar Arábigo a lo largo de la costa de Goa expuestos a contaminantes xenobióticos ambientales. Los resultados indicaron claramente la extensión y la naturaleza de la contaminación en los sitios de muestreo a lo largo de medio litoral (Sarkar et al., 2006).

Otro aspecto importante de los biomarcadores es que también indican una alteración no significativa en los organismos y, en ese caso, se considera que la especie no está significativamente expuesta a ningún producto químico, incluso si se detectan los tóxicos. El potencial para diferenciar entre exposición significativa y no significativa coadyuva para el desarrollo de normativas de gestión del medio ambiente apropiadas y el seguimiento asociado, por parte de los organismos

gestores de estas regulaciones (Kumari y Khare, 2018).

De esta manera, para el estudio de los efectos tóxicos de los HAPs en los organismos marinos, los biomarcadores de contaminación resultan herramientas potencialmente útiles para detectar la exposición y/o sus efectos, tanto en organismos procedentes del campo, como en organismos inducidos en el laboratorio.

Los cambios en la actividad de las enzimas de detoxificación y/o los niveles de sus ARNm representan los biomarcadores más comunes para monitorear los efectos de los contaminantes ambientales en los organismos. Los biomarcadores de expresión génica (indicadores tempranos de estrés), resultan ser de suma importancia al brindar la capacidad de predecir, y por lo tanto, disminuir o evitar, los efectos perjudiciales sobre la biota al detectarlos a bajos niveles de organización biológica antes de que la comunidad se vea afectada.

4. Especies Bioindicadoras.

Para determinar la relación causa-efecto entre la exposición a contaminantes químicos como los HAPs y su impacto directo en el medio ambiente, los peces han sido ampliamente utilizados como especies centinelas bioindicadoras, ya que los contaminantes químicos presentes en el agua o en la materia particulada (plancton y/o sedimentos) se pueden acumular en sus tejidos, a través de la respiración, osmorregulación, dieta, contacto dérmico y/o transferencia materna (Mills y Chichester, 2005). Como ya se ha visto anteriormente, la exposición de los peces a concentraciones letales y subletales de HAPs conduce a cambios moleculares, histopatológicos, citopatológicos y ultraestructurales en células, tejidos y órganos, así como algunos cambios conductuales que sirven de biomarcadores de estrés por contaminación. Al responder los peces con gran sensibilidad ante la presencia de HAPs en el ambiente acuático, los sitúa como una buena herramienta bioindicadora del estado de salud del ecosistema acuático (Velasquez y Vega, 2004; Kumari y Khare, 2018).

En el marco de las campañas oceanográficas realizadas para estimar el impacto de los HAPs en el Golfo de México, diferentes especies de peces con diferentes hábitos son utilizados para este fin en el laboratorio de BIOTOXMOL. Entre estas especies se encuentran los peces planos (figura 3) y los peces arrecifales (figura 4).

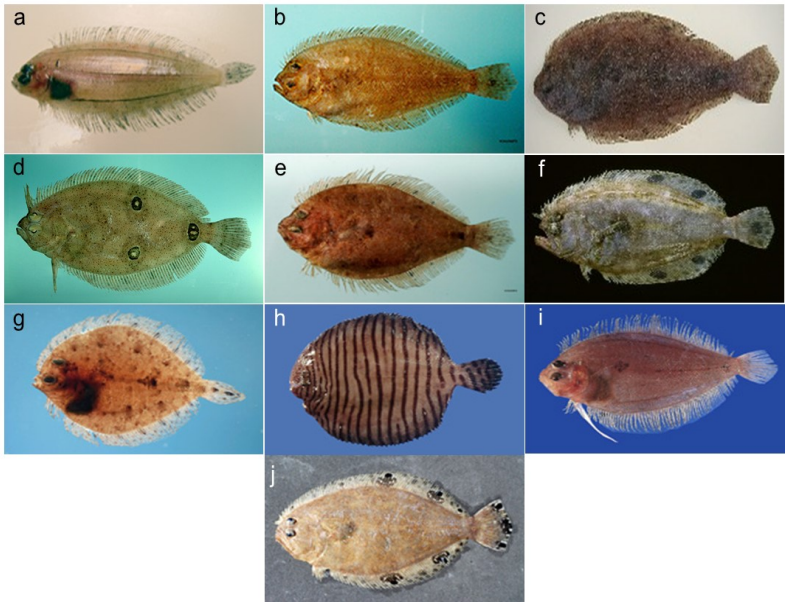


Figura 3. Peces planos utilizados para el monitoreo ambiental en el laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular (BIOTOXMOL), del Cinvestav-Mérida. a) *Monolene sessilicauda*, b) *Syacium papillosum*, c) *Syacium micrurum*, d) *Ancylopsetta dilecta*, e) *Syacium gunteri*, f) *Cyclosetta fimbriata*, g) *Bothus robinsi*, h) *Gymnachirus texae*, i) *Trichopsetta ventralis*, y, j) *Cyclosetta chittendeni.* (Modificado de http://fishbase.org/search.php)

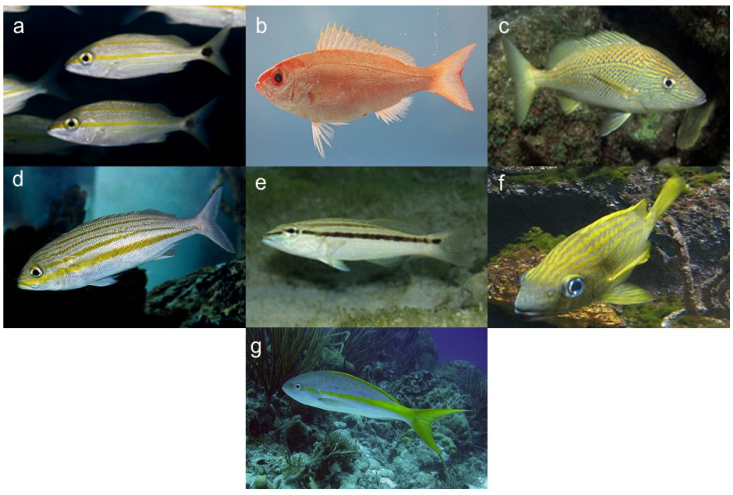


Figura 4. Peces arrecifales utilizados para el monitoreo ambiental en el laboratorio de Biotecnología y Toxicología Molecular (BIOTOXMOL), del Cinvestav-Mérida. a) *Haemulon aurolineatum*, b) *Rhomboplites aurorubens*, c) *Haemulon plumieri*, d) *Haemulon striatum*, e) *Diplectrum formosum*, f) *Haemulon flovolineatum* y, g) *Ocyurus chrysurus.* (Modificado de http://fishbase.org/search.php)

5. Metabolismo de los HAPs.

La captación de los HAPs en los peces implica una acumulación en órganos específicos tales como hígado, branquias e intestino; de éstos, el hígado es un importante órgano de desintoxicación de compuestos xenobióticos debido a su función, posición y suministro de sangre. Este proceso es catalizado por enzimas que permiten que estas sustancias sean más solubles en agua, pudiendo ser excretados del organismo (Lech y Vodicnik, 1985). La toxicidad de un compuesto puede verse afectada por el metabolismo, el cual puede ser beneficioso (detoxificación) o perjudicial (bioactivación) a un organismo. En caso de una reacción de detoxificación se reduce la toxicidad del compuesto; sin embargo, en caso de bioactivación, el compuesto se transforma en un metabolito reactivo que es más tóxico que el compuesto original (Fig. 1). El metabolismo es, por lo tanto, importante en la determinación de la actividad de un compuesto, la duración de la actividad y su vida media en el organismo (Timbrell, 1991).

Una vez que los peces absorben el contaminante químico, se inician una serie de mecanismos de detoxificación para reducir los efectos tóxicos del contaminante. La vía más estudiada para la detoxificación celular es la biotransformación de los xenobióticos mediada por un conjunto de enzimas llamadas fase I (transformación: oxidación, reducción o hidrólisis), y fase II (conjugación). También existen otras dos fases, menos estudiadas pero igual de importantes que las de biotransformación, conocidas como fase 0 y fase III (proteínas de transporte) (Szakács et al., 2008, Celander, 2011) (Fig. 5).

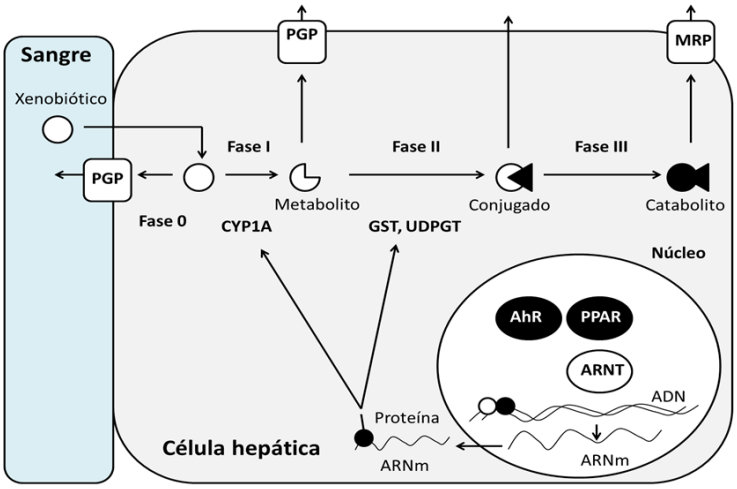


Figura 5. Mecanismos de detoxificación en una célula hepática. PGP= P-glicoproteína; CYP1A= Citocromo P450 1A; GST= Glutation-S-Transferasa; UDPGT= UDP-Glucuronosil-Transferasa; MRP= Resistencia a Múltiples Drogas; AhR= Receptor Aril-Hidrocarburo; ARNT= Receptor Nuclear Translocador de Aril-Hidrocarburo; PPAR= Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas. (Modificado de Celander, 2011)

Al ingresar un compuesto xenobiótico a la célula, éste puede ser transportado directamente por la P-glicoproteína (PGP) en fase 0 fuera de la célula, o biotransformado por la enzima citocromo P450 1A (CYP1A) a un metabolito activo en la fase I. El compuesto activado puede ser transportado por PGP o conjugado con moléculas endógenas, transformándolo en un producto más polar por acción de la enzima Glutatión-S-transferasa (GST) o la enzima UDP-glucuronosil-transferasa (UDPGT) en la fase II. Posteriormente, el metabolito conjugado siguiente puede ser transportado fuera de la célula por las proteínas relacionadas con resistencia a múltiples drogas (MRP) en la fase III. La expresión de los genes de fase 0-3 está mediada por receptores específicos, por ejemplo, el receptor para hidrocarburos arilo (AhR), el translocador nuclear del AhR (ARNT), el cual está implicado en la inducción de varias encimas que participan en el metabolismo de xenobióticos; así como el receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR), seguido de la unión a elementos específicos en la región promotora de los genes blanco.

La función principal de este proceso de fases de reacciones enzimáticas es detoxificar y eliminar los xenobióticos y sus metabolitos (Zhang, et al., 2009; Celander, 2011; Zheng et al., 2014). La transcripción génica es requerida para el inicio de las actividades protéicas o enzimáticas para mantener en homeostasis al organismo, por lo que las diferencias en los niveles de expresión del ARNm de un gen específico son una marca clara de la actividad celular al instante en que el organismo responde a un estrés ambiental. La expresión génica en los peces puede variar en cuestión de minutos u horas, dado que el transcriptoma es altamente dinámico, cambiando rápida y drásticamente en respuesta a estímulos y perturbaciones ambientales (Lockhart y Winzeler, 2000). Por tal motivo, los cambios en los niveles de expresión del ARNm han sido utilizados como biomarcador de estrés en los organismos, al encontrarse los genes en primer lugar jerárquico de organización biológica (Fig. 2) (Fisher et al., 2006; Zheng et al., 2014).

En el contexto del gran ecosistema del Golfo de México, el laboratorio de BIOTOXMOL cuenta actualmente con un catálogo de genes biomarcadores sensibles a la exposición por HAPs, en diversas especies de peces marinos con diferentes hábitats, tales como el *cyp1a*, Glutation-S-Transferasa (*gst*), Catalasa (*cat*), Vitelogenina (*vtg*), Superóxido Dismutasa (*sod*) Glutatión Peroxidasa (*gpx*) y Glutatión Reductasa (*gr*) (Fig. 5) (Puch et al., 2018). La inducción de estos biomarcadores moleculares en peces ha sido incorporada a varios programas de monitoreo biológico ambiental a nivel mundial, así como en la evaluación de riesgo ecológico después de un derrame de petróleo ya que aportan información relevante sobre la actividad de las enzimas en los organismos para detoxificar los contaminantes (WHO 1993; Fisher et al. 2006; Evrard et al., 2010; Holth et al., 2014; Nahrgang et al., 2009; Zheng et al., 2014; Geraudie et al., 2014; Kumari y Khare, 2018; Burkina et al., 2018).

Dentro de la fase I del sistema de detoxificación, la superfamilia de genes *cyp* consiste en un gran número de genes que codifican las enzimas P450, las cuales generalmente catalizan reacciones de monooxigenasa que involucran oxígeno molecular y un número equivalente de electrones. El Citocromo P450 es un complejo enzimático muy diverso implicado en el metabolismo de sustancias químicas exógenas (medicamentos, carcinógenos químicos, contaminantes ambientales, etc.), y endógenas (esteroides, ácidos grasos, vitaminas y prostanoides) que transforman los xenobióticos en moléculas más polares, mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y/o hidratación, facilitando así la eliminación de xenobióticos del organismo (Fig. 5) (Nebert et al., 2004; San Martín, 2006).

La subfamilia del CYP1A es utilizada con frecuencia en monitoreos ecotoxicológicos por su alta inducibilidad por contaminantes orgánicos como los HAPs, lo que hace al CYP1A un excelente y sensible biomarcador para la exposición a estos compuestos químicos (Van der Oost et al., 2003, Kumari y Khare, 2018). Esta asociación entre los incrementos del CYP1A y los hidrocarburos del petróleo ha sido validada extensamente por estudios en los cuales se han considerado diferentes especies incluyendo a los lenguados, el bacalao del Atlántico, la platija y la trucha (Goksoyr 1995, Van der Oost, et al., 2003; Miller et al., 2003; Nahrgang et al., 2009).

Como resultado de las reacciones metabólicas de la fase I se promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) originadas por el metabolismo aeróbico o por la exposición a contaminantes como los HAPs o sus metabolitos, por lo que las enzimas antioxidantes como CAT, GPx, GR y SOD juegan un papel importante en la eliminación de estos intermediarios químicos reactivos y las moléculas resultantes de ROS, protegiendo a las células metabolizadoras de oxígeno contra los efectos dañinos de los radicales libres (Van der Oost et al., 2003; Valavanidis *et* al. 2006; Di Giulio y Meyer 2008; González del Pliego, 2009; Guo et al., 2017).

Asimismo, los metabolitos resultantes de la fase I son sustratos del metabolismo de fase II. La GST representa uno de los mayores grupos de enzimas detoxificantes presentes en la fase II de la biotransformación (Perera, 2000), la cual brinda protección celular contra los efectos tóxicos de una amplia variedad de compuestos ambientales, como los HAPs. Su función principal es la detoxificación de los productos del estrés oxidativo (Van der Oost et al., 2003; Guo et al., 2017).

La VTG, precursor proteico del vitelo, se encuentra entre los biomarcadores más utilizados para la detección de sustancias químicas disruptoras endocrinas (DE). Se sabe que muchos xenobióticos actúan como DE, los cuales afectan el funcionamiento normal del sistema endocrino de los peces (Thomas, et al., 2009; Solé, et al., 2014). Los genes que expresan *vtg* son característicos de peces hembra de maduración sexual (Bulukin *et al*., 2007). En las especies de peces machos, la concentración de VTG suele ser baja o indetectable, pero se puede inducir al exponerse a sustancias estrogénicas como algunos HAPs, alquilfenoles o sus

metabolitos, que han demostrado tener actividad estrogénica, lo que altera el equilibrio hormonal (Martínez-Gómez *et al.*, 2013; Ortiz-Zarragoitia *et al.*, 2014) y, en consecuencia, afecta el desarrollo normal de los organismos y el sistema reproductor (Ortíz-Zarragoitia et al. 2014; Solé et al. 2014).

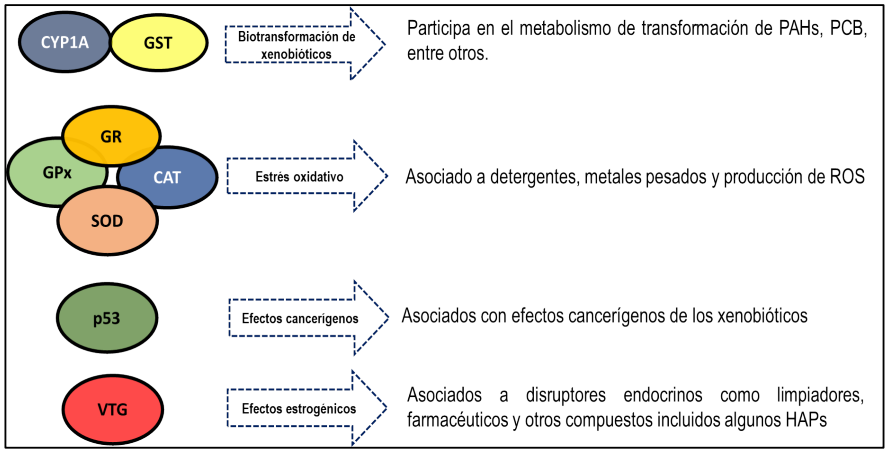


Figura 6. Genes asociados con la presencia de HAPs utilizados para el monitoreo ambiental del Golfo de México. Genes del sistema de transformación de xenobióticos: *cyp1a* y *gst*; genes de respuesta a estrés oxidativo: *cat*, *gr*, *sod*, *gpx*, sistema reproductivo: *vtg* y sistema de reparación del ADN: p53. (Elaboración propia)

6. Conclusiones.

El trabajo realizado en los últimos años para establecer marcos de referencia medio ambientales en torno a las actividades petroleras en el sur del Golfo de México ha permitido caracterizar un catálogo de genes biomarcadores asociados a la presencia de HAPs en especies de peces con diversos hábitats. La expresión de genes como el *cyp1a, gst, vtg, sod, cat, gr* y *gpx* ha sido utilizada en trabajos experimentales en peces y otros organismos marinos para estudiar los efectos de exposición a distintas concentraciones de crudo y se han incorporado como biomarcadores de exposición a petróleo en programas de monitoreo a nivel nacional e internacional para aguas marinas. Algunos otros como p53 han sido poco estudiados en peces; sin embargo, resultados en trabajos experimentales señalan la importancia de p53 en la reparación del daño al ADN ocasionado por xenobióticos carcinogénicos, por lo que la evaluación de este biomarcador ampliaría la información en los mecanismos de defensa celular ante un estrés fisiológico por contaminantes químicos carcinógenos como algunos HAPs.

Si bien los niveles de transcripción proporcionan una buena información de la presencia y efectos de los contaminantes, los procesos post-traduccionales, así como la cuantificación de los niveles de proteína y la actividad enzimática también

son cruciales para identificar los mecanismos moleculares implicados en alguna disfunción biológica. En este sentido, con los avances en la biología molecular, el uso de tecnologías ómicas para determinar el impacto del petróleo en la biota marina sería sin duda un componente muy valioso para entender los efectos de los HAPs en los peces desde una perspectiva integral que abarque respuestas moleculares a nivel de genes (genómica), de proteínas (proteómica), así como metabolitos (metabolómica).

Con los trabajos de exploración para la búsqueda de nuevas áreas de extracción petrolera, el siguiente objetivo en el laboratorio de BIOTOXMOL es la caracterización de genes biomarcadores en peces que habitan en las aguas profundas del Golfo de México con la finalidad de establecer la línea base ambiental de estos ecosistemas marinos.

Agradecimientos.

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo Sectorial CONACyT–SENER-Hidrocarburos, proyecto 201441. Esta es una contribución del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM).

7. Referencias

Bado-Nilles, et. al., 2009. Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Toxicology in Vitro*, 23(2), pp.235–241.

Bakirel, T., et al., 2005. Effect of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 71(2), pp. 175–181.

Beyer, J., et al., 1996. Contaminant accumulation and biomarkers responses in flounder (*Platichthys flesus*) and Atlantic cod (*Gadus mohua*) exposed by caging to polluted sediment in Sorsjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36, pp. 75–98.

Beyer, J., et al., 2016. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), pp.28–51.

BP 2018. Statistical Review of World Energy 2018-full report. [En línea] Disponible en: https://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2018-full-report.pdf

Brette, F. et al., 2017. A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant. *Scientific Reports*, 7, pp.1–9.

Brown, D.R. et al., 2017. Later life swimming performance and persistent heart damage following subteratogenic PAH mixture exposure in the Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(12), pp.3246–3253.

Bulukin, E. et al., 2007. An optical immunosensor for rapid vitellogenin detection in plasma from carp (*Cyprinus carpio*). *Talanta*, 72(2), pp.785–790.

Burkina, V., et al., 2018. Complex effects of pollution on fish in major rivers in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, pp. 92-99.

Carls, M. G., et al., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crud oil: Part I. Low-Level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasi*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(3), pp.481–493.

Celander, M.C. 20111. Cocktail effects on biomarkers responses in fish. *Aquatic Toxicology*, 105S, pp. 72-77.

Centeno-Chalé, O.A. et al., 2015. Effects of oil spill related chemical pollution on helminth parasites in Mexican flounder *Cyclopsetta chittendeni* from the Campeche Sound, Gulf of Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119(October 2007), pp.162–169.

CNH- Comisión Nacional de hidrocarburos. 2018. [En línea]. Disponible en https://portal.cnih.cnh.gob.mx/dashboard-sih.php

Collier, T.K. et al., 2013. Effects on Fish of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS) and Naphthenic Acid Exposures, *Fish Physiology*, 33, pp.195-255.

Costa, J. et al., 2011. Comparision of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 84(10), pp.1452–1460.

Crews, D., et al., 2003. Wildlife as models for the study of how mixtures, low doses, and the embryonic environment modulate the action of endocrine-disrupting chemicals. *Pure Appied Chemistry*, 75(November), pp.11–12.

Crone, T.J. y Tolstoy, M., 2010. Magnitude of the 2010 Gulf of Mexico Oil Leak. *Science*, 330(6004), pp.634–634.

Depledge, M.H. y Fossi, M.C.1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3, pp. 161-172.

Di Giulio, RT y Meyer, JN. 2008. "Reactive oxygen species and oxidative stress". En: Di Giulio RT, Hinton DE, editors. *The Toxicology of Fishes*. (273–324). New York, CRC Press taylor and Francis Group.

Echols, B.S. et al., 2015. Acute aquatic toxicity studies of Gulf of Mexico water samples collected following the Deepwater Horizon incident (May 12, 2010 to December 11, 2010). *Chemosphere*, 120, pp.131–137.

EIA- Energy Information Administration, Official Energy Statistics from the U.S. Government. 2018. [En línea]. Disponible en https://www.eia.gov/special/gulf_of_mexico/.

Esbaugh, A.J. et al., 2016. The effects of weathering and chemical dispersion on Deepwater Horizon crude oil toxicity to mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) early life stages. *Science of the Total Environment*, 543, pp.644–651.

Evrard, E., et al., 2010. Responses of the European flounder Platichthys flesus to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 15(2), pp. 111–127.

Faksness, L.G. et al., 2015. Chemical comparison and acute toxicity of water accommodated fraction (WAF) of source and field collected Macondo oils from the Deepwater Horizon spill. *Marine Pollution Bulletin*, 91(1), pp.222–229.

Felder, D.I., et al., 2009. An Introduction to Gulf of Mexico Biodiversity Assessment. En: Felder, Darryl L. *Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota* (1-14). Biodiversity College Station: Texas A&M University Press..

Fisher, M.A., et al., 2006. Induction of CYP1A mRNA in carp (*Cyprinus carpio*) from the Kalamazoo River polychlorinated biphenyl-contaminated superfund site and in a laboratory study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(1), pp.14–22.

García Cuéllar, J. A., et al., 2004. Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29(6), pp.311-319.

Geraudie, P. et al., 2014. In Vivo Effects of Environmental Concentrations of Produced Water on the Reproductive Function of Polar Cod (*Boreogadus saida*). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, 77: 9-11, pp. 557-573.

Goksoyr, A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Archives Toxicology Supplement*, 17, pp 80-85.

Goldstein, M.D.et al., 2011. The Gulf Oil Spill. *The New England Journal of Medicine*, 364, pp. 1334-1348.

González del Pliego, P. 2009. Evaluación de bioindicadores enzimáticos de estrés y contaminación en especies del género Sceloporus (Familia: Phrynosomatidae), en sitios con distintos impactos antropogénicos, Tesis de licenciatura, Centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México, 8 p.

Gravato, C. y Santos, M.A., 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51(2), pp.115–127.

Guízar-Vázquez, 2015. Reseña al artículo de Luis A. Soto, et al., "The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico", en Frontiers in Marine Science, (07 November, 2014). *Sociedad y Ambiente*, 1(6), pp. 89-94.

Guo, R. et al., 2017. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene and chrysene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 191, pp.36–51.

Hannam, M.L. et al., 2010. Immunotoxicity and oxidative stress in the Arctic scallop *Chlamys islandica*: Effects of acute oil exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), pp.1440–1448.

Hartl, M. 2002. *Benthic fish as sentinel organisms of estuarine sediment toxicity*. M. Bright, P. Dworschak, M. Stachowitsch (Eds.), The Vienna School of Marine Biology: A Tribute to Jörg Ott, Facultas Universitätsverlag, Wien, pp. 89–100.

Heintz, R.A., et al., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environmental Toxicology and chemistry*, 18(3), pp.494–503.

Hodson, P. V., 2017. The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1), pp.12–18.

Holth, T. F., et al., 2014. Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, 154, pp. 240–252.

Hook, S, et al., 2016. *Oil spill monitoring handbook* / editors: Sharon Hook, Graeme Batley, Michael Holloway, Paul Irving and Andrew Ross. CSIRO Publishing Locked Bag 10, Clayton South VIC 3169, Australia. 9781486306367 (epub).

IARC. 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Volume 92. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency Research on Cancer*. Lyon, Francia. 868 pp.

Ibarra-Sarlat, R. 2003. *La explotación petrolera mexicana frente a la conservación de la biodiversidad en el régimen jurídico internacional*. México, D.F., UNAM, NSTITUTO DE INVESTIGACIONES JURÍDICAS, ISBN 970-32-0814-2. Reproducción electrónica. México: UNAM, Instituto de Investigaciones Jurídicas, 2016: https://biblio.juridicas.unam.mx/bjv/detalle-libro/1089-la-explotacion-petrolera-mexicana-frente-a-la-conservacion-de-la-biodiversidad-en-el-regimen-juridico-internacional.

Incardona, J.P. et al., 2009. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic pacific herring (*Clupea pallasi*) exposed to crude oil during weathering. *Environmental Science and Technology*, 43(1), pp.201–207.

Incardona, J.P. et al., 2015. Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Scientific Reports*, 5, pp.1–13.

Incardona, J.P., 2017. Molecular Mechanisms of Crude Oil Developmental Toxicity in Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1), pp.19–32.

Jeffy, B.D. et al., 2002. Activation of the Aromatic Hydrocarbon Receptor Pathway Is Not Sufficient for Transcriptional Repression of BRCA-1 : Requirements for

Metabolism of Benzo[a]pyrene to 7r,8t-Dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene, *Cancer Research*, 62, pp.113–121.

Johansen, J.L. y Esbaugh, A.J., 2017. Sustained impairment of respiratory function and swim performance following acute oil exposure in a coastal marine fish. *Aquatic Toxicology*, 187, pp.82–89.

Jung, J.H. et al., 2013. Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere*, 91(8), pp.1146–1155.

Karami, A. et al., 2011. The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo[a]pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), pp.1558–1566.

Khursigara, A.J. et al., 2017. Cardiac function and survival are affected by crude oil in larval red drum, *Sciaenops ocellatus. Science of the Total Environment*, 579, pp.797–804.

Kumari, K. y Khare, A., 2018. "Integration of Biomarker Approach in Pollution Monitoring Programme of Aquatic Ecosystem" , En: Varjani S., Parameswaran B., Kumar S., Khare S. (eds) *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges. Energy, Environment, and Sustainability*, (pp.331–354) Springer, Singapore.

Lech, J.J. y Vodicnik, M.J., 1985. "Biotransformation". En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, (pp 526), G.M. Rand y S.R. Petrocelli, Eds. Hemisphere Publishing Corporation, New York.

Lee, J.W., et al., 2014. Cytochrome P450 system expression and DNA adduct formation in the liver of *Zacco platypus* following waterborne benzo(a)pyrene exposure: implications for biomarker determination. *Environmental toxicology*, 29 (9), pp.1032-42.

Lee, J.W., et al., 2015. Benzo(a)pyrene-induced cytochrome p4501A expression of four freshwater fishes (*Oryzias latipes, Danio rerio, Cyprinus carpio*, and *Zacco platypus*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(3), pp.1041–1050.

Lockhart, D.J. y Winzeler, E.A., 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788), pp.827–836.

Martínez-Gómez, C. et al., 2013. Integrated chemical and biological analysis to explain estrogenic potency in bile extracts of red mullet (*Mullus barbatus). Aquatic Toxicology*, 134–135, pp.1–10.

Mills, L.J., y Chichester, C. 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of the Total Environment*, 343, 1-34.

Miller, K.A., et al, 2003. Hepatic CYP1A levels and EROD activity in English sole: Biomonitoring of marine contaminants in Vancouver Harbour. *Marine Environmental Research*, 57, pp 37–54.

Monserrat, J.M.; et al., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146, (1–2), pp. 221-234.

Nahrgang, J.; et al., 2009. PAH biomarker responses in polar cod (Boreogadus saida) exposed to benzo(a)pyrene. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), ISSN: 1879-1514, 94(4), pp. 309-319.

Nebert, D.W.; et al., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biologycal Chemestry*, 279 (23), pp. 23847-23850.

Ortiz-Zarragoitia, M. et al., 2014. Mugilid fish are sentinels of exposure to endocrine disrupting compounds in coastal and estuarine environments. *Marine Drugs*, 12(9), pp.4756–4782.

Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology*, 3(3), pp.157–160.

PEP. 2013. Provincias Petroleras de México. México: Pemex Exploración y Producción. Subdirección de Exploración [en línea]. Disponible en https://docplayer.es/24069373-Provincias-petroleras-de-mexico.html.

Pérez-Morales López, G. et al., 2016. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), pp.1–15.

Perera, F. P. 2000. Molecular epidemiology: on the path to prevention. *Journal of the Natural Cancer Institute*. 92, pp. 602-612.

Perrichon, P. et al., 2018. Combined effects of elevated temperature and Deepwater Horizon oil exposure on the cardiac performance of larval mahi-mahi, *Coryphaena hippurus. PLoS ONE*, 13(10), pp.1–19.

Philibert, D.A. et al., 2019. Field-collected crude oil, weathered oil and dispersants differentially affect the early life stages of freshwater and saltwater fishes. *Science of the Total Environment*, 647, pp.1148–1157.

Puch-Hau, et al., 2018. Clonación Molecular de genes biomarcadores de contaminantes en peces que habitan en el Golfo de México. *Revista del centro de graduados e investigación*. Instituto Tecnológico de Mérida, 33(73), pp. 210-214, ISSN 0185-6294.

Quiñones, L., et al., 2006. Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Revista Médica de Chile*, 134(4), pp.499–515.

Quirós, L.†, et al., 2007. Physiological Response to Persistent Organic Pollutants in Fish from Mountain Lakes: Analysis of Cyp1A Gene Expression in Natural Populations of Salmo trutta. *Environmental Science & Technology,* 41 (14), pp. 5154-5160.

Richter-Brockmann, S. y Achten, C., 2018. Analysis and toxicity of 59 PAH in petrogenic and pyrogenic environmental samples including dibenzopyrenes, 7H-benzo[c]fluorene, 5-methylchrysene and 1-methylpyrene. *Chemosphere*, 200, pp.495–503.

Huggett, R. et al., 2018. "Introduction". En H. L. Huggett, R.J; Kimerle, R. A.; Mehrle Jr., P.M. y Bergman, ed. *BIOMARKERS Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. (pp. 1–3), CRC Press.

San Martín, P. 2006. Ocurrencia de hidrocarburos en 2 lagunas costeras norveracruzanas y expresión del gen CYP1A1 hepático de tilapia (*Oreochromis niloticus*) como bioindicador de contaminación acuática. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, 1-85 pp.

Sarkar, A. et al., 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15, pp. 333–340.

Schirmer, K., et al., 2010. Transcriptomics in ecotoxicology. *Anaytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, pp. 917-923.

Sedeño-Díaz, J. y López-López, E. 2012. "Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molec ular to the Population Level, a Review", pp. 151-173. En Hakan Türker (Ed). *New Advances and contribution to fish biology*. InTech.

Skouras, A., et al., 2003. The use of innate immune responses as biomarkers in a programme of integrated biological effects monitoring on flounder (*Platichthys flesus*) from the southern North Sea. *Helgoland Marine Research,* 57, pp. 190–198.

Shimada, T. y Fujii-Kuriyama, Y., 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1., *Cancer Science*, 95(1), pp.1–6.

Solé, M., et al., 2014. Effects of selected xenobiotics on hepatic and plasmatic biomarkers in juveniles of *Solea senegalensis. Environmental Research*, 135, pp.227–235.

Solhaug, A., et al., 2005. Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis: Characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chemico-Biological Interactions*, 151(2), pp.101–119.

Spies, R.B., et al., 2016. An overview of the northern gulf of Mexico ecosystem. *Gulf of Mexico Science*, 33(1), pp.98–121.

Sun, L., et al., 2011.Chronic exposure to phenanthrene influences the spermatogenesis of male *Sebastiscus marmoratus*: U-shaped effects and the reason for them. *Environmental Science and Technology*, 45, pp.10212–10218.

Szakács, G., et al, 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*, 13, pp.379-393.

Thomas†, K. V., et al., 2009. Effect-directed identification of naphthenic acids as important in vitro xeno-estrogens and anti-androgens in North Sea offshore produced water discharges. *Environmental Science and Technology*, 43(21), pp.8066–8071.

Timbrell, J.A. 1991. *Principles of Biochemical Toxicology*. 2ª. Edición, Taylor & Francis.

Toledo Ocampo, A. 2005. "Marco Conceptual: Caracterización Ambiental del Golfo de México", En A. V. Botello, J. Rendón von Osten, G. Gold- Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds), *Golfo de México. Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2ª ed. (pp. 25-51). México, UAC, UNAM, INE.

Toledo, O.A. y Soto, l.A., 2014. "El Gran Ecosistema del Golfo de México: marco conceptual", En: A. V. Botello, J. Rendón von Osten, J.A. Benítez y G. Gold-Bouchot (Eds), *Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, (pp1-36). México, D.F: UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida.

Toro, D.M.D. et al., 2007. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: toxic poyencial and the toxicity of satured mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), pp.24–36.

Tryphonas, H., et al., 2005. *Investigative Immunotoxicology*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Valavanidis, A. et al., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), pp.178–189.

Valavanidis, A. y Vlachogianni, T., 2010. Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment. *Advances on Environmental*, pp.1–12.

Van der Oost, R., et al., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 13: 57–149.

Van Gestel, C.A.M. y Van Brummelen, T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5: 217-225.

Vasseur, P. y Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, 28: 711-717.

Velasquez, E.V. y Vega, M.E., 2004. Los peces como indicadores del estado de salud de los ecosistemas acuáticos. CONABIO. *Biodiversitas*, 57(October), pp.12–15.

Venn-Watson, S. et al., 2015. Adrenal gland and lung lesions in Gulf of Mexico common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found dead following the Deepwater Horizon oil spill. *PLoS ONE*, 10(5), pp.1–23.

Viarengo, A., et al., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutantinduced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemestry and Physiology Part C.: Toxicology and Pharmacolology*, 146, 281–300.

WHO. 1993. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Xu, E.G. et al., 2017. Larval Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Sublethal Exposure to Weathered Deepwater Horizon Crude Oil: Developmental and Transcriptomic Consequences. *Environmental Science and Technology*, 51(17), pp.10162–10172.

Xue, J. et al., 2015. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*, 71(2) pp. 220-228.

Zapata-Pérez, O., et al., 2014. "Evaluación y monitoreo de los efectos biológicos por derrames de petróleo en el medio marino". En J. A. A.V. Botello, J. Rendón von Osten & B. y G. Gold-Bouchot, eds. *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. pp. 461–480.

Zhang, Q., et al., 2009. Phase I to II Cross-Induction of Xenobiotic Metabolizing Enzymes: a Feedforward Control Mechanism for Potential Hormetic Responses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237(3), pp. 345–356.

Zheng, B. et al., 2014. Integrated biomarkers in wild crucian carp for early warning of water quality in Hun River, North China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(4), pp.909–916.

Capítulo 12

LA CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO: EFECTOS EN EL AMBIENTE Y LA SALUD HUMANA

Alejandro Islas-García[1]

Arely Vergara-Castañeda[2]

Laura Martino-Roaro[2]

Adriana Benitez Rico[3]

Tomás Chávez-Miyauchi[3]

[1] Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología Ambiental. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle México.

[2] Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle México.

[3] Grupo de Investigación en Ingeniería de Procesos y Nuevos Materiales. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle México.

*alejandro.islas@lasalle.mx

Resumen

La industria petroquímica en México representa un papel fundamental dentro del sector energético y económico del país. Asimismo, la contaminación del suelo como resultado de la presencia del petróleo y sus derivados afecta la calidad del mismo y de manera directa e indirecta resulta en un potencial factor de riesgo para el ambiente y la salud humana, representando un problema de salud pública. El objetivo del capítulo es presentar un panorama de la actividad de los hidrocarburos su importancia y sus implicaciones en la contaminación de suelos en México y describir principalmente los efectos en el suelo y toxicidad sobre el ser humano relacionada a su exposición (aguda o crónica) de acuerdo a los tipos de moléculas con las que el organismo entra en contacto y en las cuales destacan las afectaciones al sistema nervioso central, a nivel respiratorio y a nivel sistémico, incluyendo la presencia de diversos tipos de cáncer.

Palabras Clave: Hidrocarburos, suelo, riesgos ambientales, toxicidad.

1. Importancia y panorama de los hidrocarburos en México

A partir de la década de 1950 la industria petroquímica ha desarrollado un crecimiento acelerado y es en estos últimos años donde la importancia de este energético ha sido de tal magnitud que la economía del país depende en un alto porcentaje de las reservas, venta y distribución de este recurso (Ponce y Botello, 2005). Los tipos de crudos que se extraen en México son Maya, Istmo, Olmeca y Altamira, cada uno con diferente densidad API y contenido de azufre.

México se ubica dentro de los 18 países con mayores volúmenes de reservas de petróleo en el mundo en zonas terrestres, aguas someras y aguas profundas de acuerdo a la Secretaria de Energía (SENER) (2015). Las reservas probadas, en base a la Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) (2018), para 2010 y 2018 fueron de 10,419 y 6,464 MMb (millones de barriles), respectivamente. La producción de petróleo terrestre y marino a nivel nacional está localizada en los estados de Campeche, Chiapas, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Figura 1). En la Tabla 1 se observa que Campeche es el estado con mayor producción marina con 1,442 Mdb., mientras que Tabasco, con 317 Mdb, es el sitio donde existe una mayor productividad de petróleo terrestre. Por lo que se puede predecir que en estas regiones existe una mayor contaminación de hidrocarburos en suelo.

A nivel mundial la demanda de energía proviene del petróleo con un 31.90%, del carbón con 27.10%, gas natural 22.06%, energías renovables 13.98 % y energía nuclear con 4.94 % en base a la International Energy Agency (2016). En México, la producción de energía primaria está dominada por los hidrocarburos con 86.79%, seguido de energía renovables con 8.49%, carbón 3.29% y nuclear con 1.43% (SENER, 2017).

De 1970 a 2014 las actividades económicas de la industria de los hidrocarburos representaron en promedio 6.3% del PIB. Con respecto a los ingresos del sector público de 1986 a 2014, los hidrocarburos aportaron el 32% y tomaron importancia en la economía nacional, alcanzando 44% en 2008 y disminuyendo en 2015 a 13% (Hernández, 2017).



Figura 1. Localización de las áreas de producción de petróleo. Modificado de (de la Cruz, 2016, p. 16)

Tabla 1. Promedio de la producción anual de petróleo Mbd (Miles de barriles diarios) en México (Modificado de CNH, 2018b).

Entidad Federativa	Depósito	Producción de Petróleo (Mbd)			
		2015	2016	2017	2018
Campeche	Marino	1,442.96	1,369.56	1,268.61	1,248.07
Chiapas	Terrestre	35.96	26.59	17.75	13.2
San Luis potosí	Terrestre	17.65	16.53	14.09	10.38
Tabasco	Marino	0.38	0.36	0.47	0.41
	Terrestre	317.38	331.37	315	265.21
Tamaulipas	Marino	329.49	293.57	229.97	200.34
	Terrestre	4.45	4.18	3.05	3.46
Veracruz	Marino	11.3	10.84	8.51	8.38
	Terrestre	3.45	2.93	2.57	1.5

La demanda del petróleo a nivel mundial va en aumento y proporcionalmente la escasez de este recurso. Al respecto la Asociación para el Estudio del Auge del Petróleo y del Gas (ASPO), menciona que de manera similar a una curva en forma de campana pasado un punto máximo habrá una disminución de hidrocarburos de forma inexorable para 2050 a escala mundial (Ocampo, 2006). Pero a pesar de esto, aún quedan varias décadas donde la sociedad dependerá de este producto y del descubrimiento de nuevos yacimientos. Asimismo, de manera

paralela aumentarán los impactos ambientales en diversos sitios a nivel mundial por el impulso de obtener mayores reservas de este producto.

2. La contaminación del suelo por hidrocarburos

La composición química del petróleo puede variar de una región a otra, pero principalmente están formados por una mezcla compleja de hidrocarburos en estado sólido, líquido y gaseoso; dichos compuestos están formados por átomos de carbono e hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, así como algunos elementos metálicos (Ortínez-Brito *et al.*, 2003). Los hidrocarburos se pueden dividir de acuerdo a su estructura en tres clases principales: alifáticos (alcanos, isoprenoides, cicloparafinas), aromáticos (monocíclicos y policíclicos) y polares (resinas y asfáltenos) (Lladó, 2012).

Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) son el conjunto de hidrocarburos de las diferentes fracciones; la fracción ligera consta de moléculas con entre 5 y 10 átomos de carbono, la fracción media entre 10 y 28 átomos de carbono y la fracción pesada posee de 28 a 40 átomos de carbono. Los hidrocarburos de mediano y alto peso molecular, entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), tienen una naturaleza química hidrofóbica y son adsorbidos en suelos, lo que asegura su persistencia por periodos largos (Cavazos-Arroyo *et al.*, 20014).

La contaminación del suelo como resultado de la presencia de petróleo y sus derivados representa un grave problema mundial. El grado de contaminación de hidrocarburos en el medio ambiente no es sorprendente dada las cantidades utilizadas y transportadas en todo el mundo. Ochenta y cuatro millones de barriles de crudo se consume alrededor del mundo por año, casi el 50% de los cuales son transportados por mar, lo que conduce a la mayor probabilidad de accidentes petroleros y, a su vez, la contaminación de agua y suelo a gran escala (McKew *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2010).

El Golfo de México es una de las regiones petroleras más grandes del mundo, encontrándose en el área de la Sonda de Campeche el 95% de las reservas del recurso petrolero de México (Ponce y Botello, 2005). Debido a lo anterior, el trasporte mediante oleoducto y poliductos es una de las formas más eficientes y rápidas de traer este producto al centro del país. Sin embargo, la infraestructura de oleoductos y poliductos tiene un retraso tecnológico y cuenta con 24 años de edad promedio y con confiabilidad operativa baja (Bautista, 2010). Por lo cual, las malas condiciones de los ductos y las fugas por tomas clandestinas son las principales causas de derrames de hidrocarburos en el suelo. En este sentido, en México, existen aproximadamente un total de 40,106 kilómetros de ductos (PEMEX, 2013), entre los cuales se encuentran oleoductos y poliductos que transportan el petróleo y sus derivados líquidos (Figura 2).



Figura 2. Distribución y extensión de ductos para transporte de petróleo y derivados (Modificado de (CartoCrítica, 2017).

A consecuencia de lo anterior, la presencia de hidrocarburos en suelo se debe principalmente a derrames accidentales o provocados y por fugas de los ductos instalados en el subsuelo. No obstante, la industria petroquímica ha sido identificada como una fuente importante de contaminación de hidrocarburos debido a fugas y derrames en refinerías, tanques de almacenamiento y estaciones de bombeo durante sus operaciones (Bento *et al.*, 2005: Iturbe *et al.*, 2004 y 2007). De igual forma, la industria ferroviaria ha contribuido a la contaminación de suelo mediante actividades realizadas en ex talleres de ferrocarriles principalmente con diésel y aceite (Castro *et al.*, 2013; Llamas y Pérez, 2013). En la mayoría de los casos de sitios contaminados con hidrocarburos, por diversas fuentes, las concentraciones son muy altas (Tabla 2), denotando el impacto inmediato de estos contaminantes. Además de que estos valores excederían los niveles máximos permitidos por la Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, esto en base a las diferentes fracciones de hidrocarburos para los distintos usos de suelo.

Tabla 2. Concentraciones máximas de HTP en suelos de México (Elaboración propia).

Región	Entidad Federativa	Fuente de contaminación	TP mg/kg	Referencia
Norte	Coahuila	Estación de bombeo	53,292	Iturbe *et al.*, 2007
NorteCentro	Aguascalientes	Estación de almacenamiento	21,093	Iturbe *et al.*, 2005
Norte	Aguascalientes	Ex taller de Ferrocarriles	189,638	Llamas y Pérez, 2013

Centro				
Centro	Puebla	Derrame poliducto	47,357	Islas-García *et al*., 2015
Suroeste	Oaxaca	Estación de bombeo	101,759	Iturbe *et al*., 2007b
Sureste	Tabasco	Refinería	77,098	Riveroll-Larios *et al*, 2015

3. Efectos de los hidrocarburos en el suelo

La interacción de un contaminante orgánico con el suelo depende de diversos factores como la cantidad de materia orgánica y constituyentes minerales, contenido de humedad, concentración del contaminante y los procesos realizados por microorganismos autóctonos. Por lo que efecto del contaminante dependerá del componente del suelo que alcance el contaminante (Reid y Semple, 2000). Dentro de las consecuencias de la presencia de hidrocarburos en el suelo se cuentan principalmente aumentar la retención de agua en la capa superficial, disminuir el agua disponible en los poros, modificar textura, densidad, pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico (CIC), relación C:N:P y con ello su fertilidad (Martínez y López, 2001; Solís-Segura y López-Arriaga, 2003; Ortínez-Brito *et al*., 2003).

Los derrames y fugas de hidrocarburos provocan la alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo por la acumulación de contaminantes en sus poros y la absorción en la materia orgánica originando la degradación de dicha matriz (Zavala-Cruz, *et al*., 2005). Asimismo, este tipo de contingencias ambientales ocasionan afectos adversos sobre plantas, animales, humanos y microorganismos (Figura 3), siendo estos últimos fundamentales para los procesos biogeoquímicos del ecosistema (Vasudevan y Rajaram, 2001).

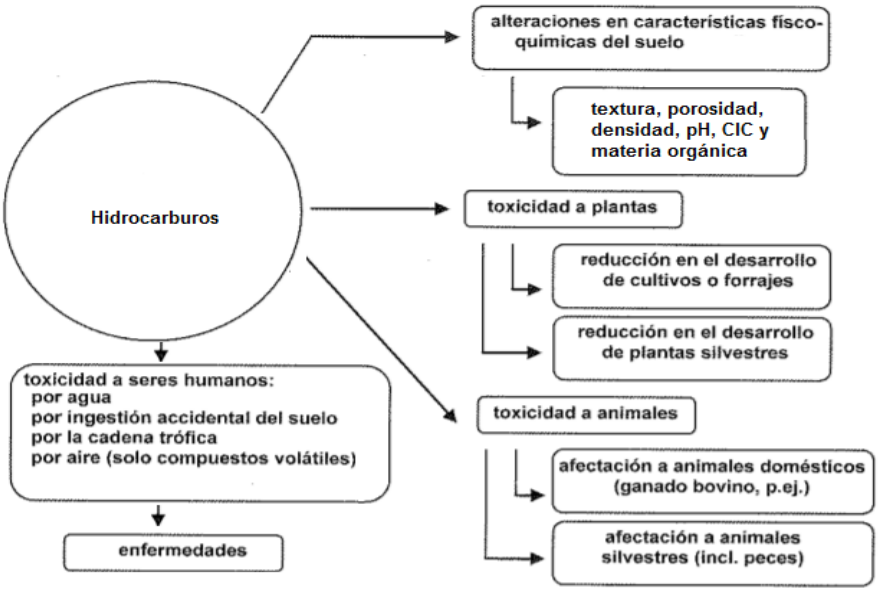


Figura 3. Afectaciones de la presencia de hidrocarburos en el suelo
(Modificado de Adams-Schroeder, 2012, p. 16)

De acuerdo a Zamora *et al* (2012), la presencia de hidrocarburos en suelo reduce el pH, la conductividad eléctrica y la capacidad de intercambio catiónico. Lo cual modifica la estructura funcional de la comunidad bacteriana y no se restituye por completo a su condición original. De igual forma Vázquez-Luna *et al* (2011) determinaron que las bacterias fijadoras de nitrógeno modifican considerablemente su diversidad y abundancia en concentraciones de 1,200 a 40,000 mg/kg de HTP.

En otra investigación, a nivel de laboratorio y de campo, se utilizaron lombrices de tierra (*Eisenia fetida* y *Polypheretima elongata*) como bioindicadores para la calidad de suelo y se observó mortalidad en suelos con concentraciones mayores al 2% de hidrocarburos (Geissen *et al.*, 2008). García-Segura *et al* (2017) determinó que los HTP, en concentraciones de 1,800 a 8,150 mg/kg, afectan la abundancia de las poblaciones la meso y macrofauna, tales como lombrices de tierra, ácaros y colémbolos, que son grupos susceptibles a ser usados como indicadores de la contaminación de suelo. Asimismo, Uribe-Hernández *et al* (2010) comprobaron que la diversidad de colémbolos fue afectada por la presencia de HAPs como flouranteno, naftaleno, pireno, criseno y fenantreno. Estos organismos tienen importantes funciones en el mantenimiento de los servicios ecosistémicos del suelo y contribuyen en forma de ingeniería física al crear canales y airear el suelo y con ingeniería bioquímica al promover la descomposición de la materia orgánica y causar interacciones con hongos y bacterias (Lavelle *et al.*, 2016).

4. Efectos de los hidrocarburos sobre la salud

En el 2012, la American Association of Poisson Control Centers (AAPCC), reportó 34,179 casos de intoxicaciones por hidrocarburos, incluyendo 20 muertes (Mouwry *et al.*, 2013). La toxicidad de los hidrocarburos (alifáticos, aromáticos, halogenados -de cadena línea o cíclicos- y destilados) dependerá de la dosis y las propiedades fisicoquímicas de la molécula, siendo la volatilidad, la liposolubilidad, la viscosidad y la tensión superficial las más importantes; así como las características propias del organismo y la vía o ruta de exposición. Ésta última ocurre típicamente a partir de varios mecanismos: la ingestión o inhalación no intencionada de productos domésticos o compuestos que los contienen de manera natural o qué hayan sido contaminados, la exposición ocupacional o laboral y la inhalación intencional de compuestos que los contienen como drogas de abuso (Tormoehlen *et al.,* 2014), de manera tal que las principales vías de exposición a hidrocarburos son el contacto dérmico, inhalación de vapores o polvos, ingestión de suelo o agua subterránea contaminada por hidrocarburos (Iturbe-Argüelles *et al.,* 2006).

Independiente a la vía principal de exposición, al estar presentes como contaminantes del suelo pueden ingresar por vía oral o por contacto con la piel, además, la exposición, ya sea individual o en este sentido, la evaluación del riesgo se vuelve compleja si además están presentes diversos hidrocarburos formando mezclas. Aquellos hidrocarburos volátiles se absorben preferentemente por inhalación, por otro lado, los de mayor coeficiente lipofílico atravesarán no sólo membranas celulares sino también la barrera hematoencefálica teniendo consecuencias sobre el sistema nervioso central (SNC) (Tormoehlen *et al.,* 2014; Williams *et al.*, 2007).

La exposición a los hidrocarburos puede afectar de manera sistémica al sujeto y alterar varios órganos y funciones. Los efectos tóxicos más importantes son los que ocurren sobre el sistema cardiovascular y nervioso, sin embargo, ciertos agentes están más asociados con una toxicidad particular (Perry *et al.,* 2018), por lo que resulta necesario identificar el hidrocarburo de exposición. En la Tabla 3 se resumen los principales daños descritos relacionados a la exposición a hidrocarburos y a continuación se especifican algunos de los mecanismos definidos. En el caso de las afectaciones a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), si bien no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales se presentan, algunos estudios proponen que las afectaciones son en la NMDA, la serotonina, la nicotina, los receptores de glutamato, los canales iónicos activados por voltaje, las vías de dopamina y GABA en el cerebro o porque actúan como sustancias neurotóxicas. Los daños que se pueden presentar, a corto o a largo plazo, son entre otros: estado de depresión generalizada, síntomas como dificultad para hablar, desorientación, dolor de cabeza, mareos, ataxia, síncope, náuseas, alucinaciones, agitación, cambios en el comportamiento, irritabilidad, paranoia y en algunos casos convulsiones. En el caso de las exposiciones prolongadas, se ha reportado que

pueden causar neuropatías, reducción del tamaño del cerebro, encefalopatía y demencia (Curtis *et al.*, 2018; Flanagan *et al.*, 2001; Tormoehlen *et al.,* 2014).

Por otro lado, pueden observarse cambios a nivel hematológico expresados como anemia aplásica y algunos tipos de leucemia, así como alteraciones musculoesquéleticas referidas como como debilidad muscular, rabdomiolisis y elevación de la creatincinasa (Perry *et al.*, 2018).

A nivel pulmonar, se ha sugerido que los hidrocarburos con tensión superficial y viscosidad bajas, así como alta volatilidad pueden inhalarse fácilmente (Horace y Gerarde, 1963) y penetrar profundamente en los pulmones, afectando al surfactante y ocasionando daños al epitelio de las vías respiratorias, los septos alveolares y los capilares pulmonares, provocando un estado de inflamación, atelectasia y fiebre, y la presencia de síntomas como tos, disnea, daño pulmonar, edema y necrosis. Además de ocasionar un síndrome de las vías respiratorias similar al asma o neumonitis química (Curtis *et al.*, 2018).

Por otro lado, la exposición a hidrocarburos, principalmente halógenos, pueden aumentar la sensibilidad del miocardio a la epinefrina ocasionando ritmos sin perfusión y arritmias. Asimismo, pueden tener un efecto inotrópico y cronotrópico negativo en el miocardio debido a alteraciones de los canales de calcio, potasio y sodio. En el caso de los sujetos que se expusieron de manera crónica, se pueden presentar soplos asociados a la hipertensión pulmonar (Curtis *et al.*, 2018; Himmel, 2008).

Cuando se da una ingestión de hidrocarburos, éstos pueden causar irritación en el tracto gastrointestinal, dañando el epitelio y provocando síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos (los cuales pueden a su vez ocasionar broncoaspiración y neumonitis), dolor abdominal y hematemesis. También, se ha sugerido que varios disolventes pueden conducir a una toxicidad hepática (Weber *et al.*, 2003). En relación a los daños a nivel renal, se puede producir una acidosis tubular renal, cálculos renales, glomerulonefritis, hipercolemia, hiponatremia e hipopotasemia como consecuencia de la acidosis metabólica que la exposición de la mayoría de los hidrocarburos provoca (Curtis *et al.*, 2018).

En el caso de la exposición a nivel dérmico, se pueden presentar irritaciones leves en la piel cuando la exposición es aguda, en cambio cuando es prolongada se pueden observar dermatitis alérgicas, quemaduras químicas superficiales o de espesor total, provocando síntomas sistémicos, ampollas, ictericia o irritación de la membrana mucosa (Curtis *et al.*, 2018).

Tabla 3. Efectos de la exposición a hidrocarburos en la salud humana (Elaboración propia con datos de Curtis *et al.*, 2018)

Sistema	Efectos	Síntomas / Signos
Pulmonar	Síndrome de vías respiratorias	Inflamación
	Neumonitis química	Tos
		Disnea
SNC	Convulsiones	Depresión generalizada
	Neuropatías	Dificultad para hablar
	Encefalopatía	Desorientación
		Cefalea
		Náuseas
		Ataxia
		Síncope
		Alucinaciones
Cardiovascular	Arritmias	Efecto inotrópico y cronotrópico
	Soplos	negativo en el miocardio
		Edema intersticial
		Hemorragias intramiocardiacas
Gastrointestinal	Síntomas gastrointestinales	Irritación en el TGI
		Náuseas o vómito
		Dolor abdominal Hematemesis
Renal	Acidosis metabólica	Hipercolemia
	Acidosis tubular renal	Hierpcalemia
	Cálculos renales	Fatiga
Dérmico	Irritación	Ampollas
	Quemaduras químicas	Irritación
		Ictericia

SNC; Sistema Nervioso Central.
TGI: Tracto Gastrointestinal

Respecto a la medición del riesgo de efectos adversos en la salud humana, definido como la probabilidad o posibilidad de que el manejo, la liberación al ambiente y la exposición a un material o residuo la afecten al igual que a otros organismos vivos, en el agua, aire, suelo, ecosistemas o bienes y propiedades (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2018), la United States Environmental Protection Agency (USEPA), define a la Evaluación del Riesgo en la Salud como la caracterización de los efectos adversos potenciales debido a la exposición humana a contaminantes ambientales (NRC, 1983). La USEPA incluye cuatro niveles de caracterización:

1. Identificación de la sustancia
2. Evaluación dosis-respuesta
3. Valoración de la exposición
4. Caracterización del riesgo (USEPA, 2018)

La parte fundamental de la estimación del riesgo sobre la salud es la evaluación de la exposición, que incluye la valoración de las diferentes vías por las que el hidrocarburo ingresa al organismo y el establecer el modelo que evalúe el riesgo de carcinogénesis (ILCR) (Qu *et al.,* 2015) (Cachada *et al.,* 2016), el cual indica un riesgo potencial expresado como un número adimensional que indica la probabilidad de que un individuo desarrolle cáncer o sufra efectos no carcinógenos durante su vida media (Iturbe-Argüelles *et al.,* 2006), si presenta un valor entre 10^{-6} y 10^{-4}, mientras que >10-4 indica alto riesgo (Cao *et al.*, 2018).

A continuación, se describen algunos ejemplos de la toxicidad referida de acuerdo al tipo de hidrocarburo de exposición.

4.1 Hidrocarburos alifáticos no halogenados.

Los hidrocarburos alifáticos de mayor relevancia son el metano, el n-hexano, el propano y el isobutano, se encuentran presentes en gasolina, pegamento, disolventes de pinturas y pinturas en aerosol (Cochrane, 2018). Al ser moléculas lineales de cadenas cortas, son volátiles, lo que les permite absorberse rápidamente en los pulmones, alcanzar circulación sistémica y atravesar la barrera hematoencefálica. Producen depresión del SNC, lo cual se ha observado, es proporcional al número de carbonos de la molécula, así a dosis bajas se presenta excitación motora mientras que a dosis altas se puede manifestar un estado de sedación, coma o muerte (Perry *et al.,* 2018). De las manifestaciones clínicas más importantes, se encuentra la neuropatía periférica producida por el metabolito 2,5-hexanediona del n-hexano (Valdivia-Infantas, 2008).

4.2 Hidrocarburos aromáticos no halogenados

Destacan el benceno, el tolueno y el naftaleno. Se utilizan en la fabricación de detergentes, adhesivos, pinturas y explosivos. Son de fácil absorción en las mucosas ya que son líquidos volátiles y al igual que los hidrocarburos alifáticos, llegan a sistema nervioso central y producen euforia, crisis convulsivas, depresión del SNC, coma y muerte. En estudios recientes, se han propuesto diversos mecanismos de acción administrando al tolueno en animales de laboratorio, por ejemplo, se sugiere que produce una inhibición no competitiva de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), otra propuesta es que el hidrocarburo activa las neuronas mesolímbicas dopaminérgicas, incrementando las concentraciones de dopamina y sugiriendo así, el posible mecanismo de sus propiedades adictivas (Riegel *et al.*, 2007); también se ha observado un incremento de la función de los receptores GABA, así como una inducción de radicales libres. Otros órganos

blancos son la piel, los pulmones, el sistema cardiovascular y el riñón. No existen antídotos, por lo que el manejo del paciente intoxicado involucra el soporte vital y tratamiento a la sintomatología que presente el individuo.

4.3 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

En las últimas décadas, el interés por la persistencia de HAPs en suelos como resultado de las actividades antropogénicas ha cobrado relevancia a nivel mundial debido a que sus características fisicoquímicas permiten que no sean solubles, que se absorban rápidamente en el sustrato y que sean de difícil degradación y su riesgo mutagénico y carcinogénico (Wang *et al*. 2016). La población en general está expuesta a estos compuestos a través de agua o alimentos debido a la contaminación por procesos de adsorción, deposición y bioacumulación en el agua, suelo y aire (Ortíz-Salinas *et al.*, 2010). En el caso de frutas y algunas verduras, los HAPs se pueden detectar en las superficies como consecuencia de la deposición atmosférica de partículas (Jánska *et al.,* 2006). La ocurrencia de HAPs en los alimentos, considerada como la ruta principal de exposición humana (Xia *et al*., 2010) puede deberse a su presencia por cuestiones naturales o ambientales o a partir del procesamiento de los alimentos, que incluyen las prácticas culinarias (frituras, horneado, asado, a la parrilla) y el procesamiento de alimentos a nivel industrial (secado y curado) (Bansal *et al*., 2015). En el caso de la vía ambiental, varios estudios sugieren que las plantas son capaces de absorber HAPs de suelos contaminados en sus tejidos y qué su consumo (directo o indirecto) resulta en una vía de exposición humana potencial (Hunt *et al*., 2018).

En relación a su presencia durante la cocción a altas temperaturas de carnes y pescados (0.1-20 µg/Kg) y a través de la piel por el contacto con suelos contaminados y en el ambiente, tomando como ejemplo el benzo[a]pireno, los niveles que pueden alcanzarse por día abarcan un rango desde 80 a 380 ng/Kg (Wretling, *et al*., 2010). Es así, que Agencias Internacionales como la IARC (International Agency for Research on Cancer) lleva a cabo rigurosos estudios con la finalidad de clasificar a las sustancias por su potencial carcinógeno, en el grupo 1 se incluyen los carcinógenos para el ser humano, es decir, se ha establecido la relación causal, por ejemplo, el benzo[a]pireno (BaP). En el grupo 2A: Probablemente carcinógeno para los humanos, existe evidencia suficiente en animales, pero limitada en humanos, grupo 2B: Posiblemente carcinógeno para los humanos, la evidencia es limitada en humanos e insuficiente en animales. Grupo 3: carcinogenicidad no clasificable, la evidencia insuficiente. Grupo 4: Probable no carcinógeno para los humanos, a la fecha, sólo el caprolactam se encuentra en esta

categoría. En la Tabla 4, se enlistan los HAPs s de mayor importancia por su riesgo sobre la salud y el grupo al que pertenecen.

De las más de 100 moléculas pertenecientes a este grupo, 16 se consideran las de mayor riesgo para la salud humana, tomando en consideración la información disponible, los estudios realizados a la fecha, el riesgo de exposición y el impacto en la salud. La EPA por su parte, publicó en la 14° edición del reporte The U.S. National Toxicology Program la clasificación de los HAPs como carcinógenos (U.S. Department of Health and Human Service, 2016).

Tabla 4. HAPs de mayor riesgo para la salud humana (Elaboración propia con datos de IARC, 2018)

		CLASIFICACIÓN IARC
HAPs	acenafteno	3
	antraceno	3
	benzo[a]antraceno	2B
	benzo[a]pireno	1
	benzo[e]pireno	3
	benzo[b]fluorantreno	2B
	benzo[g,h,i]perileno	3
	benzo[j]fluoranteno	2B
	benzo[k]fluoranteno	2B
	criseno	2B
	dibenzo[a,h]antraceno	2A
	fluoranteno	3
	fluoreno	3
	indeno[1,2,3-c,d]pireno	2B
	fenantreno	3
	pireno	3

IARC: International Agency for Research on Cancer
Grupo 1: carcinógeno para el ser humano.
Grupo 2A: Probablemente carcinógeno para los humanos.
Grupo 2B: Posiblemente carcinógeno para los humanos
Grupo 3: Carcinogenicidad no clasificable.

Los HPAs se consideran carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos presentando toxicidad en todos los seres vivos (Wang *et al.*, 2015). Los principales efectos para el ser humano son: cáncer de piel, pulmón y vejiga. El potencial carcinógeno de los HAPs se ha asociado a la complejidad de la molécula. Al ser lipofílicas, atraviesan fácilmente las membranas celulares por difusión pasiva, posteriormente, se activan metabólicamente por las isoenzimas del citocromo P450 y otras enzimas a fenoles, catecoles y o-quinonas, resultando en la formación de

dioles-epóxidos, radicales catiónicos y/o sustancias reactivas, que actúan sobre las biomoléculas formando aductos y estrés oxidativo (Gao, *et al*. 2018).

La biotransformación de los HAPs se lleva a cabo por 4 vías principales (Morthy *et al.*, 2015):

a) CYP1A1/1B1 – epóxido hidrolasa. Involucra tres reacciones principales, la oxidación de un doble enlace catalizado por una isoenzima del citocromo P450, la molécula resultante es inestable, por lo que sufre una hidrólisis por la enzima microsomal epóxido hidrolasa a un dihidrodiol *trans*. Por último, una segunda CYP cataliza la oxidación del doble enlace adyacente generando un diol-epóxido adyacente, el cual es electrofílicamente capaz de formar aductos con el DNA con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. Este mecanismo se considera la vía principal de activación de la mayoría de los HAPs y la complejidad se incrementa debido a que los enlaces aromáticos de los HAPs son proquirales, es decir, durante la activación metabólica se forman estereoisómeros. La composición de epóxidos y dioles formados durante el metabolismo depende de la estereoselectividad de la isoenzima participante.

b) CYP peroxidasa. Formación de radicales catiónicos. Ocurre cuando el HAPs pierde un electrón vía oxidación catalizada por una peroxidasa o la presencia de oxidantes. Estos radicales son electrofílicos por naturaleza, capaces de interactuar con los centros nucleofílicos de las macromoléculas. Debido a la complejidad de alcanzar las condiciones bioquímicas para formar un catión relativamente estable no se considera un mecanismo principal.

c) Aldo-ceto reductasa. Desde 1980, se considera el tercer mecanismo de activación de los HAPs. Bajo condiciones fisiológicas, la enzima dihidrodiol deshidrogenasa, perteneciente a la superfamilia de aldo-ceto reductasas, compite con el citocromo para oxidar al HAPs siendo $NADP^+$ dependiente, e involucra la formación de un catecol por la acción de la dihidrodiol deshidrogenasa, y posteriormente, ocurre una autooxidación del catecol (inestable) a una o-quinona. Estudios recientes, muestran que las HAPs-o-quinonas son altamente reactivas con aceptores Michael que pueden formar aductos de DNA. Aunado a lo anterior, la actividad óxido-reductora del HAPS-o-quinona se puede disminuir para obtener nuevamente el catecol por una reducción no enzimática o permitir la formación del radical aniónico semiquinona por una reducción enzimática. En este proceso, se generan especies reactivas de oxígeno las cuales producen daños irreversibles a las macromoléculas.

d) Formación del éster de ácido sulfúrico. Para algunos HAPs con sustituyentes metilo, puede llevarse a cabo la hidroxilación de los grupos meso-metilo con la formación de ésteres bencílicos altamente reactivos y carcinógenos.

La formación de aductos de DNA produce errores en la replicación, así como alteración en los promotores de la metilación o unión. Teniendo como

consecuencias mutaciones y expresión anormal de genes; por otro lado, pueden formarse aductos con proteínas, alterando la función de las mismas y la producción de radicales libres que atacan directamente a los lípidos y otras macromoléculas, estas consecuencias incrementan el potencial carcinogénico de los HAPs.

Los efectos adversos no carcinógenos de los HAPs incluyen: dermatitis, enfisema, disfunción del sistema inmunitario, disminución de la fertilidad y malformaciones (bajo peso al nacer, alteraciones en el crecimiento y desarrollo). Diversos estudios han reportado el riesgo de cáncer ocupacional, dentro de los que destacan, de pulmón y piel, y existe evidencia de cáncer en vejiga, boca y garganta, así como en sangre.

4.4 Hidrocarburos halogenados cíclicos y alifáticos

Los encontramos en limpiadores, fluidos correctores de máquina de escribir, propelentes para aerosol (Cochrane, 2018). En la molécula se incluyen halogenados como Cl, Br, I, F, por ejemplo, el tetracloruro de carbono y el diclorometano. Son líquidos volátiles muy liposolubles que se absorben fácil y rápidamente por vía inhalatoria, cutánea o digestiva. Son sustancias irritantes de piel y mucosas. Este grupo cuenta con un gran número de actividad depresora del SNC y rango de seguridad estrecho que fácilmente ocasiona depresión cardiorrespiratoria. La exposición aguda puede ocasionar efectos cardiovasculares que incluyen arritmias, edema intersticial, hemorragias, miocarditis, fibrosis; hepatoxicidad y nefrotoxicidad extensas.

4.5 Destilados.

Dentro de este grupo de hidrocarburos se incluye una amplia gama de productos obtenidos de la destilación o fraccionamiento del petróleo crudo, los cuales presentan baja viscosidad y alta volatilidad. Incluye principalmente a la gasolina, los aceites lubricantes, el queroseno y los combustibles líquidos. La importancia epidemiológica de estos productos radica en la gran disponibilidad doméstica de los mismos, como los limpiadores, combustibles, aromatizantes, solventes de pinturas, insecticidas, productos cosméticos, lustradores de metales o madera, combustibles para automóviles y otros. Su forma de exposición más frecuente es la ingestión seguida del contacto con piel y mucosas. La colocación de estos productos en recipientes de bebidas o alimentos, contribuye a la exposición accidental principalmente de la población pediátrica e infantil.

Su principal toxicidad radica en el efecto local, si la exposición fue por inhalación, se produce una disfunción del factor surfactante, así como una disminución de la capacidad pulmonar e hipersecreción de mucosas. El daño sobre los pulmones resulta en inflamación, edema y necrosis, así como una respuesta inflamatoria exacerbada, y como consecuencia, se presentará hipoxia y broncoespasmos. Aunque la absorción por piel y gastrointestinal no es muy importante, se presentan efectos sistémicos incluyendo cardiotoxicidad, hepatoxicidad, nefrotoxicidad así como depresión neurológica, relacionada más a la hipoxia por la neumonitis química que a efectos directos del tóxico sobre el sistema nervioso central. El manejo del paciente intoxicado, implicar una descontaminación retirando la ropa contaminada y lavando piel y mucosas.

5. Conclusiones

Los hidrocarburos en México tienen una gran importancia económica y social, por lo que por su utilización y demanda se mantendrán por varios años. Debido a lo anterior, existirán diversas actividades que durante su extracción, procesamiento, trasporte y robo impactarán directamente el ambiente en las zonas donde sea requerido este producto. El suelo contaminado con hidrocarburos, ya sea por emergencias o pasivos ambientales, afectará la calidad de suelo y con ello sus posibles usos impactando directamente en las actividades humanas, pero también se observarán efectos en los ecosistemas modificando la micro y macrofauna que habitan directa o indirectamente en los suelos.

Muchos de los hidrocarburos que afectan la salud humana a partir de la inhalación o ingestión son una mezcla de varias sustancias disponibles tanto en productos naturales como comerciales, capaces de producir dependencia, abuso e intoxicación, y que pueden producir efectos psicoactivos, afectaciones a nivel respiratorio, SNC y sistémico. El riesgo de exposición se debe principalmente a las actividades humanas que amenazan todos los tipos de recursos alimentarios y su toxicidad dependerá de la participación de varias vías de activación metabólica, y a su vez, la significancia de cada vía radica en las características de la o las moléculas que interactúen, la cantidad y el tipo de exposición, así como lo relacionado al organismo: el genoma, el sitio en el que se desarrolla el tumor y el nivel de expresión de las enzimas metabólicas. Por otro lado, es importante resaltar que dado que los hidrocarburos generalmente se presentan en mezclas resulta difícil determinar la sustancia responsable del daño a la salud. En el caso de la contaminación en suelo, se sugiere considerar la ruta suelo-planta-vida silvestre/ humano en las evaluaciones de riesgo para evitar subestimar la exposición y los riesgos toxicológicos. Por lo anterior, es importante identificar estos sitios contaminados por hidrocarburos para realizar oportunamente procesos de remediación para minimizar los riesgos al ambiente y la salud. También será

importante dar un apropiado seguimiento por parte de las autoridades ambientales durante trabajos de restauración hasta la liberación de los sitios.

6. Referencias

Adams-Schroeder, R. H. (2012). "Conceptos básicos para la remediación en base riesgo y determinación de límites máximos permisibles en suelos contaminados por hidrocarburos en el trópico", en L. G. Torres, E. R Bandala y W. R. Villatorio. Eds. *Remediación de Suelos y Acuíferos Contaminados en México* (1-13). México: Universidad Autónoma de Querétaro.

Bansal, V. y Kin, K.H. (2015). Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, 84, 26-38.

Bento, F. M.; Camargo, F. A.; Okeke, B. C. y Frankenberger, W. T. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diésel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology, 96*, 1049-1055.

Cachada, A.; Ferreira Da Silva, E.; Duarte, A.C. y Pereira, R. (2016). Risk assessment of urban soils contamination: The particular case of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*, 551-552, 271-284.

Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. (2018). "Ley General para la prevención y gestión integral de los residuos" [en línea], disponible en http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/263_190118.pdf

Cao, Z.; Wang, M.; Chen, Q.; Zhu, C.; Jie, J.; Li, X.; Dong, X.; Miao, Z.; Shen, M. y Bu, Q. (2018). Spatial, seasonal and particle size dependt variations of PAH contamination in indoor dust and the corresponding human health risk. *The Science of the Total Environment*, 653, 423-430.

CartoCrítica (2017). "Ductos, ¿Por dónde circulan los hidrocarburos en México?" [en línea], disponible en http://www.cartocritica.org.mx/wp-content/uploads/2017/07/CartoCr%C3%ADtica_HBS_MapaDuctos_ALTA.pdf

Castro, A.; Acevedo-Berruecos, D.; Urbieta, J.; Iturbe, R. y Delgado-Rodríguez, O. (2013). Caracterización geoquímica y geoeléctrica de un sitio contaminado por hidrocarburos en el estado de Puebla, México. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, *65*(2), 405-418.

Cavazos-Arroyo, J.; Pérez-Armendáriz, B. y Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, *11*(4), 539-550.

Cochrane Drugs and Alcohol. (2018). "Glossary" [en línea], disponible en https://cda.cochrane.org/glossary

Comisión Nacional de Hidrocarburos (2018). "Reservas de Hidrocarburos" [en línea], disponible en https://portal.cnih.cnh.gob.mx/dashboard-reservas.php

Comisión Nacional de Hidrocarburos (2018b). "Sistema de Información de Hidrocarburos" [en línea], disponible en https://portal.cnih.cnh.gob.mx/dashboard-sih.php

Curtis, J. y Sergent, S.R. (2018). "Hydrocarbon Toxicity" [en línea], disponible en https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499883/

De la Cruz, A. E. (2016). *Análisis de las propiedades de calidad de un crudo*. Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Faculta de Química. México.

Flanagan, R.J. y Ives, R.J. (2001). "Volatile substance abuse". [en línea], disponible en https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1994-01-01_2_page007.html#bf015

Gao, P.; da Silva, E.; Hou, L.; Denslow, N. D.; Xiang, P. y Ma, L. Q. (2018). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. Environment International, 119, 466–477.

García-Segura, D.; Castillo-Murrieta, I. M.; Martínez-Rabelo, F.; Gomez-Anaya, A.; Rodríguez-Campos, J.; Hernández-Castellanos, B.; Contreras-Ramos, S. M. y Barois, I. (2017). Macrofauna and mesofauna from soil contaminated by oil extraction. *Geoderma*, *332*, 180-189.

Geissen, V.; Gomez-Rivera, P.; Lwanga, E.H.; Mendoza, R.B.; Narcias, A.T. y Marcias, B. (2008). Using earthworms to test the efficency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. *Ecotoxicology Environmental Safety*, *71*, 638-642.

Hasan, S. W.; Ghannam, M. T. y Esmail, N. (2010). Heavy crude oil viscosity reduction and rheology for pipeline transportation. *Fuel*, *89*(5), 1095-1100.

Hernández, M. D. (2017). *La producción petrolera mexicana: Análisis histórico y escenario a futuro*. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Geociencias. México.

Himmel, H.M. (2008). Mechanisms involved in cardiac sensitization by volatile anestehtics: general applicability to halogenated hydrocarbons? *Critical Reviews in Toxicology*, 38 (9),773-803.

Horace, W, y Gerarde M.D. (1963). Toxicological Studies on Hydrocarbons, *Archives of Environmental Health: An International Journal, 6*(3), 329-341.

Hunt, L.J.; Duca, D.;Dan, T. Y Knopper, L.D. (2018). Petroleum hydrocarbon (PHC) uptake in plants: A literature review. Environmental Pollution. 245,472-484.

International Agency for Research Cancer. World Health Organization (2018). "List of classifcations". [en línea], disponible en https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/

International Energy Agency (2016). "World Energy Balances" [en línea], disponible en https://www.iea.org/statistics/balances/

Islas-García, A.; Vega-Loyo, L.; Aguilar-López, R.; Xoconostle-Cázares, B. y Rodríguez-Vázquez, R. (2015). Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *50*(2), 99-108.

Iturbe, R.; Flores, R. M.; Flores C. R. y Torres L.G. (2004). TPH contaminated Mexican refinery soil: Health risk assessment and the first year of changes. *Environmental Monitoring and Assessment*, *91*(1-3), 237-255.

Iturbe, R.; Flores, C.; Flores, R. M. y Torres L. G. (2005). Subsoil TPH and other petroleum fractions-contamination levels in an oil storage and distribution station in north-central Mexico. *Chemosphere*, *61*, 1618-163.

Iturbe R.; Flores, R.M.; y Torres, L.G. (2006). Análisis de riesgo a la salud de una instalación petrolera del Suroeste de México. Ingeniería Investigación y Tecnología. 1,1-15.

Iturbe, R.; Flores, C.; Castro A. y Torres L. G. (2007). Sub-soil contamination due to oil spills in six oil-pipeline pumping stations in northern Mexico. *Chemosphere*, *68*, 893-906.

Iturbe, R.; Flores, C.; Castro A. y Torres L. G. (2007b). Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, *133*, 387-398.

Jánska, M.; Hajslová, J.; Tomaniová, M,: Kocourek, V. y Vávrova, M. (2006).

Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables grown in the Czech Republic. *Bulletin of Environemntal Contamination and Toxicology,* 77:492-499.

Lavelle, P.; Spain, A.; Blouin, M.; Brown, G.; Decaëns, H.; Grimaldi, M.; Jiménez, J.; McKey, D.; Mathieu, J.; Velasquez, E. y Zangerlé, A. (2016). Ecosystem engineers in aself-organized soil: a review of concepts and future research questions. *Soil Science*, *181*, 91-109.

Lladó, F. S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas*. Doctorado. Universitat de Barcelona. España.

Llamas, V. J. y Pérez G. G. (2013). "Remediación y revitalización del predio de los extalleres de Ferrocarriles Nacionales de México en Aguascalientes, Aguascalientes y su conversión en el Parque Complejo Ferrocarrilero Tres Centurias", en W. Schmidt, R. M. Flores y U. Ruíz-Saucedo. Eds. *Remediación y Revitalización de Sitios Contaminados: Casos Exitosos en México* (1-44). México: GIZ-SEMARNAT.

Martínez, M. V. E. y López, S. F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*, *19*, 9-17.

McKew, B. A.; Coulon, F.; Osborn, A. M.; Timmis, K. N. y McGenity, T. J. (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary UK. *Environmental Microbiology*, *9*, 165-176.

Morthy, B.; Chu, C. y Carlin D. J., (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicological Sciences*, 145,(1) 5–15.

Mowry, J.B.;Spyker, D.A.; Cantinela, L.R.; Bailey, J.E. y Ford, M. (2013). 2012 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 30th Anual Report. *Clinical Toxicology*, 51, 949-1229.

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. "Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación", [en línea], disponible en https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/6646/1/nom-138-semarnat.ssa1-2012.pdf

NRC (1983). National Research Council. Risk Assessment in the Federal Goverment: Managing the Process. National Academy Press.Washington D.C., USA.

Ocampo, P. E. (2006). Encarecimiento del petróleo: Preludio del agotamiento. *Elementos*, *63*(13), 53-59.

Ortínez-Brito, O.; Ize-Lema, I. y Gavilán-García, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica, 69*, 83-92.

Ortíz-Salinas, R.; González, G.D.; Bermudez, B.S.; Tolentino, R.G y Vega Y León, S. (2010). Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in apple in rural terrains from Mexico City. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2),179-83.

PEMEX (2013). "Anuario Estadístico. México" [en línea], disponible en http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico-2013_131014.pdf

Perry, H.; Burns, M. y Willey, J.F.(2018). "Inhalant abuse in children and adolescents" [en línea], disponible en https://www.uptodate.com/contents/inhalant-abuse-in-children-and-adolescents.

Ponce, V. G. y Botello, A. V. (2005). "Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México", en A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández. Eds. *Golfo de México*: *Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias* (269-297). México: Universidad Autónoma de Campeche.

Qu, C.; Li, B.; Wu, H.; Wang, S. y Giesy, J.P. (2015). Multi-pathway assessment of human health risk posed by polycyclic aromatic hydrocarborns. *Environmental Geochemistry and Health*. 37 (3), 587-601.

Reid, B. J.; Jones, K. C. y Semple, K. T. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments –a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution, 108*, 103-112.

Riegel, A.C.; Zapata, A.; Shippenberg, T.S. y French, E.D.(2007). The abused inhalant toluene increases dopamine reléase in the nucleus accumbens by directly stimulating ventral tegmental área neurons. *Neuropsychopharmacology*, 32(7), 1558-1569.

Riveroll-Larios, J.; Escalante-Espinosa, E.; Fócil-Monterrubio, R. L. y Díaz-Ramírez, I. J. (2015). Biological activity assessment in Mexican tropical soils with different hydrocarbon contamination histories. *Water Air Soil Pollution*, *226*(10), 353.

Secretaria de Energía (2015). "Prospectiva de Petróleo Crudo y Petrolíferos 2015-2029" [en línea], disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44327/Prospectiva_Petroleo_Crudo_y_Petroliferos.pdf

Secretaria de Energía (2017). "Balance Nacional de Energía 2016" [en línea], disponible en

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/288692/Balance_Nacional_de_Energ_a_2016__2_.pdf

Solís-Segura, L. M. y López-Arriaga, J. A. (2003). *Principios básicos de contaminación ambiental*. Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México.

Tormoehlen, L.M.; Tekulve, K.J. y Nañagas, K.A. (2014). Hydrocarbon toxicity: A review. Clinical Toxicology, 52, 479-489.

United States Environmental Protection Agency. (2018). "Human health risk assessment". [en línea], disponible en https://www.epa.gov/risk/human-health-risk-assessment.

Uribe-Hernández, R.; Juárez-Méndez, C. H.; Montes de Oca, M.A.; Palacios-Vargas J. G.; Cutz-Pool, L. y Mejía-Recarmier, B. E. (2010) Colémbolos (Hexápoda) como bioindicadores de la calidad de suelos contaminados con hidrocarburos en el sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *81*(1), 153-162.

U.S. Department of Health and Human Service. (2016). "NTP. National Toxicology Program. Report on carcinogens" [en línea], disponible en https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/index-1.html#toc1

Valdivia-Infantas, M.M. y Quevedo, M.G. (2008). Neuropatía por n-hexano. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 21(4), 174-177.

Vasudevan, N. y Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, *26*, 409-411.

Vázquez-Luna, M.; Montiel-Flores, A.; Vázquez-Luna, D. y Herrera-Tenorio, M. F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosistems*, *13*, 511-523.

Wang, C.; Wu, S.; Xhou, S.L.; Wang, H.; Li, B.;Chen, H.; Yu, Y. y Shi, Y. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from urban to rural areas in Nanjing: Concentration, source, spatial distribution, and potential human health risk. *The Science of Total Environment,* 527-528, 375-383.

Wang, C.; Zhang, X.; Ling, W.; Liu, R.; Liu, J.; Kang, F. y Gao, Y. (2016). Contamination and health risk assesment of PAHs in soils and crops in industrial areas of the Yangtze River Delta Region, China. *Chemosphere,* 168, 976-987.

Weber, L.W.D.; Boll, M. y Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism

of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33,105–136.

Williams, J.F.; Storck. (2007). Inhalant abuse. *Pediatrics*, 119, 1009-1017.

Wretling, S.; Eriksson A.; Eskhult G.A. y Larsson B., (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23(3), 264-272.

Xia, Z.; Duan, X.; Qiu, W.; Liu, D.; Wang, B.; Tao, S.; Jiang, Q,; Lu, B.; Song, Y. y Hu, X. (2010). Health risk assessment on dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taiyuan, China. *The Science of the Total Environment*, 408 (22), 5331–5337.

Zamora, A. C.; Ramos J. y Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, *24*(1), 5-12.

Zavala-Cruz, J.; Gavi-Reyes, F.; Adams-Schroeder, R. H.; Ferrera-Cerrato, R.; Palma-López, D. J.; Vaquera-Huerta, H. y Domínguez-Ezquivel, J. M. (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra Latinoamericana*, *23*(3), 293-302.

Capítulo 13

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS DE LA LAGUNA DE SAN JUAN, ASCENSIÓN, CHIHUAHUA Y SU EVALUACIÓN EN PLANTAs DE *Solanum lycopersicum*

Marisela Yadira Soto-Padilla[1*]

Jorge Deciderio Carrillo-Méndez[1]

Edith Flores-Tavizón[1]

Luis Gerardo Bernadac-Villegas[1]

Sergio Saúl-Solís[1]

Miguel Domínguez-Acosta[1]

Felipe Adrián Vázquez Galvez[1]

[1] Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Instituto de Ingeniería y Tecnología, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México

* marisela.soto@uacj.mx

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *Solanun lycopersicum* en suelos arenoso franco de la Laguna de San Juan, Ascensión, Chihuahua donde se aplicaron los procesos de bioestimulación y bioaumentación a diferentes concentraciones en relación bacteria:humus. Además, se realizó la evaluación fisicoquímica de los suelos tratados en diferentes parámetros, tales como el pH, conductividad eléctrica, nitrógeno (N), calcio (Ca) y magnesio (Mg). Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para los parámetros evaluados al suelo después de aplicar los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Para la evaluación de los efectos en el crecimiento de *Solanum lycopersicum*, se consideró el crecimiento del tallo, el crecimiento del número de hojas y el crecimiento de la raíz; se evaluaron por métodos estadísticos (ANOVA). Se desarrolló un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento 10:20 en relación bacteria:humus presentaba mejores condiciones de suelo, obteniendo como resultado un pH de 10.01, una conductividad eléctrica de 10.33 S/m, calcio y magnesio de 10 Meq/100g de suelo seco. Mientras en el crecimiento de tallo se presentaron dos grupos, donde se incluye el tratamiento 10:20 con resultados significativo. Correspondiente al número de hojas, el tratamiento 10:20 presentó un desarrollo de número de hojas alto, a diferencia con los demás tratamientos; mientras tanto en el crecimiento de la raíz, de la relación 10:20 y 20:20, se agrupan en los tratamientos con mejores resultados.

Palabras clave: Bioestimulación, bioaumentación, suelo salino.

1. Introducción

El suelo actúa en general como una barrera protectora de otros medios más sensibles (hidrológicos, biológicos), filtrando, descomponiendo, neutralizando o almacenando contaminantes. Esta capacidad depuradora de un suelo depende de los contenidos en materia orgánica, carbonatos, oxihidróxidos de hierro, tipo de minerales de la arcilla, capacidad de intercambio catiónico del suelo, textura, permeabilidad y actividad microbiana. Los suelos cuentan con poder amortiguador que representan la capacidad que tienen para controlar los efectos negativos de los contaminantes y volverlos inocuos o inactivos (Huerta & Romero, 2008). El suelo para caracterizarse como fértil, debe de cumplir con ciertos parámetros como por ejemplo pH, conductividad eléctrica, nitrógeno (N), calcio (Ca^{+}) y magnesio (Mg^{+}), entre otros (Hernández *et al.*, 2014).

La salinidad y sodicidad son condiciones de algunos suelos que limitan la producción agrícola ya que provocan que se vuelvan infértiles e improductivos, causando un problema de amplia afectación para la agricultura mundial, principalmente en las regiones áridas y semiáridas (Corwin *et al.*, 2007). En México, el problema de la salinidad se presenta principalmente en las zonas áridas y semiáridas con riego, y a lo largo de las costas. Se estima que la superficie afectada es del orden de 1 millón de ha (Serrato Sánchez *et al.*, 2002). Recientes investigaciones muestran que los suelos dominantes de la región de Ascensión Chihuahua son del tipo Xerosol con fuerte sodicidad o salino-sódicos (Santos & Echaverría, 2004), lo que afecta su utilización para cultivo.

Existen métodos físicos, químicos y biológicos para recuperar los suelos afectados por sales, entre los que destacan la adición de abonos orgánicos que mejoran la estructura y permeabilidad del suelo, el uso de enmiendas químicas basadas en el empleo de sales cálcicas de alta solubilidad que intercambian el sodio por calcio y la aplicación de ácidos o sustancias formadoras de éstos (Aceves, 2011). Las técnicas biotecnológicas, tales como la biorremediación, se consideran una alternativa económica, relativamente sencilla, ambientalmente amigable y aplicable a grandes áreas que permite, bajo condiciones ambientales y edáficas ideales, la mineralización completa de contaminantes a compuestos menos tóxicos o inocuos (Cunningham & Philp, 2000).

La biorremediación es el procedimiento de extracción, eliminado o neutralizado de contaminantes del suelo, agua o aire mediante la utilización de organismos vivos y sus particulares propiedades absorbentes, extractivas, degradadoras, purificadoras o transformadoras de los elementos contaminantes de los diferentes medios en sustancias no tóxicas o desactivadas, tales como metales pesados, hidrocarburos, plaguicidas organoclorados, materiales radiactivos, policlorobifenilos (PCBs) procedentes de transformadores eléctricos o efluentes

lixiviados de vertederos sanitarios urbanos (Cedillo, 2013). Las transformaciones de los contaminantes se logran a través de las capacidades catabólicas de los microorganismos. El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Dombe *et al.*, 2007; Eweis, 1998).

Los organismos utilizados pueden ser bacterias, hongos, o sus enzimas resultantes, así como vegetales seleccionados por sus capacidades de absorción por su sistema radicular, algas azules microscópicas y vegetales modificados producto de manipulación genética. Durante la biorremediación se pueden emplear organismos autóctonos (organismos propios del sitio contaminado) o exógenos (de otros sitios) (Ang *et al.*, 2005; Cedillo, 2013). Una de las alternativas para reducir la salinidad de suelos es el uso de hongos micorrízicos debido a que tienen la habilidad de proteger a las plantas del estrés provocado por la salinidad, pero los mecanismos que ocurren no están muy claros. Debido en parte a que existen pocos estudios referentes a los efectos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) sobre el crecimiento de las plantas bajo condiciones de salinidad y los efectos de esta sobre la colonización micorrízica. No obstante, los pocos datos disponibles indican que estos hongos tienen el potencial de aumentar los beneficios derivados de los cultivos tolerantes a las sales cuando se seleccionan y combinan adecuadamente (Azcón y Barea, 1997). Sin embargo, el rol de las micorrizas en condiciones salinas está aún inconcluso. Pocos estudios han demostrado sus efectos en el ajuste osmótico (Sharifi *et al.*, 2007), pero todos han sido dirigidos a la baja salinidad.

En la biorremediación se aplican diversas técnicas, la bioestimulación y la bioaumentación son dos de sus principales estrategias, siendo la primera definida como la adición de nutrientes, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano, al igual que la estimulación por medio de adición de agua, oxígeno y otros elementos que mejoren el desarrollo de los microorganismos; la bioaumentación, se entiende como la adición de microorganismos endógenos o exógenos a un lugar específico, con el fin de fomentar la degradación y disminuir el tiempo de reducción del contaminante (Cuartas *et al.*, 2014).

En estudios anteriores, se ha obtenido como resultado, que, en Ascensión, Chihuahua existe una alta concentración de iones, deteriorando los suelos para cultivos en dicha región del estado (Domínguez-Acosta & Gill, 2007). Al norte del estado de Chihuahua se encuentra localizado el municipio de Ascensión, en donde se encuentra la Laguna de San Juan (Figura 1). Los suelos de dicha laguna presentan un pH altamente alcalino con valor de 10.22 y se clasifica como fuertemente salino de acuerdo con la conductividad eléctrica presentada de 14.52 S/m (Carrillo-Méndez & Soto-Padilla, 2016).

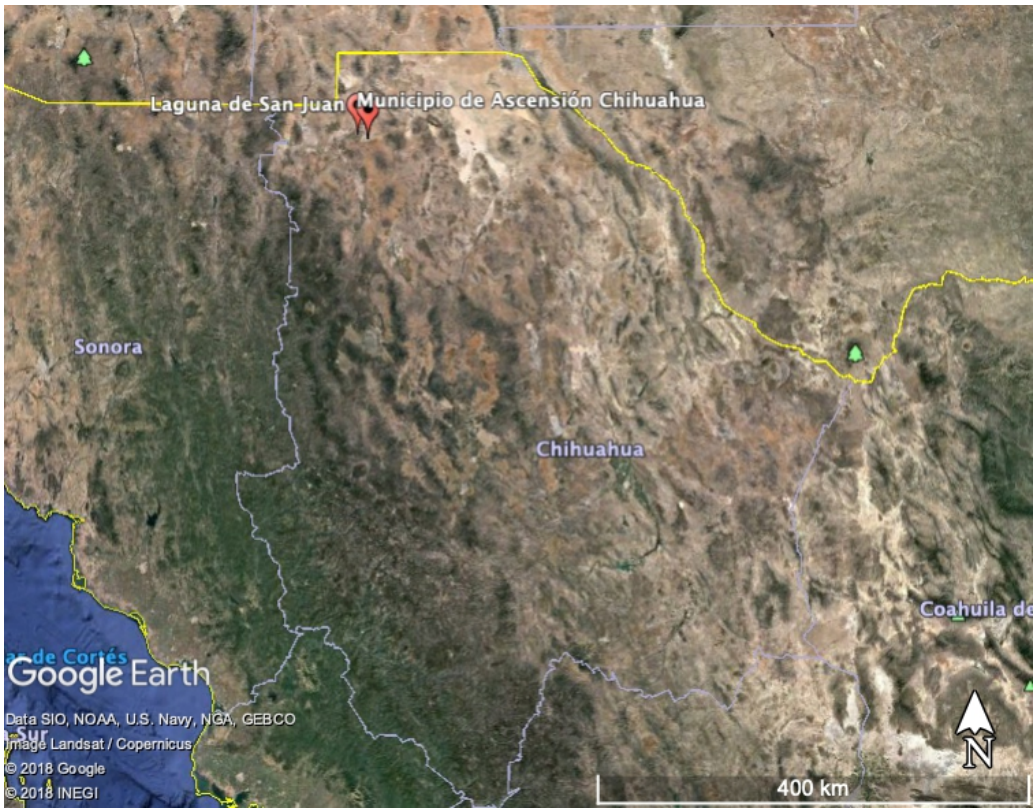


Figura 1. Localización de la Laguna de San Juan en el municipio de Ascensión Chihuahua (Google Earth, 2019).

Durante los últimos años, ha sido objeto de intensa investigación la evaluación de tratamientos biológicos enfocados a recuperar suelos desgastados provenientes de actividades agrícolas (algodón y chile principalmente), ya que el desgaste de estos mismos se da principalmente por el uso excesivo de agroquímicos y fertilizantes (Suja *et al.*, 2014; Vallejo *et al.*, 2010). Líneas de investigación han llevado a la introducción de microorganismos aclimatados o incluso modificados genéticamente en el medio, con el fin de mejorar la biodegradación o la fertilidad del suelo, siendo objeto de estudio y de aplicación de técnicas biotecnológicas como fuente alterna a una remediación (Atlas & Unterman, 1999).

De acuerdo con algunos investigadores, aplicando las técnicas de bioaumentación en suelos con cultivo de plantas de ornato y tomate, las cepas *Pseudomonas* sp., *y Bacillus* sp., han presentado incrementos significativos en la longitud del tallo, biomasa de la planta y numero de hojas, al igual que un rendimiento mayor en diferentes ambientes de estrés (Luna *et al.*, 2013; Sánchez *et*

al., 2012). El objetivo de este estudio es evaluar los procesos de bioestimulación y bioaumentación en suelos de la Laguna de San Juan en Ascensión, Chihuahua, así como su biorremediación en el cultivo y desarrollo de plantas de *Solanum lycopersicum*.

2. Material y métodos

2.1. Suelo

El muestreo de suelo de la laguna San Juan, en Ascensión, Chihuahua se realizó en las coordenadas 31° 03' 28.12" N y 107° 53' 28.79" W, abarcando una superficie de 20 hectáreas (Figura 2). La colecta del suelo se determinó mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.



Figura 2. Punto de muestreo en la Laguna de San Juan (Google Earth, 2019).

La forma en cómo se colectaron las muestras fue al azar, tomando 4 puntos de muestreo a una distancia de 50 m entre cada punto. La norma señala que el muestreo de suelos es un procedimiento para obtener una o más muestras representativas del terreno, de igual manera nos indica que el lugar de muestreo debe ser un área donde el tipo de suelo en cuanto a textura, color, pendiente, etc., sea aparentemente homogéneo, el número de muestras varía dependiendo de la heterogeneidad y tamaño de la unidad de muestreo. Las muestras fueron recolectadas en bolsas de polietileno asépticamente a partir de una capa de 5-50

cm suelo; éstas fueron almacenadas en una hielera a una temperatura de 4°C para ser transportadas al laboratorio para su posterior análisis.

Se determinó la composición granulométrica del suelo (arena, limo y arcilla), pH y conductibilidad eléctrica. Estas variables se determinaron con métodos de laboratorio recomendados por la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (Tabla 1) (SEMARNAT, 2003).

Tabla 1. Tipos de análisis realizados a la muestra inicial, según la NOM-021-SEMARNAT-2000. Elaboración propia.

Análisis	Método	Técnica
Textura del suelo	AS-09	Procedimientos de Bouyoucos
pH	AS-02	Electrométrica
Conductividad	AS-18	Electrolítica

2.2. Obtención de cultivo puro y consorcio microbiano enriquecido

Se pesaron 10 g de suelo y se incubaron a 37°C por 21 días a 200 rpm en caldo nutritivo (DIFCO) suplementado con cloruro de sodio (NaCl) a una concentración de 5 mg/L. Se tomaron muestras del medio de cultivo al tiempo 0, 3, 7 y 14 días de incubación. Las muestras recolectadas se cultivaron en cajas Petri con agar nutritivo y 5 mg/L de NaCl, para lo cual se realizaron diluciones seriadas del orden 10^6. Se seleccionaron colonias morfológicamente diferentes para realizar su aislamiento en nuevas cajas Petri usando estría escocesa (Soto-Padilla *et al.*, 2014). Se preparó la solución microbiana con una mezcla de las cepas aisladas en un volumen de 2.5 L de agua destilada con una densidad óptica de 0.6 para la aplicación en los tratamientos de ensayo.

2.3. Bioestimulación (humus)

El humus utilizado se proporcionó por el rancho "El Regalo", ubicado en 31° 30' 40.1" N 107° 43' 02.8" W donde se prepara a partir de estiércol de borrego y lombriz roja californiana.

2.4. Ensayos de bioestimulación y bioaumentación

Se desarrolló un diseño experimental 3^2 con la aplicación de procesos de bioestimulación (humus) con 3 niveles (0, 10 y 20 mL) en macetas que contenían 300 g de suelo de la Laguna de Ascensión, Chihuahua; para el proceso de bioaumentación se aplicaron 3 niveles (0, 10 y 20 mL) de la solución microbiana con

densidad óptica de 0.6 en macetas que contenían 300 g de suelo de la Laguna de Ascensión, Chihuahua. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. El tratamiento experimental se adicionó dos veces por semana por 30 días, en condiciones de temperatura y humedad normal, ya que se realizó en un espacio abierto dentro de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ).

2.5. Procedimientos analíticos y evaluación de desarrollo de la planta Solanum lycopersicum

Se determinaron parámetros fisicoquímicos de los suelos: pH, conductividad eléctrica, nitrógeno total, calcio y magnesio (Fernández, 2006). La evaluación del desarrollo de la planta de *Solanum lycopersicum* correspondió al estudio (Figura 3) usando plántulas de tomate que fueron germinadas en sustrato de Peat Moss y fueron trasplantadas a los suelos tratados teniendo un crecimiento aproximado del tallo de 5 cm (ver Figura 3-A). Para cada tratamiento aplicado se le asignaron 3 plántulas para evaluar la eficiencia en la estimulación del crecimiento. La evaluación del crecimiento de la planta *Solanum lycopersicum* se realizó durante un período de 50 días.



Figura 3. Desarrollo de la planta de *Solanum lycopersicum* (A) trasplante a suelos para el tratamiento (5 cm), (B y C) crecimiento de la planta durante el periodo de evaluación.

De los experimentos se midieron los parámetros de longitud de la raíz (cm), hojas (#) y tallo (cm). La raíz se evaluó al inicio del trasplante y al final de la experimentación, el crecimiento del tallo y número de hojas se realizó cada 7 días.

2.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa de Sthatgraphics Centuryon XVI, se aplicó un análisis de varianza ANOVA y una comparación múltiple por la prueba LSD para los tratamientos.

3. Resultados

En la Tabla 2 se detallan los resultados de la composición granulométrica del suelo; los suelos de dicha laguna presentaron un pH altamente alcalino con valor de 10.22 y de acuerdo con la conductividad eléctrica presentada, de 14.52 S/m, se clasifica como fuertemente salino.

Tabla 2. Características de la composición granulométrica de la muestra de suelo. Elaboración propia.

Clase Textural	Arenoso-Franco
Arena	80.04%
Arcilla	9.96%
Limo	10%

Los análisis fisicoquímicos realizados a los suelos después de los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación se muestran en las Figuras 4 a la 7. Los resultados del ANOVA de cada uno de los parámetros analizados se muestran en las Tablas 3, 5, 7 y 9. Las pruebas de rangos múltiples las observamos en las Tablas 4 y 8.

Tabla 3. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en la concentración (Meq/100g de suelo seco) de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Elaboración propia.

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	1600.00	200.0	4.00	0.027
Error residual	450.0	50.0		
Total	2050.0			

Tabla 4. Análisis de prueba de rangos múltiples (LSD) del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en la concentración (Meq/100g de suelo seco) de Ca^{2+} y Mg^{2+}. Elaboración propia.

Tratamiento (Bacterias:Humus)	Media LSD	Grupos Homogéneos
10:10	20.0	a
10:20	20.0	a
20:20	30.0	ab
0:10	35.0	abc
0:00	40.0	bc
0:20	40.0	bc
20:10	40.0	bc
10:00	40.0	bc
20:00	50.0	c

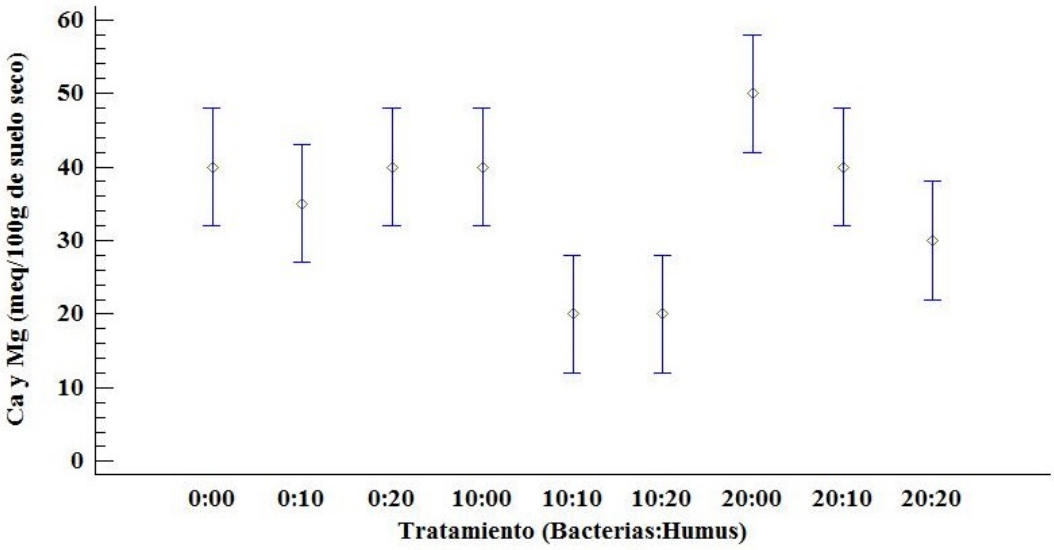


Figura 4. Concentración (Meq/100g de suelo seco) media y error estándar de Ca^{2+} y Mg^{2+} en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

En la Figura 4 se identificaron las concentraciones de Ca^{+2} y Mg^{+2}, donde se visualiza que el tratamiento 10:10 y 10:20 presentaron valores muy similares, los más bajos observables, demostrando una reducción en la concentración de estos valores al aplicar bacterias y nutrientes adicionados en el humus. La Tabla 3 presenta el

análisis de varianza realizado donde se puede discutir que el valor-P prueba la significancia estadística de cada uno de los tratamientos, puesto que el valor-P fue menor de 0.05. La aplicación de los diferentes tratamientos (Bacterias:Humus) tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el Ca^{2+} y Mg^{2+} (Meq/100g de suelo seco) con un 95.0% del nivel de confianza.

Por otro lado, la prueba de rangos múltiples aplicada (Tabla 4) verificó la conformación de tres grupos con base en la distribución de medias por la prueba LSD de Fisher, coincidiendo con lo que se visualiza en la Figura 4, las medias de los tratamientos 10:10 y 10:20 conforman el grupo con el menor valor de medias.

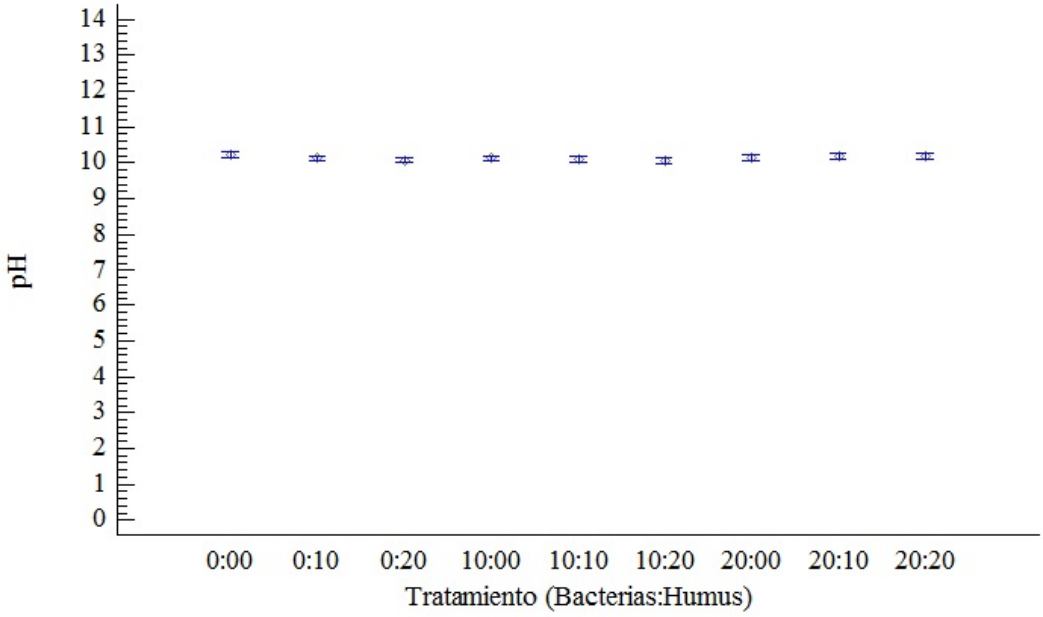


Figura 5. Valores de pH (media y error estándar) presentado en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 5. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el pH. Elaboración propia.

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	0.0503444	0.00629306	1.34	0.3330
Error residual	0.04215	0.00468333		
Total	0.0924944			

Con los valores de pH que presentaron cada uno de los tratamientos se demostró que existe un rango en los suelos entre 10.01 a 10.31 (Figura 5). En la Tabla 5 se muestra el análisis de varianza de varios factores para pH, donde se puede observar que el valor-P que muestra la significancia estadística de cada uno de los factores, es mayor a 0.05. Con lo anterior, se establece que ninguno de los tratamientos (Bacterias:Humus) aplicados en el suelo tiene un efecto estadísticamente significativo sobre pH con un 95.0% de nivel de confianza.

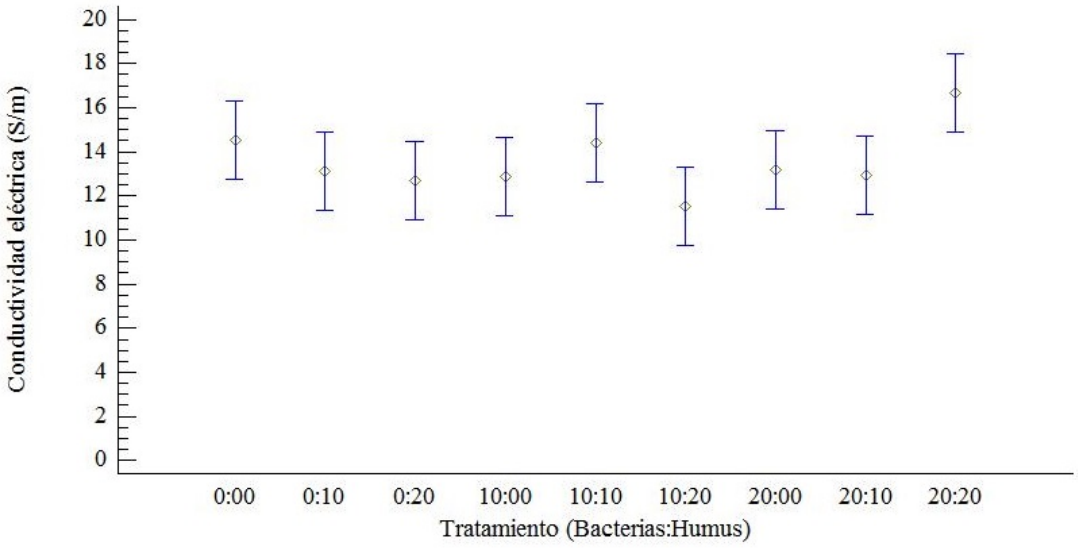


Figura 6. Conductividad eléctrica media y error estándar presentada en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 6. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en la conductividad eléctrica. Elaboración propia.

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	34.9296	4.36621	1.78	0.2045
Error residual	22.106	2.45622		
Total	57.0356			

Con respecto a la conductividad eléctrica analizada en los suelos después de la aplicación de los tratamientos (Bacterias:Humus), se puede observar en la Figura 6

que el tratamiento 10:20 presentó una disminución mínima de los valores iniciales del suelo sin tratamiento. En el análisis de varianza se puede determinar con respecto al valor-P que se muestra en la Tabla 6, que existe una diferencia insignificante en la aplicación de los tratamientos al suelo, coincidiendo con lo que se muestra en la Figura 6 dónde se observan valores muy similares en todos los resultados de los tratamientos.

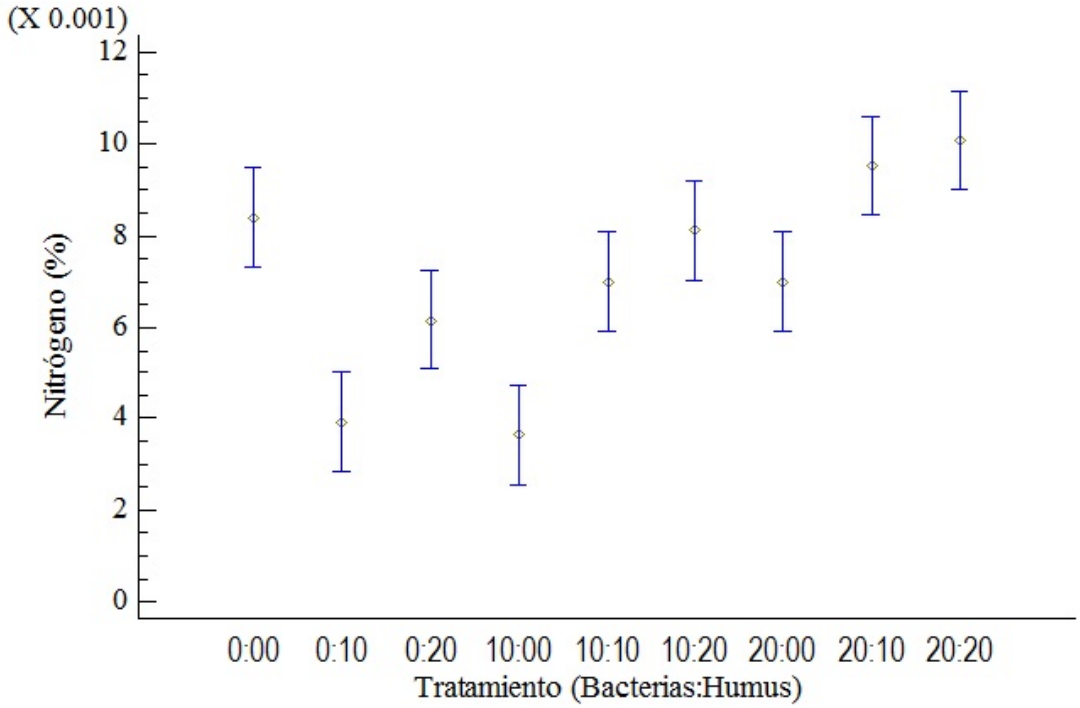


Figura 7. Concentración media y error estándar de nitrógeno (%) presentada en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 7. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en la concentración de nitrógeno. Elaboración propia

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	0.0000809088	0.0000101136	11.16	0.0008
Error residual	0.0000081536	9.05956E-7		
Total	0.0000890624			

Tabla 8. Análisis de prueba de rangos múltiples (LSD) del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en la concentración de nitrógeno. Elaboración propia

Tratamiento (Bacterias:Humus)	Media LSD	Grupos Homogéneos
10:00	0.00364	a
0:10	0.00392	a
0:20	0.00616	b
20:00	0.007	bc
10:10	0.007	bc
10:20	0.00812	bcd
0:00	0.0084	cd
20:10	0.00952	d
20:20	0.01008	d

En el análisis de nitrógeno realizado, que se observa en la figura 7, se visualiza una disminución del % N presente en las muestras; los tratamientos 20:10 y 20:20 presentaron una diferencia significativa considerando el análisis ANOVA (Tabla 7) y la prueba de rangos múltiples realizada (Tabla 8).

En las Figuras de la 8 a la 10 se muestran los resultados del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el desarrollo de la planta de *Solanum lycopersicum*, de la misma manera se agregan las tablas correspondientes a los análisis ANOVA realizados (Tablas 9, 11 y 13). En las Tablas 10, 12 y 14 se puede observar el análisis de prueba de rangos múltiples (LSD) del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) evaluados en el crecimiento de la planta.

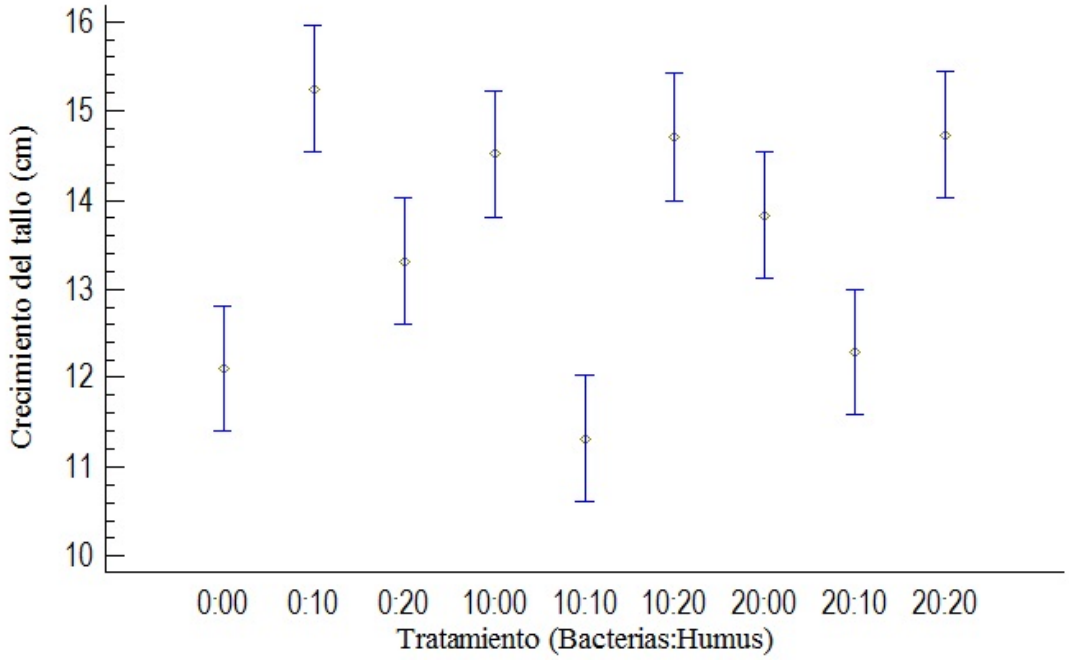


Figura 8. Media y error estándar del crecimiento de tallo de la planta de *Solanum lycopersicum* desarrollada en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 9. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el crecimiento del tallo de la planta de *Solanum lycopersicum*. Elaboración propia.

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	369.125	46.1406	7.43	0.0000
Tiempo	4011.91	573.129	92.26	0.0000
Error residual	1242.37	6.21187		
Total	5623.41			

Tabla 10. Análisis de prueba de rangos múltiples (LSD) del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el crecimiento del tallo de la planta de *Solanum lycopersicum*. Elaboración propia.

Tratamiento (Bacterias:Humus)	Media LSD	Grupos Homogéneos
10:10	11.3125	a
0:00	12.1042	ab
20:10	12.2917	ab
0:20	13.3125	bc
20:00	13.8333	cd
10:00	14.5208	cd
10:20	14.7083	cd
20:20	14.7292	cd
0:10	15.25	d

El crecimiento del tallo de la planta *Solanum lycopersicum* presentado en la Figura 8 se correspondió con el comportamiento obtenido del análisis de varianza que se muestra en la Tabla 9. Lo anterior indica que existe una diferencia significativa en el crecimiento del tallo de la planta *Solanum lycopersicum* con respecto a cómo transcurren los periodos de tiempos y el efecto que presentan los tratamientos (Bacterias:Humus), esto se confirma en la formación de cuatro grupos diferentes (a, b, c y d) en la pruebas de rangos múltiples (Tabla 10) que analiza el crecimiento del tallo (cm) por tratamiento (Bacterias:Humus). La adición de humus incrementa los valores de medias dentro del grupo con mayor crecimiento del tallo.

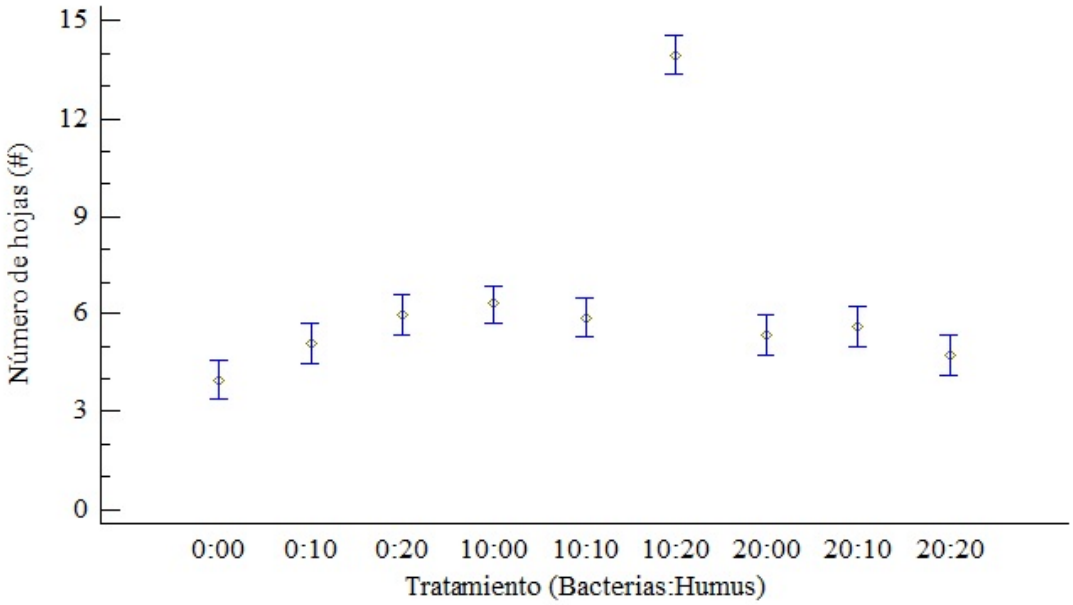


Figura 9. Número de hojas (media y error estándar) en la planta de *Solanum lycopersicum* crecida en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 11. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el número de hojas de la planta de *Solanum lycopersicum*. Elaboración propia

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	1677.42	209.677	46.59	0.0000
Tiempo	1656.35	236.622	52.58	0.0000
Error residual	900.065	4.50032		
Total	4233.83			

Tabla 12. Análisis de prueba de rangos múltiples del efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el número de hojas de la planta *Solanum lycopersicum*. Elaboración propia

Tratamiento (Bacterias:Humus)	Media LSD	Grupos Homogéneos
0:00	3.95833	a
20:20	4.70833	ab
0:10	5.08333	abc
20:00	5.33333	bcd
20:10	5.58333	bcd
10:10	5.875	bcd
0:20	5.95833	cd
10:00	6.29167	d
10:20	13.9583	e

Con respecto al desarrollo de números de hojas en la planta *Solanum lycopersicum* por efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) el tratamiento 10:20 fue el que presentó el mayor desarrollo de hojas como se muestra en la Figura 9; coincidiendo lo que se muestra en la figura con el análisis ANOVA presentado en la Tabla 11. Con la prueba de rangos múltiples (Tabla 12) se identificaron la conformación de cinco grupos en los valores de las medias (a, b, c, d y e), con el valor medio máximo presentado en el tratamiento 10:20.

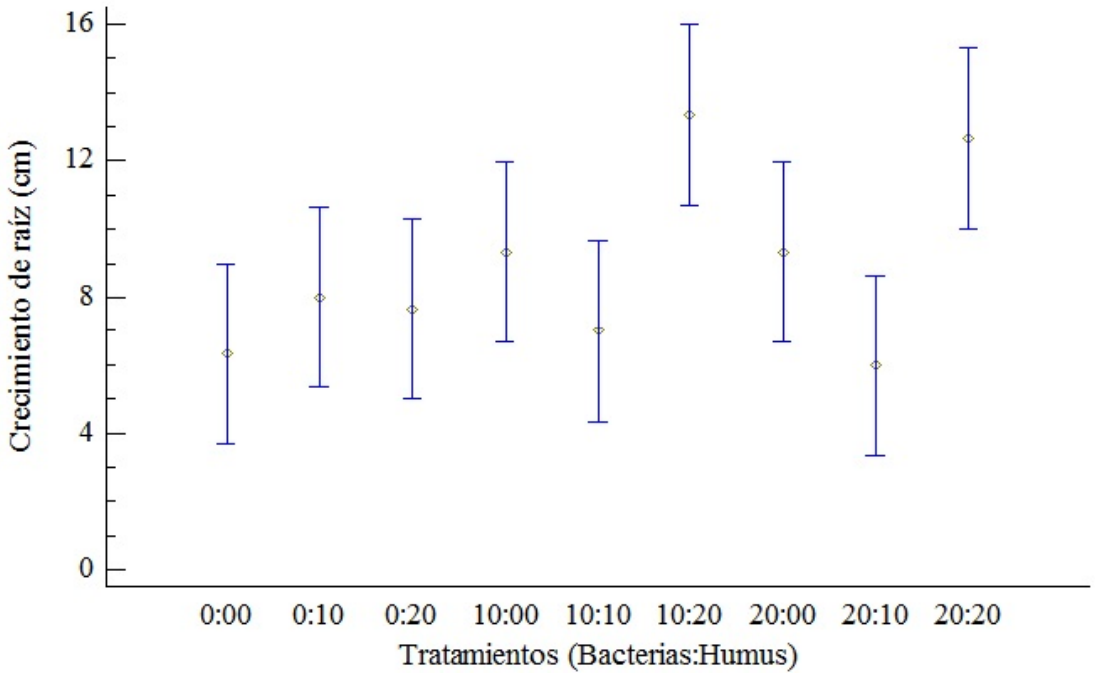


Figura 10. Desarrollo de la raíz (media y error estándar) en la planta de *Solanum lycopersicum* crecida en los suelos después de aplicado los tratamientos de bioaumentación y bioestimulación.

Tabla 13. Análisis ANOVA para el efecto de los tratamientos (Bacterias:Humus) en el crecimiento de la raíz de la planta de *Solanum lycopersicum*. Elaboración propia

Fuente	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento (Bacterias:humus)	369.125	46.1406	7.43	0.0000
Tiempo	4011.91	573.129	92.26	0.0000
Error residual	1242.37	6.21187		
Total	5623.41			

Tabla 14. Pruebas de Rangos Múltiples (LSD) para crecimiento de raíz (cm) por tratamiento (Bacterias:Humus). Elaboración propia

Tratamiento (Bacterias:Humus)	Media LSD	Grupos Homogéneos
20:10	6.0	a
0:00	6.33333	a
10:10	7.0	a
0:20	7.66667	ab
0:10	8.0	ab
20:00	9.33333	abc
10:00	9.33333	abc
20:20	12.6667	bc
10:20	13.3333	c

En la figura 10 se muestra que existe un grupo que presentó mayor crecimiento de la raíz, siendo los tratamientos 10:20 y 20:20, con respecto a los demás. De tal manera que los demás tratamientos quedan en el siguiente grupo, presentando una similitud en el crecimiento de esta misma. La diferencia que se muestra en el análisis de varianza (Tabla 13) y prueba de rangos múltiples, coinciden en la inexistencia de una diferencia significativa entre los tratamientos 10:20 y 20:20 (Tabla 14).

4. Discusión

La presente investigación se realizó a nivel laboratorio y se logró la caracterización fisicoquímica de los suelos utilizados; según la clasificación del Triángulo Textural de la USDA se identifica como un suelo Arenoso-Franco. Las muestras colectadas presentaron un pH alcalino y una conductividad eléctrica de 14.52 S/m, ricos en minerales como calcio y magnesio, tal y como se muestran en las Figuras (4, 5 y 6). Por lo tanto, los suelos presentaron una viabilidad de aplicación de las técnicas de bioaumentación y bioestimulación para la disminución de sales y aumentar la fertilidad de los suelos.

Al llevar a cabo las técnicas de bioaumentacion y bioestimulacion de los suelos, aplicando una mezcla de microorganismos aislados de la misma Laguna de San Juan, y el humus proporcionado por el Rancho "El Regalo", se observó que de acuerdo a la concentración 10:20 en relación bacteria:humus, presenta una disminución en la concentración de sales, al igual que la disminución del pH y la conductividad eléctrica. Al desarrollar la evaluación del crecimiento de *Solanum lycopersicum* en suelos tratados a nivel laboratorio, transcurrido los 80 días de evaluación, contando el tiempo de germinación, se corrobora que el crecimiento del tallo, el número de hojas y la raíz coincidieron con los resultados obtenidos en la evaluación fisicoquímica, mostrando así que el tratamiento 10:20 fue el más eficiente para el crecimiento de *Solanum lycopersicum*.

Al tener suelos con concentraciones de sal elevados, el efecto en la reproducción de las plantas de *Solanum lycopersicum* se vieron afectados, mostrando una disminución en el crecimiento de las raíces, esta característica conduce a una limitación en la absorción de agua y nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta. Al mismo tiempo, el tener concentraciones tolerantes para el desarrollo de *Solanum lycopersicum*, ayudó de forma positiva en los efectos organolépticos y en el fruto de las plantas, influyendo como factor los pH ácidos y las concentraciones altas de nitrógeno (Goykovic & Saavedra, 2007; Tester & Davenport, 2003; Vallejo *et al.*, 2010). Existen reportes donde se ha demostrado que la planta de *Solanum lycopersicum* se ve favorecida en un medio de pH entre 6 y 7.5, propiciando un mayor crecimiento de tallo, numero de hojas y raíz. Sin embargo, a condiciones de pH mayor a 8, se observó que el crecimiento de tallo y número de hojas disminuyó hasta un 35%, pero el crecimiento de la raíz fue favorable aumentando un 12% más (Barbaro *et al.*, 2013; Goykovic & Saavedra, 2007). Cuando la conductividad eléctrica es mayor a 5 S/m, la concentración de sales disueltas es alta, y las plantas desarrollan mayormente su raíz, debido a que deben aumentar el área de contacto para la captación de nutrientes esenciales. Las concentraciones mayores a 15 S/m afectan directamente al crecimiento de la planta, sin embargo, ayudan a funciones organolépticas del fruto (Terry *et al.*, 2005; Cuartero & Fernández, 1998; Singh & Chatrath, 2001).

5. Conclusiones

El mejor tratamiento aplicado por sus condiciones fisicoquímicas fue propiciado por el tratamiento 10:20, quien proporcionó menor cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+}, presentando una disminución en su conductividad y pH, lo que beneficia el desarrollo de las plantas. Este mismo presentó una relación estable con el nitrógeno, por lo cual se puede aplicar procesos de bioaumentación y bioestimulación para la mejora de suelos en la laguna de San Juan, Ascensión,

Chihuahua. El desarrollo de la planta *Solanum lycopersicum* el tratamiento con las concentraciones 10:20 en relación bacteria:humus desde su germinación presentó el mejor crecimiento con respecto a la evaluación del tallo, crecimiento de raíz y número de hojas.

Agradecimientos

Al laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por el apoyo brindado en el uso de sus instalaciones y equipos.

6. Referencias

Aceves, N. (2011). El ensalitramiento de los suelos bajo riego. Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas A.C. México, D. F. (No. 631.416 A2E5 2011).

Ang, L., Zhao, H., & Obbard, P. (2005). Recent advance in the biorremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and microbial technology,* 37(5), 487-496.

Atlas, R., & Unterman, R. (1999). Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. En: Bioremediation. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.

Azcón, A., & Barea, J. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*, 68(4), 1-24,

Barbaro, L., Karlanian, M., & Mata, D. (2013). Importancia del pH y la conductividad eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca, Buenos Aires, Argentina.

Carrillo-Méndez, J., & Soto-Padilla, M. Y. (2016). Evaluación de procesos de bioaumentación y bioestimulación en recuperación de suelos de la Laguna San Juan, Ascención, Chihuahua. *Revista Mexicana de Agroecosistemas,* 3 (1), 680.

Cedillo, S. (2013). Aplicación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, mediante bioaumentación y bioestimulación de cepas bacterianas autóctonas [en línea], Tesis de licenciatura en Ingeniería Ambiental, Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0007_A.pdf

Corwin, D. L., Rhoades, J. D., & Simunek, J. (2007). Leaching requirement for soil salinity control: Steady-state versus transient models. *Agricultural Water Management*, 90(1), 165-180.

Cuartas, D. C. Ñ, Paredes Cuervo, D. P., & Cubillos Vargas, J. C. (2014). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Revista Técnica*, 37(1), 20-29.

Cuartero, J., & Fernández, M. (1998). Tomato and salinity. *Scientia Horticulture,* 78(1), 83-125.

Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2000). Comparison of bioagmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation,* 8(4), 261-269.

Dombe, P., Kapley, A., & Purohit, H. J. (2007). Impact of bioaumentation whit a consortium of bacteria on the remediation of wasteaster containing hydrocarbons. *Environmental science and pollution research international,* 14(1), 7-11.

Domínguez-Acosta M., & Gill, T. E. (2007). PIXE Based Geochemical Characterization of the Pluvial Lake Palomas System, Chihuahua, Mexico. In Proc. XI Int. Conf. on PIXE and its Analytical Applications, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, PII-33.

Eweis, J. (1998). Biorremediation principles. En: España: McGrawHill International Editions.

Fernández, L. L. C. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo [en línea]. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología D.F. México. Disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CG008215.pdf

Goykovic, V., & Saavedra, G. (2007). Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia (Arica)*, 25(3), 47-58.

Google. (s.f.). [Localización de la Laguna de San Juan en el municipio de Ascensión Chihuahua]. 2019.

Google. (s.f.). [Punto de muestreo en la Laguna de San Juan]. 2019.

Hernández Acosta, E., García Gallegos, E., & Ramírez Téllez, J. L. (2014). Caracterización de suelos cultivados con amaranto y algunos aspectos agronómicos de la planta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(3), 421-431.

Huertos, E. G., & Romero-Baena, A. J. (2008). Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla: Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*, 10 (1), 48-60.

Luna Martínez, L., Martínez Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M., & Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 63-69.

Sánchez López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido Rubiano, M. F., & Bonilla Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.

Santos, S. T. J., & Echavarría, M. S. (2004). *Saladillo atriplex acanthocarpa*, especie forrajera en comunidades halofitas del desierto chihuahuense.

SEMARNAT (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación del 23 de abril de 2003.

Serrato-Sánchez, R., Ortiz-Arellano, A., Dimas-López, J., & Berúmen-Padilla, S. (2002). Aplicación de lavado y estiércol para recuperar suelos salinos en la Comarca Lagunera, México. *Terra latinoamericana*, 20(3), 329-336.

Sharifi, M., Ghorbanli, M., & Ebrahimzadeh, H. (2007). Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 164(9), 1144-1151, DOI 10.1016/j.jplph.2006.06.016.

Singh, K. N., & Chatrath, R. (2001). Salinity tolerance pp.101-110 [en línea]. In Eds., M. P. Reynolds, J. J. Ortiz-Monasterio & A. McNab (Eds.), Application of physiology in wheat breeding. Mexico:CIMMYT, disponible en https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1248/74619.pdf

Soto-Padilla, M. Y., Valenzuela-Encinas, C., Dendooven, L., Marsch, R., Gortáres-Moroyoqui, P., & Estrada*-Alvarado, M. I. (2014). Isolation and phylogenic identification of soil haloalkaliphilic strains in the former Texcoco Lake. *International journal of environmental health research*, 24(1), 82-90.

Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation ot total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil bases on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90(1), 115-122.

Terry, A., Leyva, Á., & Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana Biotecnología,* 7(2), 47-54.

Tester, M., & Davenport R. (2003). Na+ tolerance and Na+ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527.

Vallejo, V., Yanine, H., & Roldan, F. (2010). Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimulación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable. *Acta Biológica Colombiana,* 15(3), 75-90.

Capítulo 14

ESTADO ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN COSTERA DE LATINOAMÉRICA POR COMPUESTOS ORGÁNICOS DE ESTAÑO

Russell Giovanni Uc Peraza [1*]

Victor Hugo Delgado-Blas [2]

Gilberto Fillmann [1]

[1]Instituto de Oceanografía, Universidad Federal de Rio Grande, Brasil.

[2] División de Ciencias e Ingeniería, Universidad de Quintana Roo, México.

* russell.peraza@gmail.com

Resumen

Los compuestos orgánicos de estaño (COEs), como el tributilestaño (TBT) y trifenilestaño (TPT), son una amenaza para la biota marina debido que estos compuestos fueron ampliamente utilizados como biocidas en pinturas anti-incrustantes aplicados en los cascos de las embarcaciones para evitar la bioincrustación. Sin embargo, organismos no-blanco pueden ser expuestos a estos contaminantes y resultar con efectos adversos. El efecto tóxico más estudiado de estos contaminantes es la de disrupción endocrina, causante del desarrollo de características sexuales masculinas en hembras de gasterópodos (*imposex*). Estudios de *imposex* en Latinoamérica y en otras partes del mundo indican que este fenómeno todavía se sigue registrando, en particular después de la prohibición internacional del uso de los COEs en las pinturas anti-incrustantes. Este trabajo presenta una revisión de la literatura relacionada con estudios de *imposex* en México y en otros países de Latinoamérica, para tener un panorama general de los impactos ambientales de los COEs después de su prohibición a nivel mundial y reiterar la importancia de realizar investigaciones de monitoreo utilizando como biomarcador el *imposex*.

Palabras clave: imposex, gasterópodos, pinturas anti-incrustantes, tributilestaño.

1. Contaminación marina por compuestos orgánicos de estaño

Una de las problemáticas de los ecosistemas marinos y costeros estudiadas a nivel global, es la contaminación por COEs (Mora et al., 2017). Debido que varias zonas costeras alrededor del mundo están contaminadas por esta clase de compuestos químicos derivado de actividades portuarias, así como también por descargas industriales y urbanas (Pinochet et al., 2009; Pletsch et al., 2010). Estos compuestos son fabricados por el hombre y ampliamente utilizados como plaguicidas (fungicidas) en la agricultura, estabilizadores del cloruro de polivinilo, catalizadores industriales y biocidas en las pinturas anti-incrustantes para barcos, llevando a su liberación directa o indirecta hasta el sistema acuático (Lee et al., 2005; Lee et al., 2016; Paredes-Cervantes et al., 2017).

En especial, los biocidas son aplicados en estructuras sumergidas como los cascos de embarcaciones comerciales y de turismo, tuberías submarinas, contenedores para el uso en la acuicultura y otras estructuras con el objetivo de combatir la proliferación de organismos incrustantes (bacterias, algas y/o invertebrados sésiles) (Pletsch et al., 2010). Sin embargo, estos han sido motivo de preocupación en las últimas décadas debido a su toxicidad en organismos no-blanco (Swennen et al., 2009; Costa et al., 2014), a su persistencia (≤ 30 años) y a su uso en diversos sectores de la industria (Costa et al., 2013; Horiguchi, 2017).

Los principales COEs utilizados en las pinturas anti-incrustantes para la industria de la navegación son TBT y TPT que actúan como biocidas de amplio espectro, evitando la bioincrustación en la superficie de los cascos de las embarcaciones al estar en contacto con el agua. El TBT fue utilizado como biocida a inicios de los 60's, pero a pesar de su eficacia, en la década de los 80's, surgieron una serie de problemas relacionados con su toxicidad en el ambiente acuático que lo llevó posteriormente a su prohibición (Bigatti et al., 2014). Estas pinturas fueron ampliamente utilizadas llevando a cubrir el 90 % del total de navíos en el mundo en la década de los 80's. En el caso de TPT fue utilizado hasta hace poco como fungicida en los Estados Unidos y en algunos países de Asia (Barroso et al., 2002; Yi et al., 2012; Higley et al., 2013; Laranjeiro et al., 2016; Lee et al., 2016). Por ejemplo, en Taiwán, el 27 % de los agricultores todavía usan acetato de TPT ilegalmente, a pesar que está prohibido (Lee et al., 2016). Uno de los efectos biológicos más conocido por exposición al TBT y TPT es el *imposex*, que consiste en la aparición de caracteres sexuales masculinos no funcionales en hembras de moluscos gasterópodos, entre otros efectos (Titley-O'Neal et al., 2011; Laranjeiro et al., 2016).

La toxicidad de TBT en el ambiente marino es mayor que en agua dulce (a partir de concentraciones de 1 ng L^{-1} de TBT) y su presencia por periodos prolongados permite que se distribuya en forma extensiva, en particular, en

sedimentos donde puede permanecer por largos periodos con niveles de alta toxicidad (Rodríguez-Romero, 2010). Algunos estudios han reportado que la vida media de TBT en agua es entre 1 y 2 semanas y en sedimento de 1 a 4 años (Horiguchi, 2017) y en condiciones anaeróbicas puede durar hasta varias décadas (Antizar-Ladislao, 2008). En el ambiente acuático, la degradación de TBT puede ocurrir por procesos biológicos o abióticos, en ambos casos ocurre la desalquilación progresiva generando sus metabolitos (dibutilestaño (DBT) y monobutilestaño (MBT)) hasta llegar al estaño inorgánico (Sn^{4+}). Lo mismo ocurre con el TPT, que se degrada en difenilestaño (DPT) y monofenilestaño (MPT) (Pletsch et al., 2010). Además, la razón entre las concentraciones de las diversas especies de los COEs en el sedimento nos permite obtener información temporal, si la contaminación es reciente o antigua (Pletsch et al., 2010). En este sentido, la predominancia del TBT sobre las concentraciones de DBT y MBT indica un aporte a través del uso reciente de TBT en las pinturas anti-incrustante en el ambiente acuático. En cambio, cuando el DBT y/o MBT predominan en los sedimentos, la contaminación podría ser considerada histórica o alternativamente dominada por un proceso de degradación rápida en ese sitio (Bigatti et al., 2014). Entonces, para evaluar el grado de degradación del TBT y predecir si el aporte en el sedimento es reciente o antigua, se utiliza el índice de degradación de butilestaño (BDI), el cual se calcula de la siguiente forma: BDI = [MBT] + [DBT] / [TBT] (Díez et al., 2002). Por lo general, valores de BDI > 1 se asocian con entradas antiguas de TBT (Díez et al., 2006).

El TBT ha afectado a varios grupos de la biota marina que incluyen a mamíferos (Ciesielski et al., 2004), peces (Meador et al., 2011), gasterópodos (Castro et al., 2008; Castro et al., 2012) y entre otros invertebrados marinos (Meador, 2001; Ohji et al., 2002). En el caso de TPT, incluyen peces (Sun et al., 2011) y gasterópodos (Santos et al., 2006; Limaverde et al., 2007; Laranjeiro et al., 2016). Como consecuencia de la toxicidad de los COEs, se inició su regulación en diferentes países como Estados Unidos, Reino Unido, Francia, Japón entre otros. Posteriormente la Organización Marítima Internacional (OMI) propuso la prohibición mundial de ambos compuestos, pero no fue hasta el 17 de septiembre de 2008 que entró en vigor (PNUMA y FAO, 2015; Laranjeiro et al., 2016; Castro et al., 2018). Además, con base a la cuarta reunión de la Conferencia de las partes en el Convenio de Rotterdam, celebrada en octubre de 2008, fue considerado que todos los compuestos de TBT fueran restringidos para ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional, el cual, entró en vigor el 1 de febrero de 2009 (PNUMA y FAO, 2015; Castro et al., 2018). Sin embargo, debido a la persistencia de estos compuestos, es posible que todavía se observen efectos en los organismos marinos (Costa et al., 2013; Horiguchi, 2017).

De acuerdo a lo anterior, después de la prohibición mundial de los COEs, varios estudios han reportado una disminución de butílicos y de *imposex* en diferentes partes del mundo (Morton, 2009; Sousa et al., 2009; Castro et al., 2012).

Sin embargo, en las áreas costeras de Latinoamérica estudios recientes en Ecuador (Castro y Fillmann, 2012; Castro et al., 2018), Perú (Castro y Fillmann, 2012), Venezuela (Paz-Villarraga et al., 2015), Chile (Batista et al., 2016; Mattos et al., 2017), Panamá (Batista-Andrade et al., 2018), Argentina (Del Brio et al., 2016) y Brasil (Artifon et al., 2016) han registrado una alta incidencia de *imposex* ligados a la ocurrencia de los residuos de TBT en sedimentos superficiales y en tejido de moluscos gasterópodos. Por lo tanto, esto indica que en áreas con influencia de terminales portuarios internacionales hubo una disminución de los niveles de los COEs e *imposex*, y en las marinas como en astilleros hubo un aumento, debido que están relacionados con el uso de pinturas anti-incrustantes basadas en TBT. Por ejemplo, Castro et al. (2018) mencionan que sus resultados muestran claramente que las marinas están funcionando como una fuente importante de TBT en el área de estudio, el cual puede ser debido a la falta de control legal en producción, comercialización y/o uso del TBT en Perú. Esos resultados refuerzan lo que se ha observado en muchas áreas costeras en Latinoamérica (Castro et al., 2018).

De acuerdo al panorama de la contaminación marina por COEs, el monitoreo de estos compuestos es una herramienta de gran importancia en matrices ambientales, tales como en agua, sedimento y biota (peces, gasterópodos, plantas, etc.), para la vigilancia ambiental y comprender las tendencias de uso y nuevas fuentes de contaminación de los COEs.

2. Imposex

El *imposex* es un fenómeno que consiste en la aparición de caracteres sexuales masculinos como pene y/o vaso deferente sobre el sistema reproductivo de las hembras e impacta principalmente a moluscos gasterópodos prosobranquios (Collado et al., 2010; Guabloche et al., 2013). El fenómeno fue reportado por primera vez en Inglaterra por Blaber (1970) para el gasterópodo murícido *Nucella lapillus* (Bigatti et al., 2014) y, un año más tarde, Smith (1971) verificó el mismo fenómeno en hembras de gasterópodo (*Ilyanassa obsoleta*) colectadas en la costa de Connecticut, Estados Unidos y expuestas a TBT (Barros et al., 2014). Además, este fenómeno es ampliamente conocido en todo el mundo y ha sido registrado para más de 260 especies distribuidas en 33 familias, siendo la familia Muricidae la más sensible y estudiada (Titley-O'Neal et al., 2011; Grilo y Rosa, 2017; Cacciatore et al., 2018).

Esta alteración en el sistema reproductivo, constituye el mejor ejemplo de disrupción endocrina hasta ahora conocido y es el efecto tóxico en organismos marinos más documentado. Se caracteriza particularmente por un aumento en los niveles de testosterona en las hembras gasterópodos provocando la aparición de uno o varios penes en la región posterior al tentáculo derecho de las hembras, el

desarrollo del vaso o conducto deferente (órgano presente solamente en machos) (Mora et al., 2017) que interrumpe las funciones y la estructura del oviducto, impidiendo la actividad normal de la reproducción, pero en casos más graves, la ovogénesis es reemplazada por la espermatogénesis (Matthiessen y Gibbs, 1998; Cañete et al., 2015). Por lo tanto, este fenómeno puede ocasionar el fracaso reproductivo en las hembras (esterilidad) e incluso puede llevar a la desaparición de especies a escala local y regional (Guabloche et al., 2013; Rivas et al., 2017).

La masculinización de gasterópodos por COEs ha sido principalmente estudiada en los órdenes Vetigastropoda, Mesogastropoda y Neogastropoda (Shi et al., 2005; Titley-O'Neal, Munkittrick et al., 2011; Giraud-Billoud y Castro-Vazquez, 2019), el cual es atribuido principalmente al TBT, considerado un disruptor endocrino, por lo que ha sido demostrado a través de diferentes estudios que este compuesto puede ser el agente causal de este fenómeno (Gibbs y Bryan, 1986; Bryan et al., 1987; Gibbs, 1996; Matthiessen y Gibbs, 1998; Alves de Lima et al., 2006; Castro et al., 2007; Horiguchi, 2009; Castro et al., 2012;). Además, otros estudios de laboratorio han mostrado que el TPT puede inducir *imposex* en los gasterópodos *Reishia clavigera* (Horiguchi et al., 1997), *Marisa cornuarietis* (Schulte-Oehlmann et al., 2000), *Nassarius reticulatus* (Barroso et al., 2002), *Bolinus brandaris* (Santos et al., 2006), *Stramonita haemastoma* (Limaverde et al., 2007) y *Nucella lapillus* (Laranjeiro et al., 2016). Por consiguiente, estos compuestos orgánicos de estaño son considerados una amenaza para la biota marina, en particular en áreas sobre influencia de intensa actividad marítima, como terminales portuarias, marinas y astilleros.

La mayoría de los estudios realizados para determinar la ocurrencia e intensidad de *imposex* han encontrado un patrón gradual en concordancia a los niveles de los COEs, con una relación causa-efecto y con ello la confiabilidad como un excelente biomarcador de bajo costo para monitorear ambientes costeros impactados por TBT y TPT. Por ejemplo, Forbes et al. (2006) sugirieron que el *imposex* en moluscos gasterópodos es uno de los pocos biomarcadores que representa una herramienta predictiva de gran utilidad para la evaluación de riesgo ecológico y en programas de monitoreo ambiental. Debido a que este fenómeno es un biomarcador muy sensible específicamente para un grupo de compuestos químicos (COEs). En términos generales el mecanismo de acción es razonablemente bien entendido, y los efectos en los moluscos gasterópodos está relacionado con impactos en la dinámica de la población y la estructura de la comunidad (Schøyen et al., 2018). Por citar otro ejemplo, la Comisión OSPAR, que es una convención internacional que tiene como objetivo monitorear la salud ambiental de los ecosistemas marinos y costeros en el Atlántico del Noreste, recomienda la utilización de *imposex* para monitorear los niveles de impacto por la contaminación por TBT, recomendando para este efecto el uso de la especie *Nucella lapillus*. Sin

embargo, debido a la ausencia de esta especie en algunas áreas costeras en estudio, aconsejaron el uso de otras especies (Barros et al., 2014).

Los estudios de *imposex* en Latinoamérica y el caribe han aumentado sustancialmente, en particular después de la prohibición internacional de la IMO con relación al uso de TBT en las pinturas anti-incrustantes (Guabloche et al., 2013). Estos han sido realizados en diferentes países como Argentina (Penchaszadeh et al., 2001; Bigatti y Penchaszadeh, 2005; Cledón et al., 2006; Bigatti et al., 2009; Teso y Penchaszadeh, 2009; Arrighetti y Penchaszadeh, 2010; Averbuj y Penchaszadeh, 2010), Brasil (Castro et al., 2000; Caetano y Absalão, 2002; Fernandez et al., 2002; Camillo et al., 2004; Castro et al., 2004; Castro et al., 2005; Fernandez et al., 2005; Pinheiro et al., 2006; Castro et al., 2007a; Castro et al., 2007b; Castro et al., 2007; Fernandez et al., 2007; Castro et al., 2008; Costa et al., 2008; Mércia et al., 2008; Cardoso et al., 2009; Pessoa et al., 2009; Quadros et al., 2009; Santos et al., 2009; Lima-Verde et al., 2010; Toste et al., 2011; Azevedo et al., 2012; Castro et al., 2012; Borges et al., 2013; Toste et al., 2013; Bigatti et al., 2014; Costa et al., 2014a; Costa et al., 2014b; Zeidan y Boehs, 2017; Costa et al., 2017; Maciel et al., 2018), Uruguay (Bigatti et al., 2014), Chile (Gooding et al., 1999; Osorio y Huaquín, 2003; HuaquÍn et al., 2004; Panes-Peréz, 2006; Osorio et al., 2009; Pinochet et al., 2009; Collado et al., 2010; Cañete et al., 2015; Batista et al., 2016; Mattos y Romero, 2016; Mattos et al., 2017), Colombia (Hernández y Stotz, 2004; Mora et al., 2017; Sierra-Marquez et al., 2018) Ecuador (Castro et al., 2012; Rodríguez-Grimón et al., 2016), Perú (Castro y Fillmann, 2012; Guabloche et al., 2013; Ilizarbe y Mora, 2015; Guabloche et al., 2017; Rivas et al., 2017; Castro et al., 2018; Enrique et al., 2019) Costa Rica (Gravel et al., 2006), Panamá (Li y Collin, 2009; Batista-Andrade et al., 2018), Venezuela (Miloslavich et al., 2007; Peralta et al., 2014; Paz-Villarraga et al., 2015), Puerto Rico (Reed, 1993a; Reed, 1993b), Islas Vírgenes Britanicas (Titley-O'Neal et al., 2011) e Islas Vírgenes, Estados Unidos (Strand et al., 2009), siendo Brasil el país que más estudios ha realizado sobre el tema. En México, sólo existen 3 estudios, siendo el primero realizado en la Laguna de Términos, Campeche (Rodríguez-Romero, 2010), el segundo en las costas de los estados de Nayarit y Sinaloa (Domínguez-Ojeda et al., 2015) y el tercero en Manzanillo, Colima (Ahumada-Martínez et al., 2018).

Con relación a la cuantificación de los niveles de *imposex* en los estudios realizados, es común el uso de los siguientes índices: porcentaje de *imposex* en las hembras (*% of imposex-affected females*, I%); índice de largo del pene en hembras (*Female Penis Length Index*, FPLI); índice relativo del tamaño del pene (*Relative Penis Size Index, RPSI*); índice relativo de largo del pene (*Relative Penis Length Index*, RPLI); índice secuencial del desarrollo del vaso deferente (*Vas Deferens Sequential Index*, VDSI). Este último, es un valor promedio del estado de *imposex* en todas las hembras (Strand et al., 2009; El Ayari et al., 2018).

También, se ha encontrado que al estandarizar el FPLI y el RPLI con respecto a la longitud de la concha del organismo, tal como indican Castro y Fillmann (2012),

se puede minimizar el efecto del tamaño y edad del organismo en los parámetros de *imposex* (Castro et al., 2018). Estos índices numéricos indican el nivel de desarrollo de *imposex* en las muestras estudiadas y la sensibilidad de la especie, los cuales se relacionan en general con los niveles de TBT u otros COEs presentes en el ambiente donde habitan los organismos (Bigatti et al., 2014). De este modo, el análisis de *imposex* se convierte en una herramienta útil, de fácil aplicación, sensible, altamente específica, respuesta rápida y económica para aplicar en programas de monitoreo costero y evaluar la calidad del sistema acuático por el impacto negativo que puede traer el transito marítimo.

3. Problemática nacional

México cuenta con una longitud de 11,592.76 km de línea de costa (7,828 km - Pacífico y Golfo de California y 3,294 km - Golfo de México y Mar Caribe), incluidos más de 500 rasgos morfológicos interconectados o aislados (lagunas, bahías, esteros, estuarios y marismas), 231,813 km^2 de mar territorial y 3,149.920 km^2 de zona económica exclusiva (Espino, 2004). La actividad portuaria y la de trasporte marítimo han representado una importante vía de intercambio de México con diferentes países del mundo. El Sistema Portuario Nacional está conformado por 117 puertos terminales habilitadas, 102 como puertos y 15 como terminales fuera de puertos, con 58 en el Pacífico y 59 en el Golfo de México; siendo 68 para tráfico de altura y canotaje y 49 únicamente de canotaje (CIMARES, 2018). En miras al crecimiento de la infraestructura portuaria en México, se espera que para el 2022 se manejen en los puertos mexicanos alrededor de 294 millones de toneladas de carga; también se espera que para esa fecha se muevan aproximadamente 20 millones de pasajeros en cruceros y transbordadores (CIMARES, 2011). Con lo anterior, se puede observar en general que la actividad marítima en el país va en crecimiento, el impacto a los sistemas ambientales de la zona costera y marina se puedan ver comprometidos.

En este contexto existen pocos estudios sobre contaminación por TBT en las costas mexicanas. Uno de ellos fue realizado antes de su prohibición mundial, donde se detectó niveles relativamente altos de TBT en agua (66 a 469 ng L^{-1} de Sn) y sedimentos (33 a 1021 ng g^{-1} de Sn) del Puerto de Ensenada, Baja California durante septiembre y octubre de 1995 (Macías-Carranza et al., 1997). El estudio indica que el ingreso de TBT en ese sitio es debido a descargas sin regulación de estos compuestos e identificaron dos fuentes principales, los astilleros en la parte norte del puerto y un dique flotante, cercano a la entrada de la rada. Estos autores sugieren que el enriquecimiento de TBT se debe a las labores de reparación de embarcaciones, que incluyen raspado y pintura, siendo éstas las actividades que aportan mayor porcentaje. Por último, mencionan que el desarrollo de las

actividades portuarias, así como la construcción de marinas turísticas en varios lugares del país producirán un aumento de TBT en aguas costeras y puertos nacionales, debido a la falta de regulación de pinturas con base a TBT.

El segundo estudio, Gardea-Torresdey et al. (1995) analizaron sedimentos superficiales de 11 sitios alrededor de la Bahía de La Paz, Baja California Sur, y encontraron altas concentraciones de estaño (desde 320 hasta 5570 μg Kg^{-1} de Sn); éstos resultados sugieren que la bahía tiene una intensa actividad marítima comercial y un uso intensivo de pinturas a bases de TBT en las embarcaciones dentro del estuario.

Los estudios sobre *imposex* fueron realizados después de la prohibición de TBT; el primero fue en tres especies de gasterópodos (*Nassarius vibex*, *Echinolittorina ziczac* y *Cerithium lutosum*) en la Laguna de Términos Campeche (Rodríguez-Romero, 2010), registrándose resultados positivos en un 15 % del total de las hembras analizadas en 2 especies: *Echinolittorina ziczac* de la Isla del Carmen y *Nassarius vibex* del estero de Sabancuy. Sin embargo, éstos resultados demuestran una sorprendente salud con respecto al TBT en las aguas de la Laguna de Términos a pesar de la actividad industrial y desarrollo social de la región. Otro estudio de *imposex* fue realizado por Domínguez-Ojeda et al. (2015) en las costas de los estados de Nayarit y Sinaloa, durante el 2010 y 2011, y reportaron alta incidencia de *imposex* en *Plicopurpura pansa* (28 %) colectadas próximas a áreas portuarias.

Posteriormente, un estudio de un año sobre imposex y niveles de TBT en el tejido de los organismos colectados fue realizado con *Plicopurpura pansa* colectadas en las proximidades del Puerto de Manzanillo, Colima (Ahumada-Martínez et al., 2018). En este caso, no se reportaron incidencia de *imposex* en la especie, sin embargo, presentaron malformaciones (tumores) en el pie, y altas concentraciones de MBT (13.63 – 70.8 ng g^{-1}) en los organismos que presentaron mayor peso. Por lo tanto, los análisis morfológicos e histopatológicos en la población de gasterópodos indican patrones de impactos en el organismo en relación con la proximidad al puerto. Los autores recomiendan que la especie de estudio puede ser utilizada como bioindicador para evaluar la salud ambiental de los sistemas marinos.

De acuerdo a los estudios antes mencionados, se puede observar que las actividades marítimas son una fuente de TBT al sistema acuático y tienen un impacto negativo en la biota marina lo que indica que luego de su prohibición mundial siguen los aportes de TBT en las zonas estudiadas y son necesarias futuras investigaciones en agua, sedimento y biota. En este caso, nosotros proponemos usar como herramienta el *imposex* en moluscos gasterópodos por su bajo costo y su relativa facilidad para evaluar el impacto por TBT y/o TPT.

4. Legislación de los COEs

Las primeras acciones regulatorias y legislativas para prevenir el riesgo por el uso de compuestos orgánicos de estaño utilizados como biocidas en pinturas anti-incrustantes fueron adoptadas en Francia en 1982. Esto debido a los problemas generados por el TBT en la industria pesquera, en particular, sobre la disminución en la abundancia de la población de ostiones (*Crassostrea gigas*) en las décadas de los 70's y 80's. Posteriormente países como Reino Unido, Holanda, Austria, Alemania, Japón, España, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Corea, Hong Kong, entre otros, comenzaron a restringir el uso de las pinturas con TBT (Champ, 2000). Sin embargo, el transporte marítimo es una actividad mundial y los controles individuales por cada nación sobre los sistemas anti-incrustantes no son efectivos para prevenir la contaminación aún en aguas territoriales (Bigatti et al., 2014). En 1988, el problema fue dirigido al Comité de Protección del Ambiente (MEPC) de la IMO. En 2001, el MEPC adopta el Convenio Internacional sobre el Control de los Sistemas Anti-incrustantes Perjudiciales (AFS), el cual regula el contenido químico de las pinturas anti-incrustantes. Posteriormente, la resolución de dicho Convenio llamó a la prohibición del uso de los COEs en las pinturas a partir del 1 de enero de 2003. México se unió a este convenio el 7 de julio de 2006 y el 17 de septiembre de 2008 entró en vigor para 30 países que lo firmaron (Okolodkov y García, 2014). Hasta septiembre de 2018, 81 países que representan aproximadamente el 94.3 % del tonelaje de la flota mercante mundial, firmaron el Convenio.

Otro convenio que restringe el uso de todos los compuestos de tributilestaño es el Convenio de Rotterdam, que regula el comercio internacional de ciertos productos químicos peligrosos (plaguicidas y productos químicos industriales) con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente frente a posibles daños (PNUMA y FAO, 2015). Este Convenio fue aprobado en Rotterdam el 10 de septiembre de 1998, fecha en que México de suscribió, y entró en vigor el 24 de febrero de 2004 para 14 productos químicos. Posteriormente, en la cuarta reunión del Convenio, celebrada en octubre de 2008, se añadió diversos compuestos de tributilestaño, para entrar en vigor el 1 de febrero de 2009 (PNUMA y FAO, 2015; Castro et al., 2018).

En México, el desarrollo de leyes para el control de biocidas y plaguicidas están legisladas por normas y reglamentos: La Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la encargada de la regulación de plaguicidas en México, en coordinación con la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y/o Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), mediante el reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de

Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos (RPLAFEST). En este reglamento existe una clasificación de los productos sujetos a procedimiento para RPLAFEST, donde se incluyen los biocidas para uso en pinturas anti-incrustantes.

La Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009 establece los requisitos, indicaciones y características que deben cumplir el envase, embalaje y etiquetado de plaguicidas, tanto técnicos como formulados y en sus diferentes presentaciones, a fin de minimizar los riesgos a la salud de los trabajadores ocupacionalmente expuestos y de la población en general, durante su almacenamiento, transporte, manejo y aplicación. La presente Norma es de observancia obligatoria en la República Mexicana para las personas físicas y morales que se dedican al proceso de los productos plaguicidas que se comercializarán en el territorio nacional entre otras políticas, leyes y reglamentos (Política Nacional de Mares y Costas de México, Ley Federal del Mar, y el Reglamento para prevenir y controlar la contaminación del mar por vertimientos de desecho y otras materias). Sin embargo, no son tan rigorosas y es necesario que las autoridades se concentren en su vigilancia y control.

5. Conclusiones

De acuerdo con la información obtenida en la literatura, se muestra que antes de la prohibición del TBT por la IMO, el fenómeno de *imposex* fue registrado en varios sitios a lo largo de las costas de Latinoamérica y particularmente en áreas donde las concentraciones de TBT fueron altas. En México, los estudios son escasos, siendo uno sobre los niveles de TBT en sedimento superficial y el otro en agua, ambos con altas concentraciones y ligados a la actividad marítima. Con referente a estudios sobre *imposex* no se encontraron datos disponibles.

Después de la prohibición mundial del TBT en 2008, se observó un aumento sustancial en el uso de *imposex* en moluscos gasterópodos, por lo que se confirma como un excelente biomarcador y puede ser utilizado para programas de monitoreo de TBT en el ambiente acuático. La contaminación de los COEs, en particular en las costas de Sudamérica, sigue siendo evidente, aunque estudios de monitoreo indiquen una disminución de estos compuestos en ciertos puertos internacionales, a consecuencia de un mayor control de las embarcaciones por la IMO. Un aumento en los niveles de los COEs y mayor frecuencia de *imposex* se han reportado próximos a marinas, astilleros y puertos pesqueros, los cuales, son más difíciles de controlar.

Por lo tanto, es urgente la necesidad de desarrollar políticas de monitoreo para proteger las costas y una regulación adecuada y estricta sobre los COEs usados como biocidas en las pinturas anti-incrustantes y su uso en aguas mexicanas resulta improrrogable. El uso de *imposex* en moluscos gasterópodos puede ser una

excelente herramienta para generar información sobre las áreas más sensibles a la contaminación por COEs en México.

6. Referencias

Ahumada-Martínez, O.; Hernandez-López, J.; A. Liñán-Cabello, M.A. (2018). Occurrence of tumors among gastropods *Plicopurpura pansa* (Gastropoda: Neogastropoda) in the Port of Manzanillo, Mexico. Environmental Science and Pollution Research. 25(24), 24064-24072.

Alves de Lima, A.F.; Castro, Í.B.; Rocha-Barreira, C. de A. (2006). Imposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) sumitted to an organotin-cantaminated diet. Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands. 24(1), 85-90.

Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. Environment International. 34, 292-308.

Arrighetti, F.; Penchaszadeh, P.E. (2010). Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. Aquatic Biology. 9(1), 63-75.

Artifon, V.; Castro, Í.B.; Fillmann, G. (2016). Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). Environmental Science and Pollution Research. 23(16), 16047-16055.

Averbuj, A.; Penchaszadeh, P.E. (2010). On the reproductive biology and impact of imposex in a population of *Buccinanops monilifer* from Mar del Plata, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 90(4), 729-734.

El Ayari, T.; Bierne, N.; El Menif, N.T. (2018). Imposex incidence in *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) from the Mediterranean and Atlantic coast after Tributyltin global ban. Journal of Sea Research. 134, 10-15.

Azevedo, D.; Almeida Rocha-Barreira, C.; Matthews-Cascon, H.; Castro, Í.B. (2012). *Pugilina morio* L., a new imposex exhibitor from South American estuarine environments: approach for a non-lethal method to evaluate imposex. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 89(4), 786-792.

Barros, A.R.; Santos, G.C.; Mendes, R.T. (2014). A história de um biomarcador de sucesso: o imposexo em gastrópodes como ferramenta de estudo no ensino experimental das ciências. Captar Ciência e Amabiente para Todos. 5(2), 75-87.

Barroso, C.M.; Reis-Henriques, M.A.; Ferreira, M.S.; Moreira, M.H. (2002). The effectiveness of some compounds derived from antifouling paints in promoting imposex in *Nassarius reticulatus*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 82(2), 249-255.

Batista-Andrade, J.A.; Caldas, S.S.; Batista, R.M.; Castro, I.B.; Fillmann, G.; Primel, E.G. (2018). From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. Environmental Pollution. 234, 243-252.

Batista, R.M.; Castro, Í.B.; Fillmann, G. (2016). Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. Science of the Total Environment. 566-567, 446-453.

Bigatti, G.; Averbuj, A.; Castro, Í.B.; Primost, M.; Álvar, C.; Commendatore, M.; Fillmann, G.; Delgado, E.; Scarabino, F.; Brío, F.; Franco, M.; Letamendía, M.; Martínez, G.; Sauco, S.; Penchaszadeh, P.E. (2014). Situación de contaminación en las costas del sur de Brasil, Uruguay y Argentina, luego de la prohibición mundila de TBT en C. Goso (ed.), *Nuevas miradas a la problemática de los amibentes costeros : sur de Brasil, Uruguay y Argentina* (277-302). Montevideo: DIRAC.

Bigatti, G.; Penchaszadeh, P.E. (2005). Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. Comunicaciones de la Sociedad Malacologica del Uruguay. 9(88), 371-375.

Bigatti, G.; Primost, M.A.; Cledón, M.; Averbuj, A.; Theobald, N.; Gerwinski, W.; Arntz, W.; Morriconi, E.; Penchaszadeh, P.E. (2009). Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). Marine Pollution Bulletin. 58(5), 695-701.

Borges, C. de L.L.; Fernandez, M.A. dos S.; Castro, Í.B.; Fillmann, G. (2013). Organotin pollution from pleasure craft at paraty, a tourist area of southeastern brazil: amelioration or interference? Brazilian Journal of Oceanography. 61(3), 177-186.

Del Brio, F.; Commendatore, M.; Castro, I.B.; Gomes Costa, P.; Fillmann, G.; Bigatti, G. (2016). Distribution and bioaccumulation of butyltins in the edible gastropod *Odontocymbiola magellanica*. Marine Biology Research. 12(6), 608-620.

Bryan, G.W.; Gibbs, P.E.; Burt, G.R.; Hill, C. (1987). The effects os tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 67(3), 525-544.

Cacciatore, F.; Boscolo Brusà, R.; Noventa, S.; Antonini, C.; Moschino, V.; Formalewicz, M.; Gion, C.; Berto, D.; Gabellini, M.; Marin, M.G. (2018). Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the Northern Adriatic Sea (Italy): ecological risk assessment before and after the ban. Ecotoxicology and Environmental Safety. 147, 688-698.

Caetano, C.H.S.; Absalão, R.S. (2002). Imposex in *Olivancillaria vesica vesica* (Gmelin) (Gastropoda, Olividae) trom a Southeastern Brazilian sandy beach. Revista Brasileira de Zoologia. 19(Supl.2), 215-218.

Camillo, E.; Quadros, J.; Castro, Í.B. de; Fernandez, M. (2004). Imposex in *Thais rustica* (Mollusca: Neogastropoda) (Lamark, 1822) as an indicator of organotin

compounds pollution at Maceio coast (Northeastern Brazil). Brazilian Journal of Oceanography. 52(2), 101-105.

Cañete, J.I.; Osorio, C.; Huaquin, L. (2015). Nuevos registros de imposex en muricidos de la zona Austral de Sudamérica (Estrecho de Magallanes). Revista Ciencia y Tecnología del Mar. 36, 81-90.

Cañete, J.I.; Osorio, C.; Huaquín, L. (2015). Nuevos registros de imposex en muricidos de la zona austral de Sudamérica (Estrecho de Magallanes). Revista Ciencia y Tecnología del Mar. 36, 82-90.

Cardoso, R.S.; Caetano, C.H.S.; Cabrini, T.M.B. (2009). Biphallia in imposexed females of marine gastropods: new record for Nassarius vibex from Brazil. Brazilian Journal of Biology. 69(1), 223-224.

Castro, Í.B.; Arroyo, M.F.; Costa, P.G.; Fillmann, G. (2012). Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 62, 68-77.

Castro, Í.B.; Bemvenuti, C.E.; Fillmann, G. (2007). Preliminary appraisal of imposex in areas under the influence of Southern Brazilian harbour. Brazilian Journal of Oceanography. 24(1), 73-79.

Castro, Í.B.; Braga, A.R.C.; Rocha-Barreir, C. de A. (2005). Altos índices de imposex em *Stramonita rustica* (Mollusca: Gastropoda) em áreas portuárias dos estados de Alagoas e Sergipe, Brasil. Tropical Oceanography. 33(2), 121-128.

Castro, Í.B.; Fillmann, G. (2012). High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two Peruvian harbor areas. Environmental Toxicology and Chemistry. 31(5), 955-960.

Castro, Í.B.; Iannacone, J.; Santos, S.; Fillmann, G. (2018). TBT is still a matter of concern in Peru. Chemosphere. 205, 253-259.

Castro, Í.B.; Lima, A. de L.; Braga, A.R.C.; Rocha-Barreira, C.A. (2007). Imposex in Two Muricid Species (Mollusca: Gastropoda) from the Northeastern Brazilian Coast. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. 2(1), 81-91.

Castro, Í.B.; Matthews-Cascon, H.; Fernandez, M.A.S. (2000). Imposex em Thais haemastoma (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicação da contaminação por organoestânicos na costa do município de Fortaleza. Arquivos de Ciências do Mar. 33, 51-56.

Castro, Í.B.; Meirelles, C.A.O.; Matthews-Cascon, H.; De Almeida Rocha-Barreira, C.; Penchaszadeh, P.; Bigatti, G. (2008). Imposex in endemic volutid from Northeast Brazil (Mollusca: Gastropoda). Brazilian Archives of Biology and Technology. 51(5), 1065-1069.

Castro, I.B.; Meirelles, C.A.O.; Matthews-cascon, H.; Fernandez, M.A. (2004). Thais (stramonita) rustica (Lamarck: Thaididae), a potential bioindicator of cotamination by organotin Northeast Brazil. Brazilian Journal of Oceanography. 52(2), 135-139.

Castro, Í.B.; Perina, F.C.; Fillmann, G. (2012). Organotin contamination in South American coastal areas. Environmental Monitoring and Assessment. 184(3), 1781-1799.

Castro, Í.B.; Rocha-Barreira, C. de A.; Fernandez, M.A.; Bigatti, G. (2012). Transplant bioassay induces different imposex responses in two species of the genus Stramonita. Marine Biology Research. 8(4), 397-404.

Castro, Í.B.; Rossato, M.; Fillmann, G. (2012). Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern Brazilian harbors. Environmental Toxicology and Chemistry. 31(5), 947-954.

Castro, L.F.C.; Lima, D.; Machado, A.; Melo, C.; Hiromori, Y.; Nishikawa, J.; Nakanishi, T.; Reis-Henriques, M.A.; Santos, M.M. (2007). Imposex induction is mediated through the retinoid X receptor signalling pathway in the neogastropod Nucella lapillus. Aquatic Toxicology. 85(1), 57-66.

Champ, M.A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. The Science of the Total Environment. 258, 21-71.

Ciesielski, T.; Wasik, A.; Kuklik, I.; Skóra, K.; Namieśnik, J.; Szefer, P. (2004). Organotin compounds in the liver tissue of marine mammals from the Polish coast of the Baltic sea. Environmental Science and Technology. 38(5), 1415-1420.

CIMARES (2018). Política Nacional de mares y costas de México. Comisión Intersecretarial para el Manejo Sustentable de Mares y Costas., 15-16. [en linea], disponible en https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545511&fecha=30/11/2018.

Cledón, M.; Theobald, N.; Gerwinski, W.; E. Penchaszadeh, P. (2006). Imposex and organotin compounds in marine gastropods and sediments from the Mar del Plata coast, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 86(4), 751-755.

Collado, G.; Cecilia, O.; Retamal, M. (2010). Imposex en los caracoles marinos *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) y *Nassarius coppingeri* E.A. Smith, 1881 en el sur de Chile. Ciencia y Tecnología del Mar. 33(1), 67-76.

Costa, M.B.; Fernandez, M.A.; Barbiero, D.C.; de Melo, F.T.V.; Otegui, M.B.P.; Ferreira, B.S. (2008). First record of imposex in *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Thaididae) in Vitória, ES, Brazil. Brazilian Journal of Oceanography. 56(2), 145-148.

Costa, M.B.; Mardegan, B.S.; Zamprogno, G.C.; Pedruzzi, F.C.; Morais, L. de; Dalbem, G.B.; Silva, D.A. da; Graceli, J.B. (2014a). Penis malformations in Leucozonia nassa (Gmelin, 1792) and Leucozonia ocellata (Gmelin, 1791) in a TBT contaminated region from Brazil. Aquatic Science and Technology. 2(2), 52.

Costa, M.B.; Otegui, M.B.P.; Barbiero, D.C.; Fernandez, M. A. (2008). *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda:

Ranellidae): a new bioindicator of organotin compounds contamination? Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. 3(1), 65-69.

Costa, M.B.; Zamprogno, G.C.; Otegui, M.B.P.; de Morais, L.; Pedruzzi, F.C.; Dalbem, G.B.; da Silva, D.A.; Resende, A.C.B. (2017). A temporal and spatial monitoring of organotin pollution in a harborside region of Brazil by imposex and ecological quality ratio using Leucozonia nassa. Environmental Monitoring and Assessment. 189, 1-16.

Costa, M.B.; Zamprogno, G.C.; Pedruzzi, F.C.; Dalbem, G.B.; Tognella, M.M.P. (2013). Assessing the continuous impact of tributyltin from antifouling paints in a Brazilian mangrove area using intersex in *Littoraria angulifera* (Lamarck, 1822) as Biomarker. International Journal of Oceanography. 2013, 1-8.

Costa, M.B.; Zamprogno, G.C.; Pedruzzi, F.C.; de Morais, L.; Tognella, M.M.P.; Godoi, A.F.L.; Santos, D.M.; de Marchi, M.R.R.; Fernandez, M.A. (2014b). Differential organotin sensitivity in two Leucozonia species from a ship traffic area in southeastern Brazil. Marine Biology Research. 10(7), 712-724.

Díez, S.; Ábalos, M.; Bayona, J.M. (2002). Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. Water Research. 36(4), 905-918.

Díez, S.; Jover, E.; Albaigés, J.; Bayona, J.M. (2006). Occurrence and degradation of butyltins and wastewater marker compounds in sediments from Barcelona harbor, Spain. Environment International. 32(7), 858-865.

Domínguez-Ojeda, D.; Patrón-Soberano, O.; Nieto-Navarro, J.T.; Robledo-Marenco, M. de L.; Velázquez-Fernández, J.B. (2015). Imposex in *Plicopurpura pansa* (Neogastropoda : Thaididae) in Nayarit and Sinaloa, Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad. 86, 531-534.

Enrique, S.; Guabloche, A.; Tuesta, E.; Iannacone, J.; Castro, I.B. (2019). Imposex responses in *Thaisella chocolata* and *Xanthochorus buxeus* from Callao harbor, Peru. Regional Studies in Marine Science, 100510.

Espino, G. de la L. (2004). Gran escenario de la zona costera y oceánica de México. Ciencias. 76, 4-13.

Fernandez, M.A.; Limaverde, A.M.; Castro, I.B.; Almeida, A.C.M.; Wagener, A. de L.R. (2002). Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. Cadernos de Saúde Pública. 18(2), 463-476.

Fernandez, M.A.; Pinheiro, F.M.; de Quadros, J.P.; Camillo, E. (2007). An easy, non-destructive, probabilistic method to evaluate the imposex response of gastropod populations. Marine Environmental Research. 63(1), 41-54.

Fernandez, M.A.; Wagener, A.D.L.R.; Limaverde, A.M.; Scofield, A.L.; Pinheiro, F.M.; Rodrigues, E. (2005). Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Marine Environmental Research. 59(5), 435-452.

Forbes, V.E.; Palmqvist, A.; Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry. 25(1), 272-280.

Gardea-Torresdey, J.; Martinez-Gonzalez, S.; Pannell, K. (1995). Method Development for the determination of Tin in a marine sediment and a preliminary study of Tin distribution from La Paz, B.C.S., Mexico. Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research, 261-270.

Gibbs, P.E. (1996). Oviduct malformation as a sterilising effect of tributyltin (TBT)-induced imposex in *Ocenebra erinacea* (gastropoda: muricidae). Journal of Molluscan Studies. 62(4), 403-413.

Gibbs, P.E.; Bryan, G.W. (1986). Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributytin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 66(4), 767-777.

Giraud-Billoud, M.; Castro-Vazquez, A. (2019). Aging and retinoid X receptor agonists on masculinization of female *Pomacea canaliculata*, with a critical appraisal of imposex evaluation in the Ampullariidae. Ecotoxicology and Environmental Safety. 169, 573-582.

Gooding, M.; Gallardo, C.; Leblanc, G. (1999). Imposex in three marine gastropod species in Chile and ootential impact on muriciculture. Marine Pollution Bulletin. 38(12), 1227-1231.

Gravel, P.; Johanning, K.; McLachlan, J.; Vargas, J.A.; Oberdorster, E. (2006). Imposex in the intertidal snail *Thais brevidentata* (Gastropoda: Muricidae) from the Pacific coast of Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 54(Suppl. 1), 21-26.

Grilo, T.F.; Rosa, R. (2017). Intersexuality in aquatic invertebrates: prevalence and causes. Science of the Total Environment. 592, 714-728.

Guabloche, A.; Alvarez, J.; Rivas, R.; Hurtado, S.; Pradel, R.; Iannacone, J. (2013). Imposex in the marine snail *Xanthochorus Buxea* (Broderip, 1833)(Muricidae) from the South American Pacific. The Biologist. 11(2), 237-249.

Guabloche, A.; Mendoza, J.; Minaya, D.; Ortega, J.; Lorena, A.; Iannacone, J. (2017). Imposex en el caracol marino *Stramonita haemastoma* - (Gasteropoda: Muricidae) en la costa central del Perú. Revista Electrónica de Veterinaria. 18(5), 1-12.

Hernández, S.; Stotz, W. (2004). Reproductive biology of the «Copey» snail *Melongena melongena*(Linnaeus, 1758) in Cispatá Bay on the Caribbean coast of Colombia. Journal of Shellfish Research. 23(3), 849-854.

Higley, E.; Tompsett, A.R.; Giesy, J.P.; Hecker, M.; Wiseman, S. (2013). Effects of triphenyltin on growth and development of the wood frog (*Lithobates sylvaticus*). Aquatic Toxicology. 144-145, 155-161.

Horiguchi, T. (2017). *Biological effects by Organotins*. T. Horiguchi (ed.),. Tokyo, Japan: Springer Nature.

Horiguchi, T. (2009). The endocrine-disrupting effect of organotin compounds for aquatic organisms en T. Arai,H. Harino,M. Ohji,y W. J. Langston (eds.), *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* (125-146). Tokyo: Springer.

Horiguchi, T.; Shiraishi, H.; Shimizu, M.; Morita, M. (1997). Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. Environmental Pollution. 95(1), 85-91.

HuaquÍn, L.G.; Osorio, C.; Verdugo, R.; Collado, G. (2004). Morphological changes in the reproductive system of females *Acanthina monodon* (pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) affected by imposex from the coast of central chile. Invertebrate Reproduction and Development. 46(2-3), 111-117.

Ilizarbe, L.M.C.; Mora, Z.J.P. (2015). Monitoreo de contaminación por tributilestaño (TBT) en Puertos de Paracas, ICA (PERÚ), mediante el fenómeno de imposex en Stramonita chocolatada. Científica. 12(3), 222-230.

Laranjeiro, F.; Sánchez-Marín, P.; Barros, A.; Galante-Oliveira, S.; Moscoso-Pérez, C.; Fernández-González, V.; Barroso, C. (2016). Triphenyltin induces imposex in *Nucella lapillus* through an aphallic route. Aquatic Toxicology. 175, 127-131.

Lee, C.C.; Hsu, Y.C.; Kao, Y.T.; Chen, H.L. (2016). Health risk assessment of the intake of butyltin and phenyltin compounds from fish and seafood in Taiwanese population. Chemosphere. 164, 568-575.

Lee, C.C.; Wang, T.; Hsieh, C.Y.; Tien, C.J. (2005). Organotin contamination in fishes with different living patterns and its implications for human health risk in Taiwan. Environmental Pollution. 137(2), 198-208.

Li, C.; Collin, R. (2009). Imposex in one of the world's busiest shipping zones en M. A. Lang,I. G. Maclntyre,y K. Ruetzler (eds.), *Proceedings of the Smithsonian*

Marine Science Symposium (189-196). Washington DC: Smithsonian Institution Scholarly Press.

Lima-Verde, F.B.; Castro, Í.B.; Almeida Rocha-Barreira, C. (2010). Imposex occurrence in *Nassarius vibex* from South America: a potential bioindicator in estuarine environments. Marine Biodiversity Records. 3, e30.

Limaverde, A.M.; de L. Rebello Wagener, A.; Fernandez, M.A.; de L. Scofield, A.; Coutinho, R. (2007). *Stramonita haemastoma* as a bioindicator for organotin contamination in coastal environments. Marine Environmental Research. 64(3), 384-398.

Macías-Carranza, V.A.; Macías-Zamora, V.; Villaescusa-Celaya, A. (1997). Compuestos organoestañados en agua y sedimentos marinos del puerto de Ensenada, Baja California. Ciencias Marinas. 23(3), 377-394.

Maciel, D.C.; Castro, Í.B.; de Souza, J.R.B.; Yogui, G.T.; Fillmann, G.; Zanardi-Lamardo, E. (2018). Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast. Marine Pollution Bulletin. 126, 473-478.

Matthiessen, P.; Gibbs, P.E. (1998). Critical appraisal of the evident for tributyltin-meditated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology and Chemistry. 17(1), 37-43.

Mattos, Y.; Romero, M.S. (2016). Imposex in *Thaisella chocolata* (Duclos, 1832) (Gastropoda: Muricidae) Caldera Bay, Chile. Latin American Journal of Aquatic Research. 44(4), 825-834.

Mattos, Y.; Stotz, W.B.; Romero, M.S.; Bravo, M.; Fillmann, G.; Castro, Í.B. (2017). Butyltin contamination in Northern Chilean coast: Is there a potential risk for consumers? Science of the Total Environment. 595, 209-217.

Meador C. A., J.P. and R. (2001). Impaired growth in the polychaete Armandia brevis exposed to tributyltin in sediment. Marine Environmental Research. 51, 113-129.

Meador, J.P.; Sommers, F.C.; Cooper, K.A.; Yanagida, G. (2011). Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid. Environmental Research. 111, 50-56.

Miloslavich, P.; Penchaszadeh, P.E.; Bigatti, G. (2007). Imposex en gastrópodos de Venezuela. Ciencias Marinas. 33(3), 319-324.

Mora, J.P.R.; Berdugo, G.J.O.; Grimón, R.O.R.; Campos, N.H.C. (2017). Imposex en neogasterópodos del Caribe colombiano : un acercamiento a la contaminación de las aguas marino-costeras de la región en *Instituto de investigación en ciencias del mar Cecimar* (14). Universidad de Colombia.

Morton, B. (2009). Recovery from imposex by a population of the dogwhelk, Nucella lapillus (Gastropoda: Caenogastropoda), on the southeastern coast of England since May 2004: A 52-month study. Marine Pollution Bulletin. 58, 1530-1538.

Ohji, M.; Takeuchi, I.; Takahashi, S.; Tanabe, S.; Miyazaki, N. (2002). Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea: Amphipoda). Marine Pollution Bulletin. 44, 16-24.

Okolodkov, Y.; García, H. (2014). Agua de lastre y transporte de los organismos incrustantes, leyes y acciones : perspectivas para México Ballast water and transport of fouling organisms , laws and actions : perspectives for Mexico en A. M. Low-Pfeng,P. A. Quijón,y E. Peters-Recagno (eds.), *Especies Incasoras: casos de estudio en ecosistemas de México* (55-80). México.

Osorio, C.; Huaquín, L.G. (2003). Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) en el litoral de Chile central, inducida por compuestos organoestañosos. Ciencia Y Tecnologia Del Mar. 26(2), 97-107.

Osorio, C.; Retamal, M.; Collado, G. (2009). Evaluación De Imposex En Moluscos Y Crustáceos Entre El Seno Reloncaví Y El Golfo Corcovado Sur De Chile en D. Guerra y C. Calvete (eds.), *Resultados Crucero CIMAR 11 Fiordos (16 al 27 de julio y 11 al 21 de noviembre 2005)* (177-183). Centro Nacional de Datos Hidrográficos y Oceanográficos de Chile.

Panes-Peréz, L.E. (2006). *Estudio morfohitológico del sistema reproductor de Nasariu gayii presente en sectores cercanos y alejados de áreas protuarias*. Santiago, Chile: Universidad de Chile.

Paredes-Cervantes, V.; Castillo-Vera, J.; Gomez-Reynoso, F.; Diaz-Cedillo, F.; Aguilar-Santelises, M. (2017). Wastewater from Mexico City contains organotin compounds and organotin-resistant bacteria. Cogent Environmental Science. 3, 1-12.

Paz-Villarraga, C.A.; Castro, I.B.; Miloslavich, P.; Fillmann, G. (2015). Venezuelan Caribbean Sea under the threat of TBT. Chemosphere. 119, 704-710.

Penchaszadeh, P.E.; Averbuj, A.; Cledón, M. (2001). Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). Marine Pollution Bulletin. 42(9), 790-791.

Peralta, A.C.; Miloslavich, P.; Bigatti, G. (2014). Imposex en *Voluta musica* (Caenogastropoda: Volutidae) en el Noreste de la Península de Araya, Venezuela. Revista de Biologia Tropical. 62(2), 523-532.

Pessoa, I.; Fernandez, M.; Toste∞, R.; Dore, M.; Oceanography, M.P. (2009). Imposex in a touristic area in Southeastern Brazilian coast. Journal of Coastal Research. 56, 881-884.

Pinheiro, F.M.; Fernandez, M.A.; Fragoso, M.R.; Quadros, J.P.; Camillo Jr., E.; Dos Santos, F.A. (2006). Assessing the impacts of organotin compounds in Ilha Grande Bay, (Rio de Janeiro, Brazil): Imposex and a multiple-source dispersion model. Journal of Coastal Research. 2004(39), 1383-1388.

Pinochet, H.; Tessini, C.; Bravo, M.; Quiroz, W.; De Gregori, I. (2009). Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay - Chile. Environmental Monitoring and Assessment. 155, 341-353.

Pletsch, A.L.; Beretta, M.; Tavares, T.M. (2010). Spatial distribution of organic tin compounds in coastal sediment and Phallusia nigra of the Todos os Santos bay and northern coast of Bahia - Brazil. Quimica Nova. 33(2), 451-457.

PNUMA; FAO (2015). Convenio de Rotterdam. [en linea], disponible en http://www.pic.int/ElConvenio/Generalidades/TextodelConvenio/tabid/1980/language/es-CO/Default.aspx

Quadros, J.P.; Camilo Jr, E.; Pinheiro, F.; Fernandez, M.A.S. (2009). Imposex as an indicator of organotin pollution at Rio de Janeiro South coast : Sepetiba and Ilha Grande Bays. Ecotoxicology. 25(1), 19-30.

Reed, S.E. (1993a). Gonadal comparison of masculinized females and androgynous males to normal males and females in *Strombus*(Mesogastropoda: Strombidae). Journal of Shellfish Research. 12(1), 71-75.

Reed, S.E. (1993b). Size differences between sexes (including masculinized females) in *Strombus pugilis*(Mesogastropoda: Strombidae). Journal of Shellfish Research. 12(1), 77-79.

Rivas, R.; Hurtado, S.; Cornelio, D.; Mendoza, J.; Guabloche, A.; Iannacone, J.; Alvariño, L.; Castañeda, L. (2017). Imposex en Crassilabrum crassilabrum (Neogastropoda: Muricidae) en la costa central del Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 28(4), 834.

Rodríguez-Grimón, R.O.; Arroyo-Osorio, M.F.; de Freitas, D.M.; Castro, Í.B. (2016). Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. Marine Policy. 69, 24-31.

Rodríguez-Romero, F. (2010). Imposex en la laguna de Términos, Campeche, México. Revista Científica UDO Agrícola. 10(1), 141-149.

Santos, D.M.; Araújo, I.P.; Machado, E.C.; Carvalho-Filho, M.A.S.; Fernandez, M.A.; Marchi, M.R.R.; Godoi, A.F.L. (2009). Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: Evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. Marine Pollution Bulletin. 58(12), 1926-1931.

Santos, M.M.; Armanda Reis-Henriques, M.; Natividade Vieira, M.; Solé, M. (2006). Triphenyltin and tributyltin, single and in combination, promote imposex in the gastropod *Bolinus brandaris*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 64(2), 155-162.

Schøyen, M.; Green, N.W.; Hjermann, D.Ø.; Tveiten, L.; Beylich, B.; Øxnevad, S.; Beyer, J. (2018). Levels and trends of tributyltin (TBT) and imposex in dogwhelk (*Nucella lapillus*) along the Norwegian coastline from 1991 to 2017. Marine Environmental Research, In Press.

Schulte-Oehlmann, U.; Tillmann, M.; Marker, B.; Oehlmann, J.; Watermann, B.; Limnomar, S.S. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a Xeno-Androgen. Ecotoxicology. 9(6), 399-412.

Shi, H.H.; Huang, C.J.; Zhu, S.X.; Yu, X.J.; Xie, W.Y. (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. Marine Ecology Progress Series. 304, 179-189.

Sierra-Marquez, L.; Sierra-Marquez, J.; De La Rosa, J.; Olivero-Verbel, J. (2018). Imposex in *Stramonita haemastoma* from coastal sites of Cartagena, Colombia. Brazilian Journal of Biology. 78(3), 548-555.

Sousa, A.; Laranjeiro, F.; Takahashi, S.; Tanabe, S.; Barroso, C.M. (2009). Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. Chemosphere. 77, 566-573.

Strand, J.; Jørgensen, A.; Tairova, Z. (2009). TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. Environment International. 35(4), 707-711.

Sun, L.; Zhang, J.; Zuo, Z.; Chen, Y.; Wang, X.; Huang, X.; Wang, C. (2011). Influence of triphenyltin exposure on the hypothalamus-pituitary-gonad axis in male *Sebastiscus marmoratus*. Aquatic Toxicology. 104(3-4), 263-269.

Swennen, C.; Sampantarak, U.; Ruttanadakul, N. (2009). TBT-pollution in the Gulf of Thailand: A re-inspection of imposex incidence after 10 years. Marine Pollution Bulletin. 58(4), 526-532.

Teso, S.V.; Penchaszadeh, P.E. (2009). Beach filling and imposex in olivancillaria deshayesiana (mollusca: Gastropoda: Olividae) from the coast of mar del Plata, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 89(3), 557-562.

Titley-O'Neal, C.P.; MacDonald, B.A.; Pelletier, É.; Saint-Louis, R.; Phillip, O.S. (2011). The relationship between imposex and tributyltin (TBT) concentration in *Strombus gigas* from the British Virgin Islands. Bulletin of Marine Science. 87(3), 421-435.

Titley-O'Neal, C.P.; Munkittrick, K.R.; MacDonald, B.A. (2011). The effects of organotin on female gastropods. Journal of Environmental Monitoring. 13(9), 2360-2388.

Toste, R.; Fernandez, M.A.; de Araújo Pessoa, I.; Parahyba, M.A.; Dore, M.P. (2011). Organotin pollution at arraial do cabo, rio de janeiro state, brazil: increasing levels after the TBT ban. Brazilian Journal of Oceanography. 59(1), 111-117.

Toste, R.; Pessoa, I.A.; Dore, M.P.; Parahyba, M.A.; Fernandez, M.A. (2013). Is aphallic vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 91, 162-170.

Yi, A.X.; Leung, K.M.Y.; Lam, M.H.W.; Lee, J.S.; Giesy, J.P. (2012). Review of measured concentrations of triphenyltin compounds in marine ecosystems and meta-analysis of their risks to humans and the environment. Chemosphere. 89(9), 1015-1025.

Zeidan, G.C.; Boehs, G. (2017). Assessment of tributyltin contamination based on imposex in Stramonita rustica (Mollusca: Gastropoda) along southern Bahia coast, northeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology. 77(1), 185-190.

Capítulo 15

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA BIOLÓGICA DE FILTROS A BASE DE ARCILLA UTILIZADOS EN LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA

Luis Bernadac-Villegas[1,*]

Alba Corral-Avitia[2]

Leobardo Gómez-Oliván[3]

Dora Solís-Casados[3]

Marisela Soto-Padilla[1]

[1] Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez Chihuahua.

[2] Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez Chihuahua.

[3] Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

* luis.bernadac@uacj.mx

Resumen

El arsénico (As) es un contaminante ampliamente distribuido en diversas regiones del planeta. Las formas más abundantes de este metal en la naturaleza son inorgánicas como el arsenito (AsIII) o el arseniato (AsV), siendo la primera la más tóxica. Los minerales de arcilla natural son bien conocidos y familiares para el hombre desde los inicios de la civilización. Debido a su bajo costo, la abundancia, las altas propiedades de adsorción y el potencial de intercambio iónico, los materiales arcillosos son excelentes candidatos como adsorbentes. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia biológica de remoción del arsénico mediante filtros de arcilla natural. También se analizó la caracterización física y química de la arcilla natural. Los resultados de DRX mostraron cuarzo y anortita como fases abundantes. El análisis SEM indica una estructura morfológica áspera, consolidada y de baja porosidad. La eficiencia de remoción de arsénico fue del 100% con un promedio de caudal de 2.5-3.5 L/h. La eficiencia biológica de los filtros fue determinada mediante el uso de biomarcadores de estrés oxidativo los cuáles son útlies para la detección temprana de la toxicidad inducida por As en peces.

Palabras clave: Arsénico, Adsorción, Filtros de Arcilla

1. Introducción

La calidad del agua potable se caracteriza por su composición física, química y biológica. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 13% de la población mundial (884 millones) vive sin acceso a una fuente de agua potable (OMS, 2008). La industrialización es la principal causa de contaminación de las fuentes de agua subterránea y superficial (Peng FF y DI P, 1994).

El arsénico (As) es un contaminante ampliamente distribuido en diversas regiones del mundo (Flora et al. 2005). La presencia de arsénico (As) en agua de manera natural se ha convertido en un problema mundial en las últimas décadas. Actualmente se ha reportado el incremento de contaminación de As de origen natural en diferentes países como China, Taiwán, India, Bangladesh, Estados Unidos, Canadá, México, Chile, Argentina, Nueva Zelanda, Polonia, Hungría, Croacia, Serbia y Rumania (Wang et al., 2004). Actualmente se han encontrado niveles de arsénico en aguas subterráneas por encima de los límites permisibles definidos para el agua potable en varias áreas de México, incluida la Comarca Lagunera (estado de Durango-Coahuila), Los Azufres (Michoacán), San Antonio (Baja California Sur), Durango (Durango), Hermosillo (Sonora), Zacatecas (Zacatecas), Acámbaro (Guanajuato); Puebla, (Puebla), Cuautla (Morelos), Delicias (Chihuahua) y Zimapán (Hidalgo) (Cebrián et al., 1983; Quinto et al., 1995; Gutiérrez et al., 1996; Armienta et al., 1997; Birkle et al., 1998; Carrillo and Drever, 1998; Wyatt et al., 1998; Simeonova, 1999; Rosas et al., 1999; Alarcón et al., 2001). El arsénico es considerado un oligoelemento tóxico, y está naturalmente presente en el agua en diversos estados de oxidación y especies químicas. Las formas más abundantes de este metal en la naturaleza son inorgánicas como el arsenito (AsIII) o el arsenato (AsV), siendo la primera la más tóxica (Akter et al. 2005). Suele estar presente en agua como AsV afectando directamente a las especies acuáticas. Al ser ingerido por humanos u otros mamíferos en agua o a través de alimentos contaminados, el AsV se metaboliza a AsIII y se conjuga con moléculas orgánicas formando metil arsénico (Thomas et al. 2001). La toxicidad por As en humanos se asocia predominantemente con la exposición a As inorgánico (Tchounwou et al., 2003). Las principales rutas de exposición de las personas al As son la ingesta e inhalación. El As es acumulable en el organismo por exposición crónica y superada por ciertos niveles de concentración. Puede ocasionar afecciones como alteraciones de la piel, lesiones dérmicas, vasculopatías periféricas, además de enfermedades respiratorias; neurológicas, cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (pulmón, riñón, hígado, vejiga y de piel). Las personas que ingieren de forma prolongada As inorgánico, a través del agua, pueden presentar hiperqueratosis palmoplantar cuya manifestación principal es la pigmentación de la piel y callosidades localizadas en manos y pie (Wilson, 2001). Los procesos y tecnologías disponibles para la remoción de As del agua son variados y com-

prenden desde tratamientos en plantas potabilizadoras convencionales hasta métodos domiciliarios. Los procesos de remediación que se conocen en la actualidad son: oxidación; precipitación, coagulación y ablandamiento con cal; ósmosis inversa; microfiltración; nanofiltración; adsorción, tratamientos biológicos y fitorremediación; electrodiálisis y electrocinética, entre otros (Arman,1992; Fetter, 1993; Konstantinos et al., 2006). La adsorción es considerada una técnica de remoción de As relativamente simple, eficiente y de bajo costo, la cual se utiliza principalmente en zonas rurales. Para este tipo de tecnología existe una amplia gama de materiales que se pueden usar tales como: arcillas, materiales biológicos, óxidos metálicos, carbón activado y resinas poliméricas. Sin embargo, la búsqueda de adsorbentes económicos y eficaces para la eliminación de As en agua aún está en estudio (Mohana y Pittman, 2007). En la actualidad existe una amplia gama de materiales adsorbentes para la eliminación de arsénico en agua. Las arcillas naturales, zeolitas y óxidos metálicos se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes terrestres. Estos materiales tienen la capacidad de adsorber compuestos catiónicos, aniónicos y neutros por lo que son altamente utilizados para este tipo de tratamiento (Murugesan et al., 2006; Bertocchi et al., 2006; Mohana y Pittman, 2007; Ranjan et al., 2009). Debido a su bajo costo, abundancia, altas propiedades de adsorción y potencial para el intercambio iónico, son excelentes candidatos como adsorbentes (Shichi y Takagi 2000). Una de las tecnologías más prometedoras para el tratamiento del agua son los filtros a base de arcilla (Kallman et al. 2011). Estudios recientes han informado que estos filtros pueden eliminar de manera efectiva los metales, microorganismos y turbidez del agua en un laboratorio (Oyanedel-Craver y Smith 2008; Bielefeldt et al. 2009). El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de remoción del arsénico mediante filtros naturales de arcilla. También se realizó una caracterización fisicoquímica de la arcilla natural.

2. Materiales y métodos

2.1. Síntesis y caracterización de los filtros de arcilla

Sitio de muestreo. Las muestras de arcilla natural se obtuvieron de Ciudad Juárez, Chihuahua México debido a su extenso desierto árido que permitió el análisis de diferentes muestras de minerales de arcilla.

Preparación de la muestra. La caracterización de las muestras de arcilla natural se determinaron mediante espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDS) y difracción de rayos X (DRX). Las pruebas EDS se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-636OLV. Las muestras se secaron en horno a 40 °C durante 24 horas (h) y se almacenaron en un desecador de vacío. Posteriormente, se colocaron 5 granos de muestra sobre un soporte de aluminio y se metalizaron con polvo de oro en un secador de

punto crítico Balzer Union FL 9496 (SCD 030), bajo una presión de 0.1 mbar. El software Noran System Six se utilizó para determinar el porcentaje atómico de cada muestra analizada. Para llevar a cabo el análisis DRX, se pulverizó una muestra de arcilla natural en un recipiente recubierto con carburo de tungsteno. Posteriormente, se usó una muestra de 7 g del material pulverizado mezclado con 1.4 g de cera orgánica para producir comprimidos. Para la determinación de la composición química de la muestra, estos comprimidos se colocaron en un equipo Philips-Panalytical PW 2400. En la etapa inicial del estudio, las muestras se trituraron en un mortero para pasar a través de un tamiz de 0.4 mm y luego se tomaron varias muestras al azar, se molieron y los datos de difracción se recolectaron en las mismas condiciones. Las fases de las arcillas se identificaron utilizando el software X'PertHighscore plus. También se determinó la porosidad total, la densidad y el diámetro promedio de poro.

2.2. Proceso de fabricación de los filtros a base de arcilla

Materiales y equipo. Para la fabricación de los filtros se uso arcilla y aserrín. La arcilla se usa frecuentemente para fabricar ladrillos; sin embargo, los filtros fueron fabricados con solo el 25% de humedad. La arcilla fue molida en seco antes de su uso para que se pudiera mezclar con el aserrín. Este se quema durante el proceso de cocción y deja pequeños poros detrás en el material cerámico que permite que el agua pase a través de el. El aserrín fue tamizado en una malla estándar tamaño 30 (600 µm) para obtener partículas del tamaño adecuado. El tamaño máximo de poro deseado fue de 1 µm. Para este estudio se construyeron 30 filtros utilizando diferentes proporciones (50-50, 60-40, 70-30, 80-20 y 90,10) de arcilla y aserrín que se depositaron en un mezclador con el 25% adicional de peso/agua y se mezclaron durante 5 min. Los filtros se construyeron en el Laboratorio de Ciencias Ambientales (Universidad Autónoma de Ciudad Juárez) utilizando tubos de PVC de forma cilíndrica de 3 a 5 pulgadas de largo y 2 a 2.5 pulgadas de diámetro. La producción consistió en agregar una muestra de mezcla de arcilla y aserrín a las tuberías de PVC utilizadas como moldes. Finalmente, el molde se retiró con cuidado y los filtros se dejaron secar durante 1 día antes de colocarlos en un horno para sinterizarlos a una velocidad de calentamiento de 4 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 1100 °C y posteriormente se enfrió. Se eligió un diseño de filtro cilíndrico para simplificar la geometría (en relación con la forma de una maceta) y así facilitar la conductividad hidráulica unidimensional y los experimentos de transporte de contaminantes.

2.3. Análisis de adsorción del arsénico

El análisis de adsorción se llevó a cabo usando el método 200.9 de la EPA (Agencia de Protección Ambiental). Este método proporciona procedimientos para determinar las cantidades de elementos disueltos y recuperables

totales mediante espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito (GFAAS) de varias fuentes de agua. Para este estudio, el análisis de las muestras se realizó en un horno de grafito Perkin Elmer HGA 900 y un inyector automático Perkin Elmer AS 800 (MDL 2.6 µg/L). Un estándar de calibración de As que consiste en 2.0 µg/ml de As_2O_3 en HNO_3 al 2%, usando $Pd(NO_3)_2$ en NO_3 al 15% y $Mg(NO_3)_2$ como modificador de matriz para aumentar la sensibilidad del horno de grafito. El blanco utilizado a lo largo del experimento fue una solución de HNO_3 al 2% (Aristar® Ultra). Se utilizó agua desionizada en todas las mediciones experimentales. La absorbancia máxima detectada se utilizó junto con los niveles de calibración para determinar la concentración de As en las muestras.

2.4. Adsorción de arsénico en función del pH

Los análisis en función del pH, tiempo de contacto y concentración se llevaron a cabo con 0.1 g del adsorbente y 50 ml de (100 ppm AsIII). La concentración de arsénico se determinó espectrofotométricamente.

2.5. Determinación de la eficiencia biológica

Un total de 100 carpas comunes (*Cyprinus carpio*) de 10.3 ± 0.53 cm de longitud y 6,4 ± 0.45 g de peso se obtuvieron de las instalaciones de acuicultura en Tiacaque (Estado de México), se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno con agua oxigenada y se colocaron en Tanques de 200 L que contienen agua sin clorar reconstituida: $NaHCO_3$ (174 mg L^{-1}), $MgSO_4$ (120 mg L^{-1}), KCl (8 mg L^{-1}) y $CaSO_4.2H_2O$ (120 mg L^{-1}), a 20 ± 2 °C de temperatura, 80-90% de concentración de oxígeno, 17.5 ± 6.3 mg de L^{-1} de alcalinidad total y 18.7 ± 0.6 mg de L^{-1} de dureza total, y se aclimataron durante 30 días antes del experimento. Durante la aclimatación, los especímenes fueron alimentados con Pedregal SilverTM y al menos 3/4 del agua del tanque se reemplazó cada 24 h. Se mantuvo un fotoperíodo de luz-oscuridad natural de 12:12 h para realizar la evaluación biológica mediante la medición de diferentes biomarcadores (HPC, LPX, PCC, actividad enzimática de SOD, CAT y GPX) del estrés oxidativo. Dos grupos (control y expuestos) de 10 peces cada uno se colocaron en 4 L con agua reconstituida. Se agregaron 0.05 mg de As(III) L^{-1} al agua de los grupos expuestos, equivalente al límite máximo permisible establecido en la norma oficial (NOM-127-SSA1-1994) sobre salud ambiental y agua para uso humano y consumo, y los peces fueron expuestos durante 12, 24, 48, 72 y 96 h, sin alimento proporcionado.

2.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y las diferencias de cada grupo se compararán usando la prueba de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples contra un testigo. Las dife-

rencias serán consideradas significativas a una P<0.05. Se utilizó StatPlus: mac v2009 (AnalystSoft, España).

3. Resultados

3.1. Caracterización y diseño de los filtros a base de arcilla

Los resultados del experimento muestran que el filtro de prueba redujo las concentraciones de arsénico por debajo de los estándares de agua potable de la OMS y la EPA. Los resultados de DRX de filtros sinterizados se muestran en la Figura 1. En general, existen dos mecanismos importantes de la adsorción de surfactante catiónico en sólidos: 1) intercambio iónico y 2) interacciones hidrofóbicas. Desde un punto de vista mineralógico, todos los filtros tienen componentes cristalinos similares; En general, la fase más abundante es el cuarzo. La intensidad de las reflexiones, incluida la fase más abundante, no es alta, la forma de los picos y el difractograma indican que la muestra contiene una alta proporción de fases amorfas, inobservable por DRX. Como fases de nueva formación, las muestras también contienen anortita y calcita en varias proporciones.

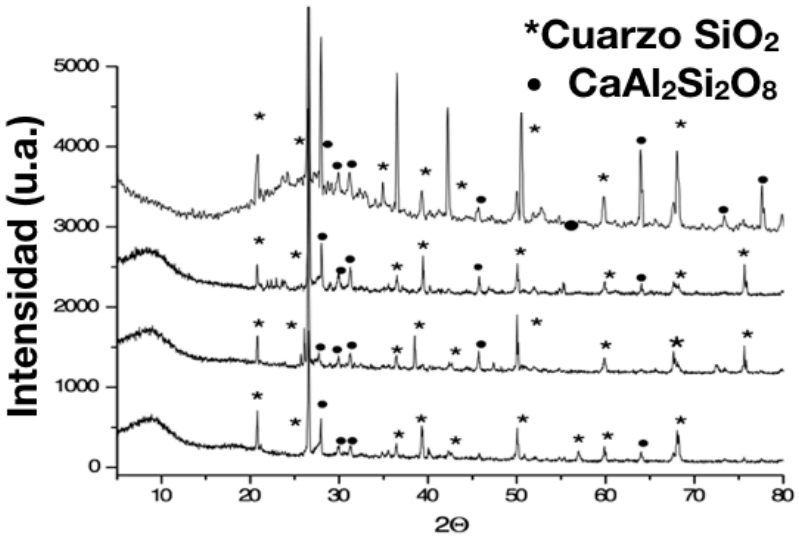


Figura 1. Fases cristalinas obtenidas por DRX de los filtros sinterizados a 1100 °C

La estructura del filtro de arcilla se determinó utilizando un microscopio electrónico de barrido como se muestra en la Figura 2. Todos los filtros mostraron una superficie con una estructura morfológica rugosa y consolidada. Esto podría explicarse porque a una temperatura superior a 750 °C las partícu-

las se aglomeran creando un cuerpo cerámico más denso. Como resultado, la porosidad de los filtros disminuye al aumentar la temperatura de sinterización. Una observación superficial en SEM indica que los filtros no tenían grietas de orificios y que el tamaño máximo de poro observable de la superficie es de aproximadamente 12 µm.

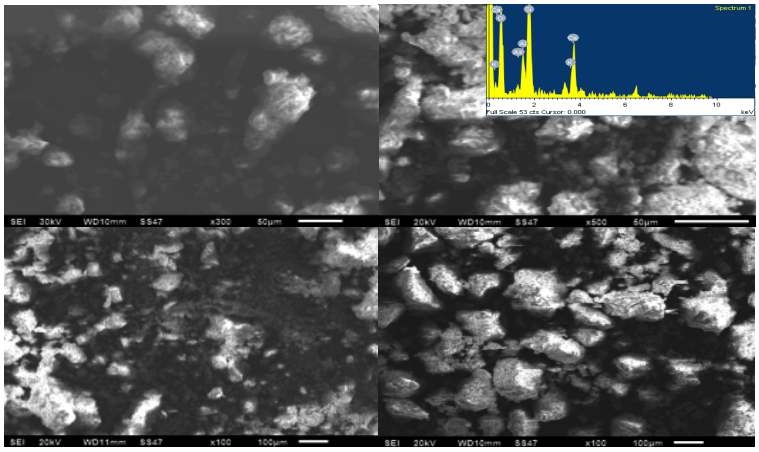


Figura 2. Micrografía de filtros de arcilla naturales sinterizados a 1100 °C

Se filtraron un total de 20 L en cada filtro de diferente proporción. La velocidad de flujo más alta observada (3.25 L/h) se obtuvo en la proporción de 90-10 (Figura 3). Es necesario comprender el comportamiento del flujo en escala microscópica para establecer la variabilidad debido a las modificaciones del material y las interacciones de la superficie que tienen lugar durante el flujo a través del filtro.

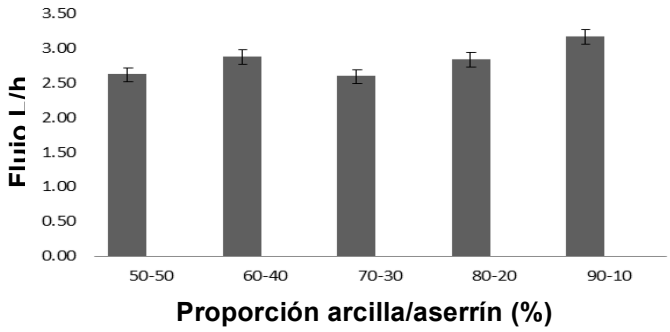


Figura 3. Velocidad de flujo tomada cada 10 L; Proporciones 50-50, 60-40, 70-30, 80-20 y 90-10.

La Figura 4 muestra el rendimiento general de los filtros de arcilla en la eliminación de As (III) en diferentes muestras de agua. Los resultados son el promedio (± desviaciones estándar) de 30 ensayos realizados por sitio de muestreo para todos los filtros utilizados. Los experimentos de cinética se realizaron utilizando una concentración inicial de 50 µg/L del metal obteniendo una eficiencia de remoción del 80 % a la primera filtración.

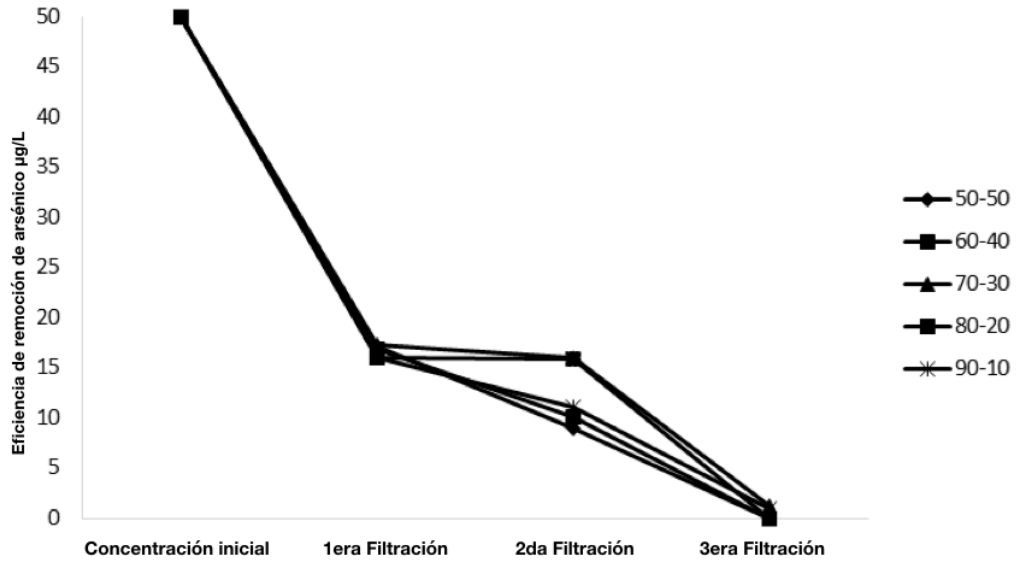


Figura 4 . Eficiencia de remoción de arsénico durante 3 filtraciones de agua y una concentración inicial de 50 µg/L.

La Tabla 1 mostró el análisis de la porosidad de los filtros sinterizados a diferentes proporciones de volúmen. Las distribuciones de tamaño de poro aleatorias pueden introducir una variación no uniforme en el comportamiento del flujo de medios porosos. Todos los filtros mostraron una alta porosidad (30-37%) pero una densidad similar.

Tabla 1. Área superficial, porosidad total, densidad y diámetro promedio de poro.

Proporciones	50/50	60/40	70/30	80/20	90/10
Área superficial (m^2/g)	27.3	26.7	22.1	21.8	21.5
Porosidad (%)	26.2	30.2	30.5	32.8	37.7
Densidad (g/cm^3)	2.23	2.36	2.40	2.33	2.47
Diámetro de poro promedio (µm)	2.2	7.6	2.9	3.3	2.5

3.2. Efecto del pH en la adsorción del arsénico (III)

El efecto del pH sobre la cantidad de absorción de arsénico por la arcilla natural se estudió en el rango de pH de 1 a 12, utilizando 0.1 g del adsorbente y 50 ppm en solución de As (III) con un tiempo de contacto de 60 minutos (Figura 5). El porcentaje de As (III) adsorbido aumentó de 64.5% (20.5 mg/g) a 95.7% (38.15 mg/g) en el rango de pH de 1 a 8, y luego disminuyó a 56.88% (30.45 mg/g) a pH 12. Estos resultados muestran que en un medio altamente ácido la adsorción de As (III) no es favorable. Esto se debe a la interacción débil que se produce entre el adsorbente y H_3AsO_3. Por lo tanto, la única fuerza impulsora entre H_3AsO_3 y el adsorbente es la adsorción física, lo que resulta en una menor adsorción. A valores de pH casi neutros (7 - 9), comienza la disociación lenta de los iones arsenito que producen H3AsO3 y alcanza un máximo a pH 8.0. Estos iones arsenito, parcialmente neutros y parcialmente cargados negativamente, son atraídos hacia la superficie cargada positivamente del adsorbente, lo que resulta en una alta absorción de As (III) por el adsorbente en este rango de pH. A pH 10 o superior, las superficies adsorbentes se cargan negativamente. Por lo tanto, la interacción entre el adsorbente y los iones arsenito disminuye lo que conduce a una baja adsorción de As (III) por parte del adsorbente.

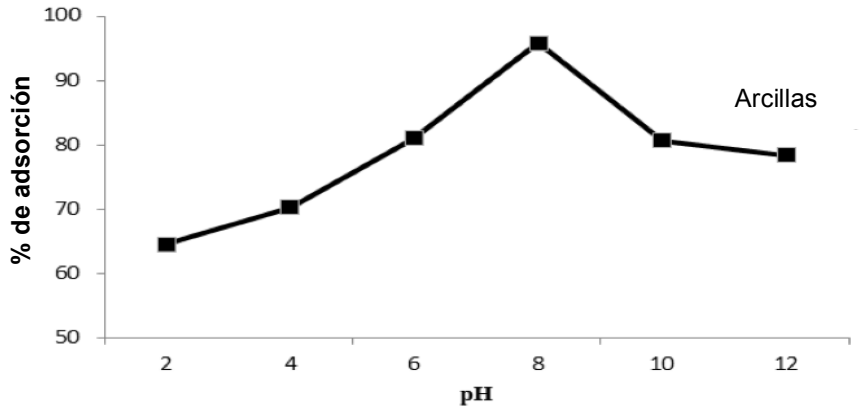


Figura 5. Adsorción del As (III) en función del pH.

3.2. Evaluación biológica

Cyprinus carpio se utilizó para determinar la eficiencia biológica de los filtros a base de arcilla antes (A) y después (B) del sistema de filtración de agua.

Los resultados de HPC se muestran en la Figura 6A. Se observaron diferencias significativas (P <0,05) con respecto al grupo de control en todos los tejidos evaluados durante al menos un tiempo de exposición. Se encontraron aumentos significativos en las branquias a las 72 h (124.1%), el hígado a las 12

h (1.62%) y 48 h (162.3%), sangre a las 24, 48, 72 y 96 h (128.5, 127.3, 128.2 y 119.1% respectivamente). El daño en términos de este biomarcador fue más evidente en la sangre. Después de la filtración con agua (figura 6B), se obtuvo una disminución significativa del 218.4% a las 72 h en branquia, al 187.7% a las 48 h en el hígado y al 88% a las 96 h en la sangre.

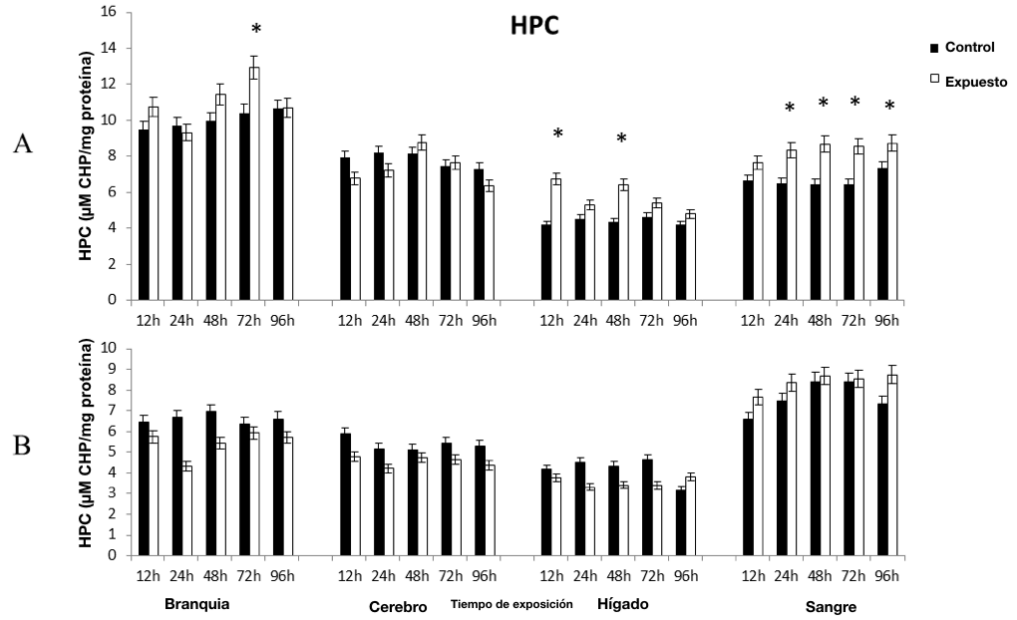


Figura 6 A,B**.** Contenido de Hidroperóxidos (HPC) antes y después en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsenico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (P<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (P<0.05). N=100 peces.

Los resultados de LPX se muestran en la Figura 7A. Se encontraron aumentos significativos (P <0.05) con respecto a los valores de control en branquia a las 12, 48 y 96 h (125.5, 118.7 y 136.5% respectivamente), cerebro a las 72 h (142.42%) y 96 h (134%). El hígado presentó un comportamiento similar al tejido cerebral y la sangre en todo el tiempo de exposición (131.2, 133.4, 130.9, 133 y 132.1% respectivamente siendo el órgano más dañado. Sin embargo, se observó una reducción significativa en las branquias (72,44%), el cerebro (57%), el hígado (62,5%) y la sangre (57,26%) después de la filtración de agua (Figura 7B).

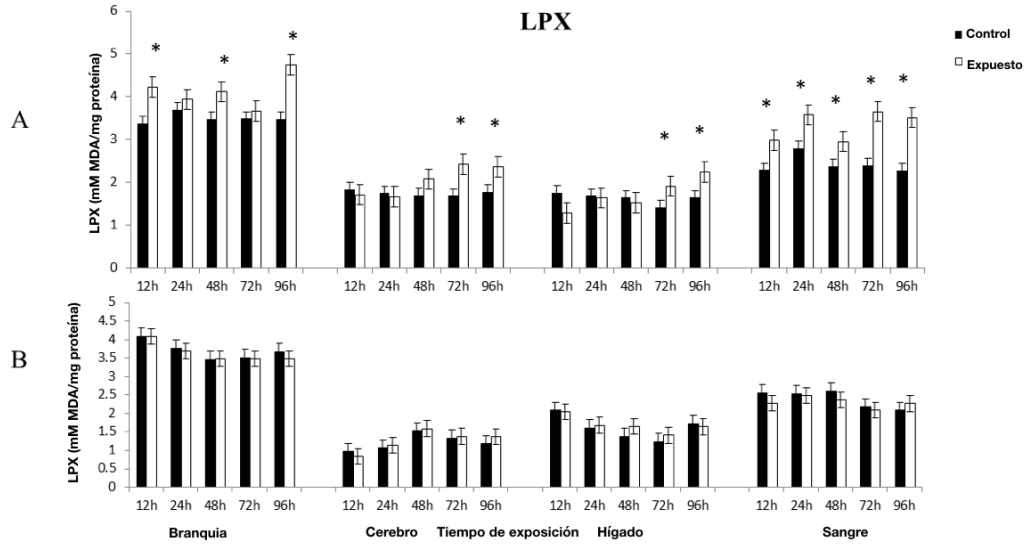


Figura 7 A,B. Grado de Lipoperoxidación (LPX) en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (P<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (P<0.05). N=100 peces.

La Figura 8A muestra los resultados de PCC; Se observan diferencias significativas con respecto al grupo control (P <0.05). Los incrementos ocurrieron en las branquias a las 12, 24, 48, 72 y 96 h (139, 98.2, 142.3, 145 y 135% respectivamente), el cerebro a las 24 h (98%), 72 h (132.7%) y 96 h (133.4%).), hígado a las 12 h (142,4%) y 24 h (138,8%) y sangre en todos los tiempos excepto a las 48 h (122,3, 125,4, 128,6 y 129,2%, respectivamente). El daño fue mayor en las branquias. Sin embargo, después de la filtración con agua, se observó una disminución significativa del 100% en todos los tejidos (Figura 8B).

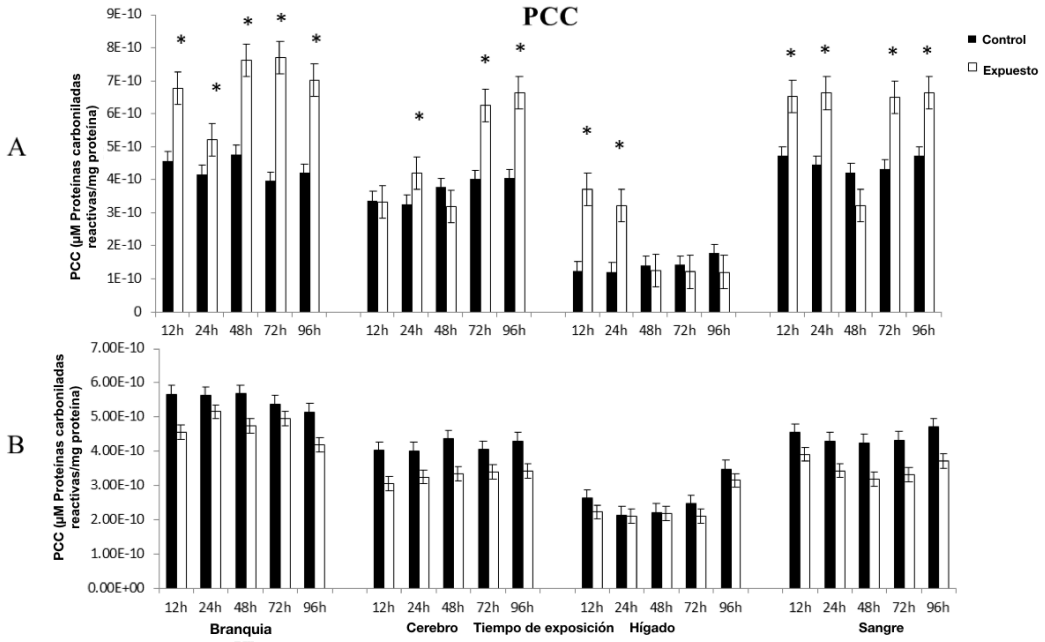


Figura 8 A,B. Contenido de Proteinas Carboniladas (PCC) en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (P<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (P<0.05). N=100 peces.

Los resultados de la actividad de SOD se muestran en la Figura 9A. Se obtuvo un aumento significativo con respecto al grupo control (P <0.05) en las branquias a las 12 h (129.7%) y a las 24 h (123.88%), cerebro 12 h (126.3%) y a las 48 h (124.5%) y sangre a las 12 h (126,4%) y 24 h (122,8%). Los estudios que determinan el efecto de este biomarcador en peces son limitados, pero la actividad de SOD se ha evaluado en mamíferos como ratas con resultados contrastantes.

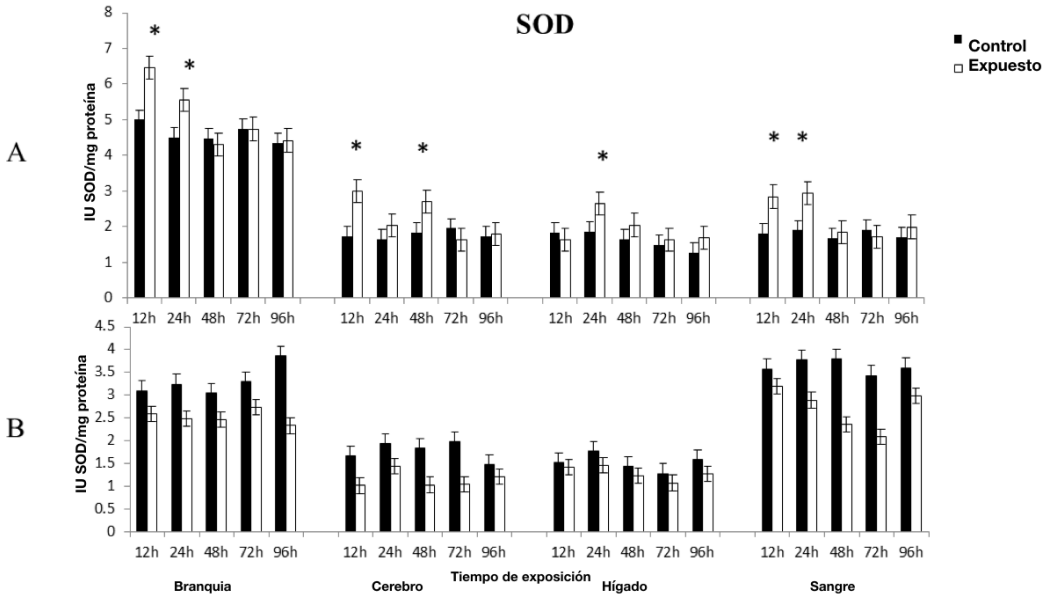


Figura 9 A,B**.** Actividad de Superóido Dismutasa (SOD) en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (*P*<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (*P*<0.05). *N*=100 peces

La Figura 10A muestra los resultados de la actividad CAT. Aumentos significativos con respecto a los valores de control (P <0.05) ocurrieron en las branquias a las 12, 24 y 96 h (128. 18, 126. 25 y 124.9% respectivamente) mientras que en el cerebro y la sangre solo ocurrieron a las 48 y 24 h respectivamente. Sin embargo, se observó una reducción significativa en las branquias (40%), el cerebro (38%), el hígado (40%) y la sangre (71%) después de la filtración de agua (Figura 10B).

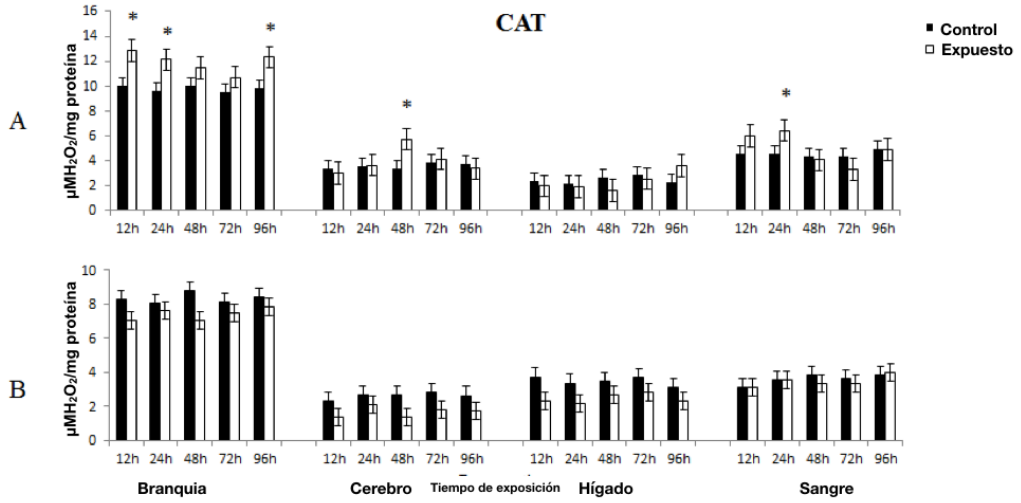


Figura 10 A,B. Actividad de Catalasa (CAT) en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (P<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (P<0.05). N=100 peces.

Los resultados de GPX se muestran en la Figura 11A. Reducciones significativas con respecto a los valores de control (P <0.05) ocurrieron en branquias a las 12, 24 y 96 h (130, 122.6 y 129.12% respectivamente), cerebro a las 24 h (122.4%) 48 h (134. 7%), mientras que En el hígado solo se observó a las 12 h de exposición. El daño fue más evidente en las branquias. La Figura 11B mostró una reducción significativa del 44% en las branquias, el cerebro y el hígado después de la filtración de agua.

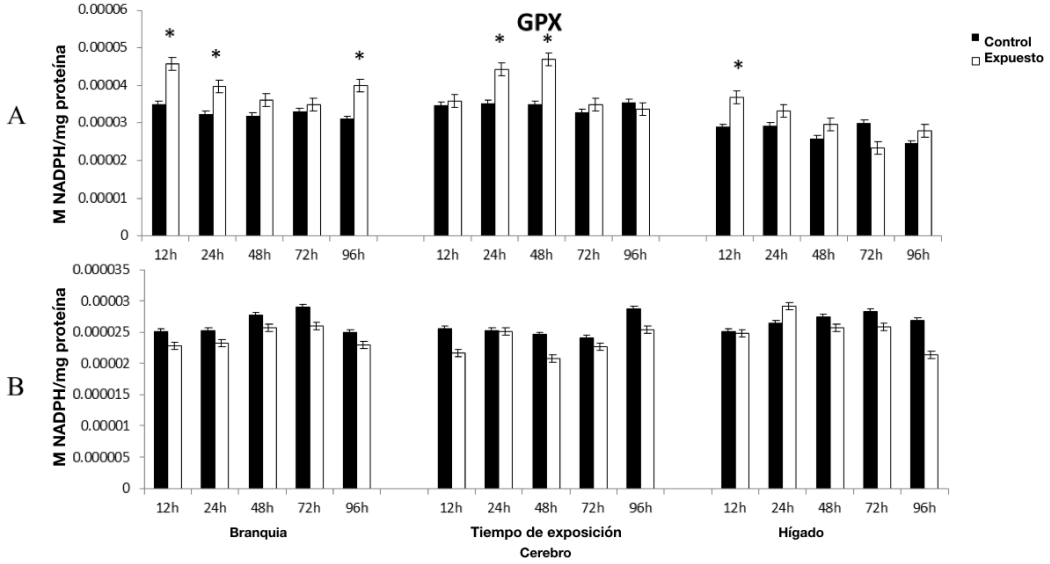


Figura 11 A,B. Actividad de Glutation Peroxidasa (GPx) en branquia, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a arsénico por 12, 24, 48, 72 y 96 h. *Diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA y Bonferroni (P<0.05). Diferencias significativas con respecto a: [a] 12 h; [b] 24 h; [c] 48 h; [d] 72 h; [e] 96 h (P<0.05). N=100 peces.

4. Discusión

Los filtros de arcilla sinterizados a más de 1000 °C presentan una capacidad sustancial de adsorción. Las arcillas son aluminosilicatos con una estructura cristalina en capas y están sujetas a encogimiento e hinchamiento a medida que el agua es absorbida y eliminada entre las capas. Están compuestos principalmente de sílice, alúmina y agua, con frecuencia con cantidades apreciables de hierro, álcalis y tierras alcalinas. Las dos veces mayores capacidades de adsorción obtenidas con las arcillas naturales contribuyen a la suposición de que se produce quimisorción, ya que el material arcilloso exhibe un área superficial específica BET significativamente menor, lo que es una característica crucial que mejora las propiedades de adsorción de un material. Las capacidades de adsorción obtenidas en este trabajo con sorbentes naturales se han comparado con los resultados obtenidos con sus formas sintéticas. Para la comparación de la sorción de As (III), se han considerado diferentes trabajos: Matis et al. estudió la adsorción de arsénico en una goetita sintética; Manning et al.

quien también trabajó con una goethita sintética; y Dixit y Hering, que realizaron experimentos de sorción de arsénico en goetita y magnetita (ambos sintéticos). Como se puede observar, los resultados obtenidos con los absorbentes naturales y con los sintéticos son similares. Se obtiene una sorción aproximadamente constante de As (III) a pH ácido a neutro, mientras que disminuye a pH alcalino. A nivel celular, los metabolitos de As (III) y As (V) actúan a través de diferentes mecanismos; Como (V) es similar en estructura al fosfato inorgánico y, en consecuencia, compite con este último en la producción de ATP, desacoplando la fosforilación oxidativa a través de la formación de un éster de arsenato inestable que se hidroliza espontáneamente (Thomas et al. 2001). Los mecanismos de toxicidad de As implican numerosas proteínas y enzimas que contienen grupos sulfhidrilo que se modifican mediante As. Los resultados del HPC (Figura 6A) pueden explicarse por el hecho de que As ataca directamente la mitocondria, afecta el transporte de electrones durante la respiración celular e induce una mayor formación de ROS (Yamanaka y Okada 1994), dando lugar al radical hidroxilo (HO *, que es medido directamente en esta prueba). Durante la LPX, los ácidos grasos poliinsaturados de doble cadena reaccionan con ROS, particularmente con HO * y RNS como el peroxinitrito (ONOO-), a través de un mecanismo de reacción en cadena que permite la formación de hidroperóxidos (Filho et al. 2005). Un estudio de Altikat et al. (2014) informa un aumento significativo en los niveles de MDA hepática debido a la acumulación de As en *Cyprinus carpio* expuesto a este metal. Estos resultados son consistentes con Bagnyukova et al. (2007), quienes informaron un aumento de LPX en el hígado de pez dorado *Coryphaena hippurus* expuesto a 200 µM de $NaAsO_2$. Bhattacharya y Bhattacharya (2007) observaron un comportamiento similar en el hígado de *Clarias batrachus*, así como en Ventura-Lima et al. (2009) en hígado y branquias de *Cyprinus carpio* después de la exposición a 84 mg de As L^{-1} y 1000 µg de As L^{-1} respectivamente. Todos estos estudios concluyeron que los aumentos de LPX dependían de la concentración y el tiempo, siendo mayores en concentraciones bajas de As (µg L^{-1}) y períodos de exposición prolongados (> 48 h) como se observa en la Figura 7A. Los incrementos significativos de PCC como se muestra en la Figura 8A también pueden deberse al hecho de que las ROS eliminan los protones de los grupos metileno en los aminoácidos, formando carbonilos que se unen a las proteínas e inducen daños en los centros nucleofílicos, la oxidación de los grupos sulfhidrilo y la fragmentación de péptidos, que culmina en la pérdida de la función de la proteína (Parvez y Raisuddin 2005). Castro et al. (2009) reportan aumento de PCC en el cerebro de *D. rerio* expuesto a 100 µ como L^{-1} durante 96 h. Esta oxidación es inducida por la interacción de ROS (* OH, O2-) con proteínas. Además, As ataca la mitocondria produciendo peroxi-nitritos (formados por el acoplamiento del anión superóxido al óxido nítrico). Vale la pena señalar que los últimos compuestos tienen una alta afinidad por los grupos de proteína sulfhidrilo e inducen au-

mentos en la carbonilación de proteínas (Kotsanis e Ili-opoulou-Georgudaki 1999; Pedlar et al. 2002). SOD es el primer mecanismo de defensa antioxidante y la principal enzima responsable de compensar los efectos de las ROS, en particular el ion superóxido (van der Oost et al. 2003), que se convierte en peróxido de hidrógeno (Figura 9A). La SOD cataliza la desmutación del anión superóxido, evitando la formación de radicales hidroxilo (Wang et al. 2006). Posteriormente, el H_2O_2 es secuestrado y degradado a H_2O por CAT y GPx. Un estudio realizado por Jain et al. (2012) no encontraron cambios significativos en la actividad de SOD en el cerebro, el hígado y la sangre de ratas expuestas a 0.325, 1.3 y 2.5 mg Como kg^{-1}, mientras que Bharti et al. (2012) encontraron una reducción significativa en este biomarcador en ratas hembra expuestas a 100 mg de As (III) L^{-1}. Ambos estudios concluyen que el efecto de As en la actividad de SOD depende de la edad, el sexo y el tiempo. Según Living-stone (2003), los incrementos en la actividad de SOD en peces y otros organismos acuáticos se deben a los altos niveles de anión superóxido inducidos por la exposición a diversos contaminantes ambientales, incluido el As. Según Coban et al. (2007), el radical superóxido también inhibe la actividad de CAT, que tiene un papel importante en la protección de la célula contra ROS. Los aumentos en este biomarcador en las branquias y el cerebro observados en la Figura 10A, son consistentes con Battacharya y Battacharya (2007), quienes reportan un aumento en la actividad de CAT en el hígado de *Clarias batrachus* expuesto a 84 mg L^{-1} durante 48 h. Por otro lado, Ventura-Lima et al. (2009) no encontraron cambios en la actividad CAT en el pez cebra expuesto a 10 µg L^{-1} As (III) durante 48 h. Estos autores concluyen que la actividad antioxidante en respuesta a la toxicidad de As puede variar según el tipo de tejido evaluado. Las reducciones en este biomarcador en nuestro estudio pueden explicarse por la producción de ROS y NOS, que en exceso puede promover una retroalimentación negativa inhibiendo la actividad CAT (Bagnyukova et al. 2006). Los resultados de GPx (Fig. 11A) son consistentes con los de Maiti y Chatterjee (2001), quienes también informan una reducción en la actividad de GPx en ratas después de la exposición a 15.86 mg de AsIII kg^{-1}. El arsénico induce una mayor actividad de GPx en diversos sistemas modelo y participa en la inducción de estrés oxidativo. Estudios anteriores han demostrado que las principales enzimas eliminadoras de H2O2 asociadas con la toxicidad de As son GPx y CAT, aunque GPx puede ser más eficaz contra la formación de ROS inducida por As, probablemente debido a su localización citosólica (Wang et al. 2004). Los minerales de arcilla natural han recibido una creciente atención por el control de la contaminación como componentes estándar en el tratamiento de aguas residuales (Kesraoui-Ouki et al. 1994). Las propiedades de intercambio iónico y de adsorción de los minerales de arcilla se han utilizado para la separación selectiva de cationes de la solución acuosa. Las arcillas son aluminosilicatos cristalinos e hidratados de cationes alcalinos y alcalinotérreos, que

tienen estructuras tridimensionales infinitas (Mampton, 1997). Pueden perder y ganar agua de forma reversible e intercambiar cationes constituyentes sin cambios en la estructura.

5. Conclusiones

El análisis químico, SEM-EDS y XRD muestra que la arcilla está constituida principalmente por alúmina y sílice en grandes cantidades y hierro, calcio, óxido de magnesio y otros elementos en pequeñas cantidades. El porcentaje de As (III) adsorbido aumentó de 64.5% (20.5 mg/g) a 95.7% (38.15 mg/g) en el rango de pH de 1 a 8, y luego disminuyó a 56.88% (30.45 mg/g) a pH 12. Exposición a 0.05 mg L^{-1} indujo estrés oxidativo en branquias, cerebro, hígado y sangre de *Cyprinus carpio.*

6. Conflicto de intereses

Los autores no reportan conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio fue posible gracias al apoyo financiero de la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México (SIEA-UAEM, proyecto UAEM 3722/2014 / CID).

7. Referencias

Akter K, Owens FG, Davey DE et al. (2005). Arsenic speciation and toxicity in biological systems. Rev Environ Contam Toxicol 184:97-149

Alarcón-Herrera MT, Montenegro FI et al. (2001). Contenido de arsénico en el agua potable del valle del Guadiana, México. Ing. Hidr. en México XVI(4), 63- 70

Altikat S, Uysal K, Kuru H et al. (2014). The effect of arsenic on some antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in various tissues of mirror carp (*Cyprinus carpio carpio*). Environ Sci Pollut Res. doi: 10.1007/s11356-014-2896-6

Arman, A. A Review of Remediation Technologies in the USA. Environmental Geotechnology, Balklema. 1992; pp. 385 – 389.

Armienta MA, Rodriguez R et al. (1997). Arsenic Contamination of Groundwater at Zimapán, México. Hydrogeology J. 5, 39-46

Bagnyukova TV, Luzhna LI, Pogribny IP et al. (2007). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. Environ Mol Mutagen 48:658-665

Bagnyukova TV, Chahrak OI, Lushchak VI (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. Aquat Toxicol 78:325-331

Bertocchi AF, Ghiani M, Peretti R, Zucca A. J. Hazard Mater. 2006; 134; 112.

Bhattacharya A, Bhattacharya S (2007). Induction of oxidative stress by arsenic in *Clarias batrachus*: involvement of peroxisomes. Ecotox Environ Saf 68:178-187

Bharti VK, Srivastava RS, Sharma B et al. (2012). Buffalo (*Bubalus bubalis*) epiphyseal proteins counteract arsenic induced oxidative stress in brain, heart, and liver of female rats. Biol Trace Elem Res 146:224-229. doi:10.1007/s12011-011-9245-0

Birkle P, Merkel B, Torres-Rodríguez V and González-Partida E (1998). Efectos ambientales por la descarga de salmueras en el campo geotérmico de Los Azufres, México, Resúmenes, 1ª. Reunión Nacional de Ciencias de la Tierra, México. D.F., 21-25 septiembre 1998, p. 127

Bielefeldt AR (2009). Water Treatment, Industrial. Encyclopedia of Microbiology, 3rd edition. M. Schaechter, editor, et al. Academic Press.

Caroli, F, Torre LA, et al. (1996). Element speciation in bioinorganic chemistry. Chemical analysis series. Volúmen 135. pp 445-463.

Carrillo, A. and Drever JI (1998). Adsorption of arsenic by natural aquifer material in the San Antonio-El Triunfo mining area, Baja California, México. Environ. Geol. 35, 251 – 257.

Castro M, Ventura-Lima J, Salomao-Freitas DP et al. (2009). Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol 150:337-342

Cebrian ME, Albores A, Aguilar M. Blakely E (1983). Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. Hum Exp Toxicol 2(1): 121–33.

Coban A, Ciftci M, Ozdemir H et al. (2007). Purification and characterization of catalase enzymes from chicken liver and sheep erythrocytes. Asian J Chem 19:3941-3953

Dixit S and Hering J G (2003). Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: Implications for arsenic mobility. Environ. Sci. Technol. 37, 4182-4189

Fetter CW. Contaminant Hydrogeology. Second Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1993; 500 p.

Filho WD, Torres MA, Zaniboni-Filho E et al. (2005). Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes 1847). Aquaculture 244:349-357

Flora SJS, Bhadauria S, Pant SC et al. (2005). Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats. Life Sci 77:2324-2337

Gutiérrez PA, Rodríguez RE et al. (1996). Eliminación del arsénico en agua potable de pozos. Actas INAGEQ 2, 319-322

Guggenheim S and Martin RT (1995). Definition of Clay and Clay Mineral: Joint Report of the Aipea and CMS Nomenclature Committees. Clay Minerals; September 1995 v. 30; no. 3; p. 257-259

Jain A, Flora G, Bhargava R et al. (2012). Influence of age on arsenic-induced oxidative stress in rat. Biol Trace Elem Res 149:382-390. doi:10.1007/s12011-012-9432-7

Kallman, E., V. Oyanedel-Craver and J. A. Smith (2011). "Ceramic filters impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment in rural Guatemala." Journal of Environmental Engineering 137(6): 407-415

Kesraoui-Ouki S, Cheeseman CR, Perry R (1994). Natural zeolite utilization in pollution control: a review of application to metal's effluents, J. Chem. Technol. Biotechnol. 59. 121–126

Konstantino CM, Dibyendu S and Rupali D. Evaluating a drinking-water waste by-product as a novel sorbent for arsenic. 2006; Chemosphere 64, pp. 730–741

Kotsanis N, Iliopoulou-Georgudaki J (1999). Arsenic induced liver hyperplasia and kidney fibrosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by microinjection technique: a sensitive animal bioassay for environmental metal-toxicity. Bull Environ Contam Toxicol 52:169-178

Livingstone DR (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Rev Med Vet 154:427-430

Maiti S, Chatterjee AK (2001). Effects on levels of glutathione and some related enzymes in tissues after an acute arsenic exposure in rats and their relationship to dietary protein deficiency. Arch Toxicol 75:531-537

Mampton FA (1997). Mineralogy and Geology of Natural Zeolities, Southern Printing Company, Blacksburg, VA.

Manning BA, Goldberg S (1997). Adsorption and stability of arsenic(III) at the clay mineral–water interface, Environ. Sci. Technol. 31 (7). 2005–2011

Matis KA, Zouboulis AI et al. (1999). Sorption of As(V) by goethite particles and study of their flocculation,Water Air Soil Pollut. 111. 297–316

Mohan Dinesh, Pittman Jr, Charles U. Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents – A critical review. Journal of Hazardous Materials. 2007; 142, pp. 1 – 53.

Murugesan GS, Sathishkumar M, Swaminathan K. Arsenic removal from groundwater by pretreated waste tea fungal biomass. Bioresour. Technol. 2006; 97: 483–487.

Oyanedel-Craver V and Smith JA (2008). "Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment." Environmental Science and Technology 42(3): 927-933

Parvez S, Raisuddin S (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ Toxicol Pharmacol 20:112-117

Pedlar RM, Ptashynski M, Evans R et al. (2002). Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). Aquat Toxicol 57:167-89

Peng FF and DI P (1994). Removal of arsenic from aqueous solution by adsorbing colloid flotation with hydrogen peroxide addition. Ind. Eng. Chem. Res. 33. 922-928

Quinto A, Santoyo E et al. (1995). Estudio geoquímico-ambiental de los efluentes naturales producidos en la zona geotérmica de Acoculco, Puebla. Ing. Hidr. en México X(3), 21-27

Ranjan D, Talat M, Hasan SH. J. Hazard Mater. 2009; 166; 1050.

Rosas I, Belmont R et al. (1999). Distribution of Arsenic Levels in Dairy Farms at Comarca Lagunera, Mexico. Water, Air, Soil Poll. 112, 133-149

Shichi T, Takagi K (2000). Clay minerals as photochemical reaction fields. J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev., 1: 113-130

Simeonova, PV (1999). Estudio piloto para remoción del arsénico, Estado de Hidalgo. Revista Ingeniería Hidráulica en México, 14:65-77. México

Sobsey MD, Stauber CE et al. (2008) Point of Use Household Drinking Water Filtration: A Practical, Effective Solution for Providing Sustained Access to Safe Drinking Water in the Developing World. Environ Sci Technol. 42 (12):4261–4267.

Tchounwou PB, Patlolla AK, Centeno JA. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure—a critical review. 2003. Toxicol Pathol 31(6):575–588.

Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol Appl Pharmacol 176:127-144

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57-149

Ventura-Lima J, Fattorini D, Regoli F et al. (2009). Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: Bioaccumulation, biotransformation and biological responses. Environ Pollut 157:3479-3484

Wang L, Xu ZR, Jia XY et al. (2006). Effects of arsenic (AsIII) on lipid peroxidation, glutathione content and antioxidant enzymes in growing pigs. Asian-Australas J Anim Sci 19:727-733

Wang YC, Chaung R-H, Tung L-C (2004). Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. Aquat Toxicol 69:67-79

Wilson R. Summary of the acute and chronic effects of arsenic and the extent of the catastrophe.2001; http://phys4.harvard.edu/~wilson/arsenic_project_introduction.html

World Health Organization 2008. Drinking water: Equity, safety and sustainability. Available in: http://www.wssinfo.org/fileadmin/user_upload/resources/report_wash_low.pdf

Yamanaka K, Okada S (1994). Induction of lung-specific DNA-damage by metabolically methylated arsenics via the production of free-radicals. Environ Health Perspect 102:37-40

Capítulo 16

VARIABLES NO CONSIDERADAS EN UNA EXTRACCIÓN CONTINUA Y SU INFLUENCIA EN DIAGNÓSTICOS AMBIENTALES DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Carlos M. Morales-Bautista[1*]

José del C. Méndez-Moreno[2]

Alejandra E. Espinoza de los Monteros R.[2]

Carolina G. Martínez-Chávez[1]

[1] Laboratorio de Análisis de Suelos e Hidrocarburos. Grupo de Investigación en Ciencias de la Tierra. División Académica de Ciencias Básicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

[2] Programa de Doctorado en Ciencias en Química Aplicada. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

[3] Cuerpo Académico en Ciencias de los Materiales. División Académica de Ciencias Básicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

* carlos.morales@ujat.mx

Resumen

En materia energética, en México se han tenido grandes cambios, por un lado, recientemente se aprobó una reforma de ley que permite la apertura para la inversión de capital privado a diferentes áreas y, por otro, incentivó la creación de nuevos órganos de gobierno que regularan tales actividades, especialmente en el sector de hidrocarburos. Sin embargo, hasta la fecha la mayoría de los diagnósticos de los impactos ambientales relacionados con este tipo de compuestos se siguen determinando con base en métodos que emplean disolventes no afines con todos hidrocarburos, específicamente las fracciones polares y asfalticas, generalmente relacionadas con efectos negativos sobre la fertilidad de los suelos. Algunos reportes mencionan que esto se debe a que la herramienta legal para establecer dichos impactos (NOM-138-SEMARNAT-SSA1-2012), no considera los diferentes tipos de suelos, ni clasifica los petróleos crudos. Es por esto que en el presente trabajo se analizaron extracciones de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) presentes en dos tipos de suelos clasificados según las texturas, los cuales fueron contaminados experimentalmente con dos petróleos crudos clasificados de acuerdo a los °API, las variables de respuesta fueron el tipo de disolvente (hexano y diclometano) y tiempo de extracción (6 y 8 h). Se pudo establecer que el tipo de textura del suelo influye en los niveles de extracción siendo la cantidad de arcilla un factor determinante, en el caso de los hidrocarburos, se observó que el disolvente clorado muestra mejores rendimientos y, que este es más afín con la fracción polar, sin embargo, se estableció que deben estudiarse más a fondo los mecanismos de adsorción/desorción del contaminante sobre la fase porosa ya que los porcentajes de extracción fueron menores en suelos con textura arcillo-limosa, también, en ambos casos no se llego a obtener un 100 % de extracción.

Palabras clave: Soxhlet, petróleo crudo, solventes, tiempo, suelo.

I. Introducción

A partir del 2013 en México se estableció una reforma de ley constitucional con el fin de maximizar el aprovechamiento de los bienes de la nación e incrementar la economía, uno de los principales factores fue que se permitía la inversión de capital privado tanto nacional como extranjero en la extracción y transformación de petroleo crudo que hasta ese entonces se encontraba restringido. En el caso del sector hidrocarburos, se creó la Agencia de Seguridad, Energía y Ambiente (ASEA), la cual, regula los términos de evaluación de impactos sobre los sistemas ecológicos, entre ellos, las líneas bases ambientales dirigidas a las obras en desarrollo o campos que licitarían para reaperturas o nuevos yacimientos a explotar (Barrientos *et al.*, 2014, Merchand, 2015).

A pesar de esto, en la actualidad siguen siendo escasos los estudios básicos sobre zonas que han estado sometidas a derrames de hidrocarburos, aunque han sido restauradas, la mayoría de ellas presentan baja productividad en los cultivos y han dado como resultado impactos negativos en el sector primario, lo que ha conllevado a conflictos legales y sociales durante décadas, especialmente en los estados del sureste del país (Castro *et al.*, 2012, Adams *et al.*, 2015). En estos sitios, se han llevado a cabo estudios que han identificado hidrocarburos residuales asociados a estos efectos, algunas hipótesis apuntan a que pueden estar relacionados con el tipo de suelo, ya que estos varían sus propiedades, que suelen variar según las condiciones ambientales de cada sitio en particular y, por ende, poseen diferente capacidad de respuesta ante un mismo contaminante, al contemplar este parámetro, se han realizado diagnósticos ambientales con ciertas incertidumbres, a lo anterior habría que sumarle que recientemente también se encontró que la composición química del petróleo crudo también puede influir el nivel de afectación según sea la fracción de hidrocarburo, lo cual es un factor determinante para la toma de decisiones para la recuperación de estos sitios, principalmente, sobre el tipo de remediación a emplear y así evitar efectos por hidrocarburos residuales. Algunas investigaciones apuntan a que ese tipo de compuestos causan repelencia al agua, provocando baja capacidad de campo y disminución de productividad primaria, muchos expertos muestran preocupación por este tema, especialmente si en un futuro quiere garantizarse el acceso a la alimentación (Pérez-Hernández *et al.*, 2013, Marín-García *et al.*, 2016).

Aunque las evaluaciones de impacto ambiental sobre los suelos contaminados no es un tema reciente, resulta ser muy compleja, lo anterior se debe a que los suelos son muy heterogéneos y sus características suelen cambiar entre un sitio y otro. Distintos investigadores coinciden en que cuando un contaminante es vertido en un suelo, el grado de afectación estará delimitada por varios factores, entre los que destacan la combinación de las propiedades de ambos, la cantidad

derramada y las condiciones ambientales (Zamora *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de los reportes coinciden que los efectos sobre la fertilidad del suelo pueden medirse en algunos términos tales como el potencial hídrico y la toxicidad (Soto *et al.*, 2014). En materia de hidrocarburos, se han establecido diagnósticos basados en los porcentajes de abundancia de fracciones SARA (Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfáltenos), ésta última es la fracción residual después de un tratamiento (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013).

En relación a la magnitud del impacto por derrames de petróleo, varios reportes especifican que algunos suelos pueden o no presentar problemas dependiendo de la cantidad de materia orgánica (%MO), la cantidad de arcilla (%R) y el nivel freático del suelo, así como de la viscosidad del hidrocarburo derramado, esta a su vez depende de las condiciones ambientales del sitio, por ejemplo, se ha observado que en climas fríos los crudos más pesados suelen tener menos movilidad que en ecosistemas tropicales (García-Torres *et al.*, 2011). Este tipo de ambientes, el área contaminada y la profundidad del derrame dependerá de la época del año, primero porque la viscosidad del crudo depende de la temperatura, la cual suele ser muy alta cierta época del año y, segundo, las lluvias registradas en algunos meses saturan el suelo que regularmente presenta manto freático elevado, esto también definirá los organismos expuestos a la toxicidad. Diversas investigaciones coinciden en que el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas son las estructuras de las arcillas, algunas poseen mayor área superficial y porosidad que otras, en consecuencia, la adsorción o desorción del contaminante estará en relación directa con la geomorfología del sitio, sin embargo, no existen estudios específicos que relacionen la disposición del contaminante al medio según el tipo de suelo (Adams *et al.*, 2008, Maldonado-Chávez *et al.*, 2010). Por ejemplo, en investigaciones realizadas en zonas tropicales del estado de Tabasco, se ha observado que algunos suelos de lomerío presentan problemas de fertilidad aun con concentraciones por debajo del límite normativo y, en otros casos, en la zona aluvial de esta misma demarcación se han reportado suelos aluviales con alto contenido de hidrocarburos en los que se han podido establecer pasto (Zavala *et al.*, 2005, Morales-Bautista *et al.*, 2016). Si a lo anterior agregamos que los límites normativos especificados en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 se basan en un método de extracción (1664-A Soxhlet) que emplea un disolvente que no solubiliza a todas las familias de hidrocarburos (hexano), principalmente resinas y asfaltenos, siempre se tendrán errores en la determinación u por ende, en las medidas empleadas durante la restauración; existen quienes enfatizan en que al no tomar en cuenta estas consideraciones siempre se presentaran efectos residuales, principalmente, repelencia al agua y problemas para establecer cultivos por temporal (DOF, 2012; Riveroll-Larios *et al.*, 2015, Morales-Bautista *et al.*, 2018).

En este contexto, existen diversas investigaciones en las que se emplea el método normado, pero con la implementación de otros disolventes o mezclas de estos, en los que destacan metanol, éter etílico, diclorometano, butanol, acetato de etilo, acetona, ciclohexano, la cuales buscan cuantificar alguna fracción en particular, o bien, hidrocarburos totales del petróleo o HTP según sea la matriz, así mismo, hay quienes relacionan estas fracciones para validar métodos espectrofotométricos y predecir la calidad de los petróleos crudos (Meléndez *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2017). Estas técnicas analíticas, han servido como base para la identificación de familias de los hidrocarburos y su relación con la toxicidad al medio, existen reportes que mencionan que la cuantificación varía según el disolvente y, en otros casos, también el tiempo de extracción, aunque no especificaban el tipo de suelo ni el tipo de hidrocarburo, pudieron establecer que hay diferencias significativas que no son consideradas en las remediaciones (Pons-Jiménez *et al.*, 2011, Palma-Cruz *et al.*, 2016). Existen estudios que confirman que el petróleo crudo varía su composición de acuerdo a la abundancia relativa de las familias de hidrocarburos en relación con los °API y, debido a que los suelos son diferentes, la interacción que tenga el hidrocarburo sobre ellos será diferente en cada caso (Martínez-Chávez *et al.*, 2017). En este tema, la norma ambiental especifica que debe usarse hexano como solvente para la extracción de HTP para todos los suelos, pero hay estudios que prueban que este es ineficiente para hidrocarburos de fracción pesada (García *et al.*, 2016). Por lo tanto, si se emplea un disolvente específico para cada suelo que coadyuve o sustituya al ya establecido en el método 1664-A Soxhlet (DOF, 2012) ¿Mejorará la eficiencia de extracción?

Para dar respuesta a esta pregunta, se planteó la hipótesis que los petróleos crudos poseen compuestos que químicamente no son afines con el hexano, por tanto, al emplear este disolvente no se garantiza la extracción en su totalidad, en específico, los de muy baja toxicidad y que son muy difíciles de biodegradar; de la misma forma, debido a que los suelos poseen propiedades diferentes, los tiempos de tratamiento para retirar el contaminante depositado en la matriz serán diferentes para cada tipo de suelo. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la eficiencia de extracción en la determinación de HTP empleando como base el método 1664-A Soxhlet mediante cuatro variables de respuesta: Tipo de petróleo crudo, tipo de suelo, tipo de disolvente y diferentes tiempos de extracción. Con los resultados se lograron establecer herramientas que permitirán tener menores incertidumbres en los diagnósticos de impactos ambientales y remediación de suelos contaminados con petróleo crudo.

I. Materiales y métodos

1.1. Suelos testigos

Se muestrearon dos suelos con diferentes texturas (arenoso y arcilloso), seleccionados por estar aledaños a instalaciones petroleras en el estado de Tabasco y con vocación de uso agrícola. El primero, cercano a la terminal marítima del puerto de dos bocas en Paraíso (UTM 15Q 0475593 m E, 2030615 m N) fue considerado como suelo arenoso y, el segundo, en el municipio de Huimanguillo (15Q, 1967296 m E, 0399468 m N) contiguo a una batería de separación, debido a la ubicación geográfica de este sitio, se le denomino un suelo de lomerío (Palma-López *et al.*, 2007). En cada sitio, se tomó una muestra compuesta (70 cm para suelo de Paraíso y 140 cm para suelo de Huimanguillo) que sirvió como testigo y que paralelamente se contaminaría experimentalmente con los crudos. A cada estrato geológico se le determinaron propiedades físicas y químicas (n=3) de rutina de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 con el fin de establecer condiciones iniciales de cada suelo (DOF, 2002).

1.2. Petróleo crudo.

En cuanto a operatividad, hasta la fecha el estado de Tabasco solo cuenta con instalaciones de exploración y producción de petróleo, aunque recientemente se estableció el área designada para la construcción de una refinería. En esta zona del país, el producto es extraído de diferentes pozos agrupados en campos petroleros, posteriormente se redirecciona por ductos hacia baterías de separación (en su mayoría es aquí donde suceden los derrames), en estas instalaciones se reciben y se mezclan, ahí se trata en sedimentadores y separadores trifásicos para dividir gas, agua congénita y petróleo crudo, posteriormente la mezcla de crudo es enviada a petroquímica básica o refinería según su calidad, la cual es medible por distintos parámetros en los que destacan los °API y el análisis SARA, este último determina el porcentaje de familias presentes para definir su uso y pretratamiento. Según la ASEA, la mayoría de los campos de esta zona son maduros y de ellos se extraen crudo pesado y mediano, para este estudio se tomaron dos hidrocarburos del activo Cinco Presidentes, el primero se colectó en fuga de Pozo No. 1459 (15Q 308849 m E, 1980689 m N) y el segundo en el Pozo 637 (15Q 358179 m E, 1991885 m N). A cada uno se les determinó °API por el método ASTM-D287 con las modificaciones reportadas por (Morales-Bautista *et al.*, 2013) así como análisis SARA empleando mezclas de solventes clasificados de acuerdo a la polaridad (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003, Marín-García *et al.*, 2016).

1.3. Tratamiento de muestras.

Cada suelo testigo se secó a temperatura ambiente, se le eliminaron raíces y rocas, posteriormente se molió y tamizó (5 mm), se tomaron dos kilos de cada uno, homogenizado y se contaminaron con cada petróleo crudo a 40,000 $mg \cdot Kg^{-1}$ de suelo, para evitar evaporación, se homogenizaron nuevamente y se conservaron en frascos boca ancha a 10 °C durante 5 días. En total se obtuvieron nueve muestras por cada suelo (tres testigos y seis contaminados, de las cuales corresponden tres

para cada petróleo crudo). Posteriormente, se pesaron 10 g de suelo y se hicieron extracciones empleando un equipo Soxhlet a 60 °C (200 ml de disolvente). La extracción consistió en tratar cada muestra (testigos y contaminadas) con diclorometano a 6 y 8 h, se realizó la misma metodología con hexano (ambos marca Merck grado reactivo). El extracto obtenido se pasó a un rotavapor para recuperar el disolvente y el extracto se dejó evaporar a 60 °C hasta obtener peso constante, por último, se calculó HTP mediante el cociente de los miligramos del extracto (mg de hc) entre los kilogramos de suelo (0.01 Kg base seca). Para expresar los resultados, a cada HTP de suelo contaminado se le restó su testigo correspondiente.

2. Resultados y discusiones.

1.1 Suelos testigos.

Los resultados de los análisis de propiedades realizados a los suelos testigos según la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de suelos testigos. Fuente: Elaboración propia.

Suelo	**%MO**	**CIC**	**DA**	**DR**	**CE**	**pH**	**Textura**			**%CC**
							%A	**%L**	**%R**	
Paraíso	0.50 ± 0.1	3.5 ± 0.7	0.91 ± 0.02	1.17 ± 0.11	3.4 ± 0.0	7.01 ± 0.04	87	3	10	12 ± 0.5
Huimanguillo	2.1 ± 0.1	18.44 ± 0.7	1..24 ± 0.01	2.1 ± 0.11	0.51 ± 0.01	6.41 ± 0.04	5	47	48	25 ± 0.7

%MO =Materia orgánica, CIC = Capacidad de Intercambio Catiónico Cmol/Kg, DA = Densidad Aparente (gr/ml), DR = Densidad real (gr/ml), CE = Conductividad eléctrica (dS/m), %A = Arenas, %L =Limo y %R = Arcillas, %CC = Capacidad de Campo.

De los resultados de los suelos testigos se puede establecer que existe una diferencia en sus propiedades texturales, estas pueden medirse y compararse, ya que el suelo de Paraíso es de textura Arenosa con una porosidad del 22 %, en cambio el suelo de Huimanguillo se presenta textura Arcillo-Limosa con un 40 % de porosidad. Los parámetros %MO, CE, %CC y pH son comunes para ambos suelos, debido a que el arenoso se encuentra situado muy cercano a la zona costera, constantemente se ve influenciado por salinidad (CE cercana a suelos salino y bajo contenido de materia orgánica), en el caso del suelo arcillo-limoso, este se encuentra en un área de lomerío, la literatura la reporta con suelos acrisoles, los cuales que suelen ser más ácidos y con una CIC elevada, inclusive en el área se

desarrollan sembradíos de piña (García-López *et al.*, 2006, Ortiz-Salinas *et al.*, 2012, Ojeda-Morales *et al.*, 2012).

1.2 Petróleos Crudos.

Los resultados de los °API y de las fracciones SARA realizados a los petróleos crudos se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características petróleo crudos empleados en el estudio. Fuente: Elaboración propia.

Muestra	°API	Clasificación	% Saturados	% Aromáticos	% Resinas	% Asfáltenos
1	13	Pesado	34 ± 1	20 ± 1	21 ± 1	25 ± 1
2	25	Mediano	59 ± 3	21 ± 1	10 ± 0.5	10 ± 0.5

En los resultados de la Tabla 2 se puede apreciar que los petróleos crudos poseen diferencias en sus fracciones, específicamente se ven mayormente marcados en el porcentaje de saturados, de resinas y asfaltenos, la materia prima aprovechable son principalmente los saturados, aunque la naturaleza química de los compuestos saturados son los que definen los pretratamientos y los costos en refinería (cíclicos, lineales o ramificados) (Urpí, 2012), también los compuestos saturados resultan ser la fracción consumible por los organismos del suelo, principalmente bacterias endémicas (García-Torres *et al.*, 2011).

Por otro lado, distintos trabajos de investigación han establecido que parte de los compuestos aromáticos de los hidrocarburos pueden transformarse o acumularse, también en estos casos la biodisponibilidad depende de la naturaleza de los mismos y de las condiciones a las que son expuestas en cada suelo, en esta fracción, prácticamente no existe una diferencia entre los resultados de ambos petróleos pero sería importante caracterizar que tipo de compuestos aromáticos contiene cada uno y que tipo de toxicidad podría presentarse en cada uno de ellos en corto y mediano plazo (Pindado *et al.*, 2014). De la fracción resina y asfáltica, cierto número de reportes lo asocian con la reducción del potencial hídrico a largo plazo, específicamente en sitios con concentraciones residuales que no han sido remediados (pasivos ambientales), también existen estudios que han podido establecer que la fracción polar pudiese estar asociada con la disminución de la capacidad de campo (Morales-Bautista *et al.*, 2016); con base en esta hipótesis, la fracción polar del petróleo crudo pesado sería del 46% y la del mediano del 20 %, por lo que se espera que el crudo pesado sea mas repelente que el crudo mediano (Guzmán-Osorio *et al.*, 2015).

1.3 Hidrocarburos Totales del Petróleo.

Los resultados de las extracciones continuas mediante método 1664-A Soxhlet con las modificaciones se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. HTP suelos a diferentes condiciones. Fuente: Elaboración propia.

Tipo de Suelo	Tipo de petróleo	Disolvente y tiempo	Clave	Concentración HTP
Arenoso	Mediano	Hexano 6 h	AMH6	34 600 ± 127
		Hexano 8 h	AMH8	36 400 ± 135
		Diclorometano 6 h	AMD6	39 300 ± 180
		Diclorometano 8 h	AMD8	39 290 ± 140
	Pesado	Hexano 6 h	APH6	24 663 ± 112
		Hexano 8 h	APH8	26 503 ± 115
		Diclorometano 6 h	APD6	36 370 ± 101
		Diclorometano 8 h	APD8	36 390 ± 130
Arcillo-Limoso	Mediano	Hexano 6 h	ALMH6	27 230 ± 156
		Hexano 8 h	ALMH8	28 830 ± 178
		Diclorometano 6 h	ALMD6	36 225 ± 144
		Diclorometano 8 h	ALMD8	38 219 ± 142
	Pesado	Hexano 6 h	ALPH6	15 250 ± 105
		Hexano 8 h	ALPH8	25 731 ± 145
		Diclorometano 6 h	ALPD6	27 320 ± 130
		Diclorometano 8 h	ALPD8	33 310 ± 112

Los resultados de la Tabla 3, muestran que todos presentan un C.V. > 1, del mismo modo, se realizó un análisis de R para evaluar diferencias significativas, este se llevó a cabo para cada suelo con base el comportamiento de las extracciones de acuerdo al tiempo y el tipo de disolvente, posteriormente se comparó con el tipo de petróleo. De este modo, los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2 para suelo arenoso, así mismo, en las Figuras 3 y 4 las del suelo arcillo-limoso.

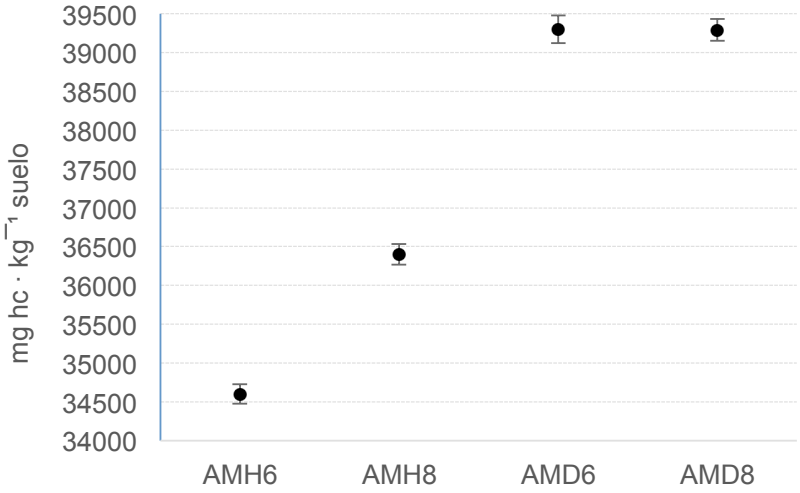


Figura 1. HTP suelo arenoso contaminado con crudo mediano según el tipo de solvente y tiempo de extracción. Fuente: Elaboración propia.

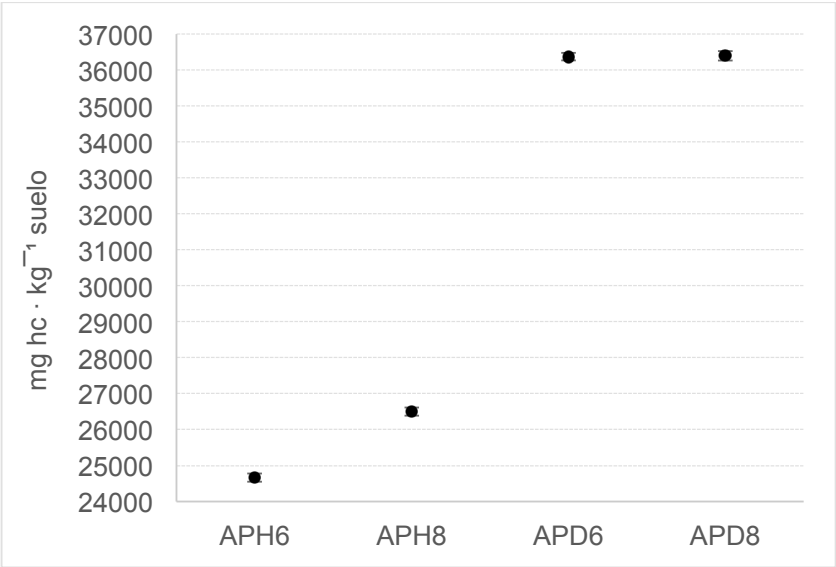


Figura 2. HTP suelo arenoso contaminado con crudo pesado según el tipo de solvente y tiempo de extracción**.** Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 1 y 2, se observa que en el suelo arenoso el diclorometano presenta mejores extracciones para ambos petróleos crudos. Por ejemplo, la Figura 1 exhibe que en las extracciones con hexano existen diferencias entre los porcentajes extraídos a 6 y 8 h tanto para crudo mediano como para crudo pesado, en el caso del mediano, a 8 h se tienen mejores resultados con un 91 %, también ambos tiempos presentan diferencias

significativas ($p<0.05$) entre sí. En contraste, las muestras de suelo arenoso contaminados con crudo mediano y tratadas con diclorometano, no presentan diferencias significativas ($p>0.05$) por lo que para estas muestras el tiempo óptimo de extracción es a 6 h con un 98% de rendimiento.

Este mismo comportamiento se observa en la Figura 2 que representa al suelo arenoso contaminado con petróleo crudo pesado, en estos resultados se encontraron diferencias significativas entre extracciones con hexano ($p<0.05$), siendo mejor la de 8 h ya que a este tiempo presentó una extracción máxima de 66%, también se observó que los tratamientos con diclorometano no presenta diferencias significativas entre sí ($p>0.05$) y la mejor extracción encontrada es del 91%, siendo el tiempo óptimo de extracción a 6 h. De manera general se puede deducir que las muestras contaminadas con petróleo crudo pesado tienen menores rendimientos que con crudo mediano. Al comparar las muestras con mayor número de extracciónes AMD6 y APD6 también se encontraron diferencias significativas por lo que existe la posibilidad de que también el tipo de hidrocarburo puede influir en la extracción ya que el crudo pesado presenta mayor afinidad al suelo que al solvente en comparación con el mediano.

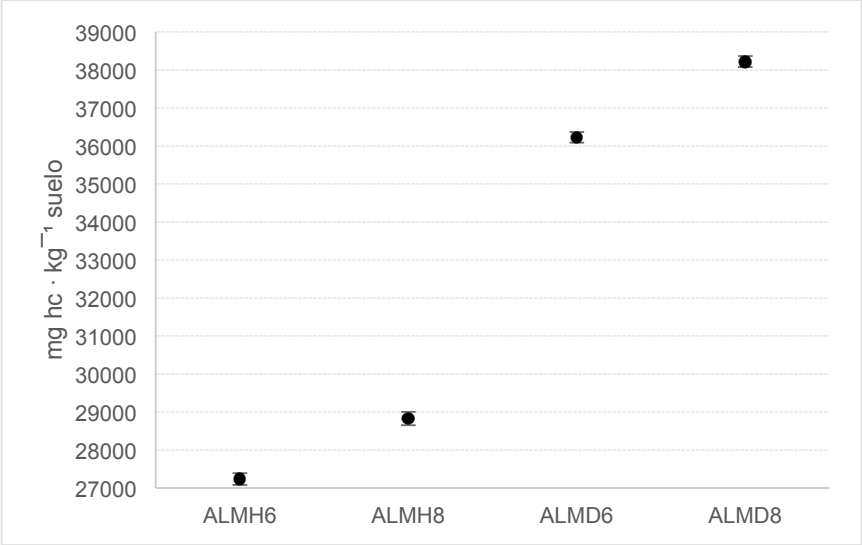


Figura 3. HTP suelo arcillo-limoso contaminado con crudo mediano según el tipo de solvente y tiempo de extracción. Fuente: Elaboración propia.

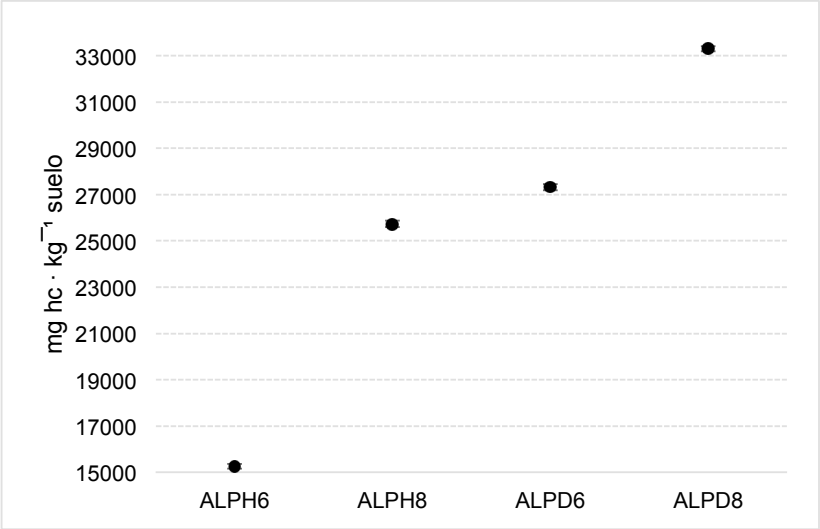
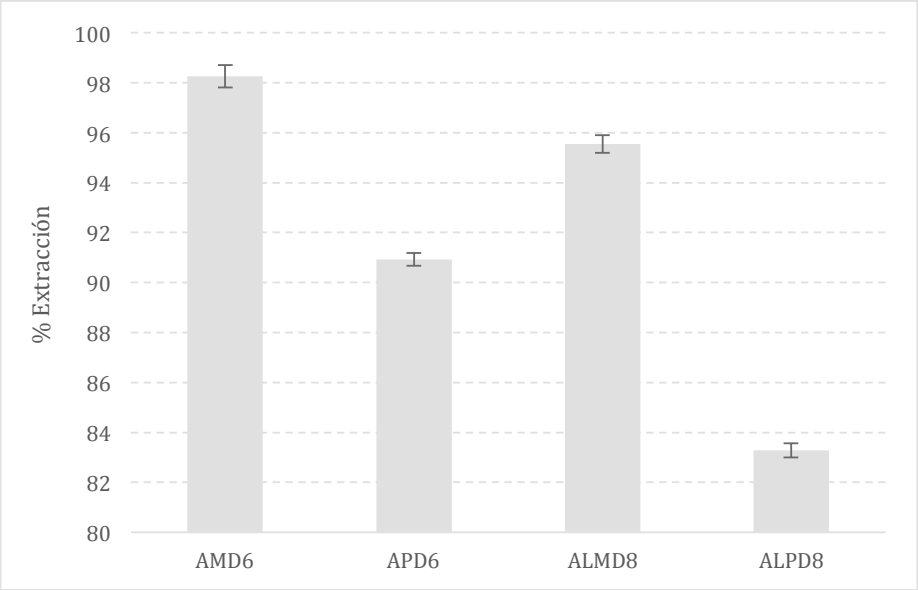


Figura 4. HTP suelo arcillo-limoso contaminado con crudo pesado según el tipo de solvente y tiempo de extracción. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de los análisis realizados al suelo Arcillo-Limoso contaminado con ambos crudos (Figura 4) muestran que, a excepción de ALPD6 y ALMH6, existen diferencias significativas entre sí ($p<0.05$) y que las mejores extracciones se realizan con diclorometano. Se observa también que en este modelo el tipo de petróleo influye, por ejemplo, las extracciones realizadas a las muestras contaminados con crudo mediano son mayores comparándolas con las de crudo pesado, se encontró que las contaminadas con crudo mediano tienen rendimientos del 95% y 90% a 6 y 8 h, respectivamente, en contraste las contaminadas con crudo pesado presentan una eficiencia del 83% y del 67% para 8 y 6 h, correspondientemente, inclusive esta última se encuentra por debajo de los porcentajes del tratamiento ALMD6 y de su homólogo tratada con hexano. Por lo anterior, se puede mencionar que los tiempos óptimos para la extracción de HTP se presentan para ambas fracciones de petróleos a 8 h empleando diclorometano como disolvente de extracción.

Todo lo anterior demuestra que el tipo de petróleo crudo puede influir en los tiempos de extracción y el tipo de disolvente a elegir, lo anterior es de suma importancia en la determinación de los límites máximos permisibles en el caso de que se requiera declarar un sitio contaminado o no bajo este criterio.

Por otro lado, para comparar si el tipo de suelo puede influir en los porcentajes de extracción, se tomaron las mayores extracciones representativas de HTP para cada tipo de petróleo crudo encontradas en los dos tipos de suelos, los resultados se muestran en la Figura 5.



AMD6: suelo arenosol con hidrocarburo mediano en diclorometano por 6 horas, APD6: suelo arenosol con hidrocarburo pesado en diclorometano por 6 horas, ALMD8: suelo arcilloso - limoso con hidrocarburo mediano en diclorometano por 8 horas, ALPD8: suelo arcilloso - limoso con hidrocarburo pesado en diclorometano por 8 horas

Figura 5. Eficiencia de extracción de diclorometano según el tipo de petróleo y tipo de suelo**.** Fuente: Elaboración propia

Los datos mostrados hasta ahora han podido demostrar que el diclorometano presenta un mayor rendimiento en una extracción continua en comparación con el hexano que es el disolvente recomendado por la norma, a esto también hay que sumarle los resultados mostrados en la Figura 5 establecen que existen diferencias significativas entre las muestras ($p<0.05$) de los suelos contaminados con dos tipos de petróleos crudos, siendo el de textura arenosa quien presenta menores problemas, al tener rendimientos mayores al 90%, esto mismo se observa para las muestras de suelo de lomerío contaminadas con crudo mediano, en contraste, la muestra de este suelo contaminado con crudo pesado solo alcanzó el 83% a un tiempo de 8 h.

La literatura establece varias recomendaciones para este tipo de casos, por ejemplo, puede aumentarse el tiempo de extracción y establecer una curva que logre establecer el tiempo óptimo para aumentar este porcentaje (Ocampo *et al.*, 2012). Sin embargo, Gutiérrez *et al.*, (2001) encontraron que suelo con textura arcillosa presentaban acumulación de hidrocarburos aun después de varios años de intemperización, inclusive no existe un mecanismo que explique la capacidad de adsorción y desorción de los hidrocarburos sobre los suelos.

Para establecer si existe una relación entre el tipo de fracción polar de los petróleos crudos y su afinidad con el disolvente, se contrastaron los rendimientos

de las extracciones con los porcentajes de las fracciones Resinas y Asfáltenos. Los resultados se exponen en la Figura 6.

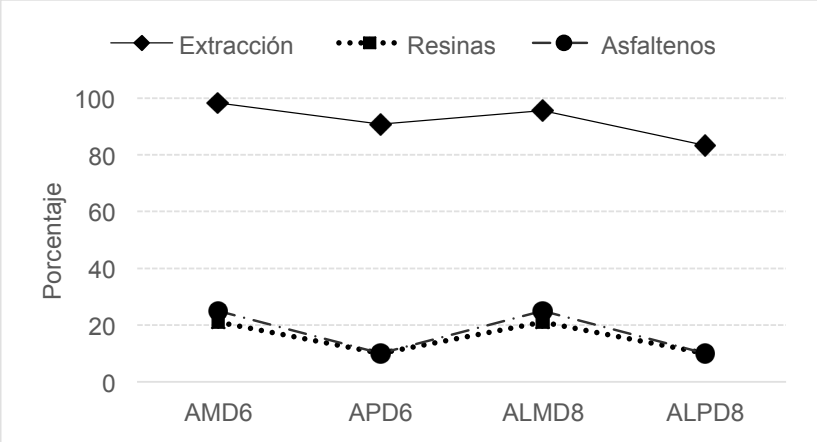


Figura 6. Relación entre la eficiencia de extracción y la selectividad del solvente**.** Fuente: Elaboración propia.

De la Figura 6, se pueden observar dos cosas a considerar, la primera es que aunque la literatura menciona que con hexano no se extraen todos los asfáltenos, esto depende más de del tipo de suelo ya que en texturas arenosas el hidrocarburo puede estar más disponibles que en las arcillo-limosa ya que si se comparan los porcentajes de extracción con los porcentajes de las fracciones SARA se puede observar que hay un porcentaje similar de los asfáltenos de crudo pesado que no son extraídos en suelo arcillo-limoso, en cambio, el suelo arenoso suma mayor porcentaje. La segunda es que también, hay que considerar para los diagnósticos de impacto ambiental hay que considerar redactar que se está cuantificando menos hidrocarburos (entre el 2-8 %) y que las concentraciones siempre serán mayores, esto también es preocupante ya que si no se toman en cuenta estas recomendaciones se podría declarar un sitio por debajo del límite normativo si se emplea hexano o bien si el suelo es de textura arcillosa.

2. Conclusiones

Los disolventes usados hexano y diclorometano son no polares pero si con diferencia en su constante dieléctrica, presentaron diversos resultados significativos; el diclorometano mostró una mejor eficiencia de extracción ya que presentó resultados favorables en la cuantificación de HTP en ambos suelos, se determinó que para el suelo arenoso solo basta con 6 h de extracción para alcanzar porcentajes mayores al 90 %, en cambio el suelo arcilloso-limoso requiere 8 h para

aumentar esta eficiencia y se recomienda realizar un estudio más detallado para este suelo contaminado con crudo pesado ya que a 8 h solo se alcanzó un 80 % de extracción, por lo que se desconoce si existe una interacción matriz-hidrocarburo ya que se puedo observar que el disolvente no puede disgregar todo el analito.

Por último, es importante mencionar que esta interacción no está del todo definida, pero es este punto el que delimita el nivel de efectividad en las extracciones de moléculas orgánicas, de estas, el carácter polar y no polar es la que define si pueden ser adsorbidos y otros absorbidos sobre la matriz del suelo, el estudio aquí presentado ayuda a entender estos mecanismos que son de suma importancia y, demuestran que se tiene que trabajar en más investigaciones que consideren las condiciones específicas de cada sitio en particular, de este modo, se podrían definir que contaminantes están disponibles y cuáles no y, con esto, definir los riesgos que representan hacia el medio ambiente y para la salud pública.

Agradecimientos

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el financiamiento de este proyecto mediante los fondos del proyecto PFI 2013 asignados al laboratorio, así como al CONACYT por la beca asignada para la manutención durante la realización de los estudios de posgrado.

3. Referencias

Adams, R. H., Álvarez-Ovando, A. L., & Castañón, N. (2015). Efecto de la concentración de hidrocarburos sobre la producción del pasto (*Brachiaria humidicola*) en Texistepec, Veracruz. Phyton (Buenos Aires), *84*(1), 222-232.

Adams, R. H., Zavala-Cruz, J., & Morales-García, F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. Interciencia, *33*(7), 483-489.

Barrientos del Monte, F., & Añorve Añorve, D. (2014). México 2013: acuerdos, reformas y descontento. Revista de ciencia política (Santiago), *34*(1), 221-247.

Castro, A., Acevedo-Berruecos, D., Urbieta, J., Iturbe, R., & Delgado-Rodríguez, O. (2013). Caracterización geoquímica y geoeléctrica de un sitio contaminado por hidrocarburos en el estado de Puebla, México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, *65*(2), 405-418.

Díaz-Ramírez, I., Escalante-Espinosa, E., Schroeder, R. A., Fócil-Monterrubio, R., & Ramírez-Saad, H. (2013). "Hydrocarbon biodegradation potential of native and exogenous microbial inocula in Mexican tropical soils. In Biodegradation of hazardous and special products", en Rolando Chamy and Francisca Rosenkran (2013), *Biodegradation of Hazardous and Special Products* (155-178). InTech. [en línea], disponible en https://www.intechopen.com/books/biodegradation-of-hazardous-and-special-products/hydrocarbon-biodegradation-potential-of-native-and-exogenous-microbial-inocula-in-mexican-tropical-s

D.O.F. Diario oficial de la Federación, D. O. (2002). "Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis: México" [en línea], disponible en http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf

D.O.F. Diario oficial de la Federación, D. O. (2012). "NOM, N. O. M. 138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación" [en línea], disponible en https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/6646/1/nom-138-semarnat.ssa1-2012.pdf

García-López, E., Zavala-Cruz, J., & Palma-López, D. J. (2006). Caracterización de las comunidades vegetales en un área afectada por derrames de hidrocarburos. Terra Latinoamericana, 24(1), 17-26.

García, M. A. H., Bautista, C. M. M., Olán, C. M., & Schoreder, R. H. A. (2016). Extracción de Hidrocarburo Pesado en Suelo Acrisol. Journal of Basic Sciences, *2*(5), 18-23.

García-Torres, R., Ríos-Leal, e., Martínez-Toledo, Á, Ramos-Morales, F. R., Cruz-Sánchez, j. s., & Cuevas-Díaz, M. D. C. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. Revista internacional de contaminación ambiental, 27(1), 31-39.

Gutiérrez, M. D. C., & Zavala, J. (2002). Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. Terra Latinoamericana, *20*(2), 101-111.

Guzmán-Osorio, F. J., & Adams, R. H. (2015). Mitigation of water repellency in the treatment of contaminated muds using the chemical–biological stabilization process. International Journal of Environmental Science and Technology, *12*(6), 2071-2078.

Lee, L. C., Liong, C. Y., & Jemain, A. A. (2017). A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, *163*, 64-75.

Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M. C., Izquierdo-Reyes, F., & Palma-López, D. J. (2010). Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. Universidad y ciencia, *26*(2), 121-136.

Marín-García, D. C., Adams, R. H., & Hernández-Barajas, R. (2016). Effect of crude petroleum on water repellency in a clayey alluvial soil. International journal of environmental science and technology, *13*(1), 55-64.

Martínez-Chávez, C. G., Morales-Bautista, C. M., & Alor-Chávez, M. D. J. (2017). Extracción de hidrocarburo pesado en suelo arenoso. Avances en Ciencias e Ingeniería, *8*(1), 8-16.

Merchand, M. A. (2015). Estado y reforma energética en México. Problemas del desarrollo, *46*(183), 117-139.

Melendez, L. V., Lache, A., Orrego-Ruiz, J. A., Pachon, Z., & Mejía-Ospino, E. (2012). Prediction of the SARA analysis of Colombian crude oils using ATR–FTIR spectroscopy and chemometric methods. Journal of Petroleum Science and Engineering, *90*, 56-60.

Morales-Bautista, C. M., Adams, R. H., & Guzmán-Osorio, F. D. Marín-García (2013). Dilution-extrapolation hydrometer method for easy determination of API gravity of heavily weathered hydrocarbons in petroleum contaminated soil. Energy and Environmental Research, *3*, 115-124.

Morales-Bautista, C. M., Adams, R. H., Hernández-Barajas, J. R., Lobato-García, C. E., & Torres-Torres, J. G. (2016). Characterization of fresh and weathered petroleum for potential impacts to soil fertility. International journal of environmental science and technology, *13*(11), 2689-2696.

Morales-Bautista, C., Méndez-Olán, C., Hernández-Jiménez, G., & Adams-Schroeder, R. (2018). Normalization of calibration curves and their application in the determination of total oil hydrocarbons (HTP). Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia, *41*(3), 116-124.

Ocampo, R., Rios, L. A., Betancur, L. A., & Ocampo, D. M. (2008). *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*. Universidad de Caldas.

Ojeda-Morales, M. E., Hernández-Rivera, M. Á., Martínez-Vázquez, J. G., Díaz-Flores, L. L., & Rivera-Cruz, M. D. C. (2012). Tres dosis inoculantes con *Proteus* sp en la biodegradación de petróleo crudo. Revista internacional de contaminación ambiental, *28*(4), 323-332.

Ortiz-Salinas, R., Cram, S., & Sommer, I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México. Universidad y ciencia, *28*(2), 131-144.

Palma-López, D. J., Cisneros, D. J., Moreno, C. E., & Rincón-Ramírez, J. A. (2007). Suelos de Tabasco: su uso y manejo sustentable. *Colegio de Postgraduados-ISPROTAB-FUPROTAB. Villahermosa, Tabasco, México*, *195*.

Palma-Cruz, F. D. J., Pérez-Vargas, J., Casado, N. A. R., Guzmán, O. G., & Calva-Calva, G. (2016). Phytoremediation potential and ecological and phenological changes of native pioneer plants from weathered oil spill-impacted sites at tropical wetlands. Environmental Science and Pollution Research, *23*(16), 16359-16371.

Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Schroeder, R. A., Rivera-Cruz, M. C., & Geissen, V. (2013). Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. Water, Air, & Soil Pollution, *224*(8), 1637.

Pindado, O., Pérez, R. M., & García, S. (2014). *Análisis del TPH y las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en matrices de interés medioambiental*. Editorial CIEMAT.

Pons-Jiménez, M., Guerrero-Peña, A., Zavala-Cruz, J., & Alarcón, A. (2011). Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. Universidad y ciencia, *27*(1), 1-15.

Riveroll-Larios, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., & Díaz-Ramírez, I. J. (2015). Biological activity assessment in Mexican tropical soils with different hydrocarbon contamination histories. Water, Air, & Soil Pollution, *226*(10), 353.

Soto, L. A., Botello, A. V., Licea-Durán, S., Lizárraga-Partida, M. L., & Yáñez-Arancibia, A. (2014). The environmental legacy of the Ixtoc-I oil spill in Campeche Sound, southwestern Gulf of Mexico. Frontiers in Marine Science, *1*, 57.

Urpí, J. L. (2012). *Tecnología y margen de refino del petróleo*. Ediciones Díaz de Santos.

Vázquez-Luna, D. (2014). "Chronic toxicity of weathered oil-contaminated soil.", en Dinora Vázaquez-Luna (2014), *In Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* (87-100) InTech. [en línea], disponible en https://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/chronic-toxicity-of-weathered-oil-contaminated-soil

Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. Bioagro, *24*(1), 5-12.

Zavala-Cruz, J., Gavi-Reyes, F., Adams-Schroeder, R. H., Ferrera-Cerrato, R., Palma-López, D. J., Vaquera-Huerta, H., & Domínguez-Ezquivel, J. M. (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. Terra latinoamericana, *23*(3), 293-302.

Capítulo 17

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD LISOSOMAL Y NADO CONTRACORRIENTE EN *MACROBRACHIUM SP*. EXPUESTOS A SEDIMENTOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BIODIÉSEL

Alma Diana Arellano Mondragón[1]

Patricia Ramírez Romero [2]

Guadalupe Barrera Escorcia[2]

Xenia Mena Espino[3]

[1] Universidad Autónoma Metropolitana

[2] Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

[3] Departamento de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

* alma.arellano07@mail.com

Resumen

El biodiésel se ha considerado un combustible limpio por ser de origen animal o vegetal, sin embargo, su amplio uso implica la necesidad de entender el impacto que podría causar a organismos de importancia ecológica en el Golfo de México. El objetivo fue conocer el efecto provocado por la exposición a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en juveniles de *Macrobrachium sp.*, utilizando biomarcadores de efecto a nivel celular y fisiológico. Los crustáceos y el sedimento fueron colectados en el estero del Rio Tecolutla, Veracruz. Al sedimento se le adicionaron diferentes concentraciones de biodiésel (B 12.5%, B 25% y B 50%) y diésel (D 3%, D 6.25%, D 25% y D 50%). Se realizaron bioensayos subcrónico de 21 días evaluando la estabilidad de la membrana lisosomal y el nado contra corriente los días 7, 14 y 21 de exposición En el primer biomarcador se observó un Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) de 180 min en los organismos control y una disminución en B 50% y D 25% a 45 min el día 21 de exposición. En el segundo biomarcador, la resistencia en nado contracorriente de los organismos control fue de 29 min; mientras que al día 14 los expuestos a B 50% y D 25% mostraron un promedio de 3 min. Se concluye que ambos combustibles provocan un efecto tóxico, pero se necesita el doble de la cantidad de biodiésel para que el efecto sea similar al del diésel. El mayor tiempo de exposición incrementa el daño.

Palabras Clave: Biodiésel, Diésel, Estabilidad lisosomal, Nado contra corriente, crustáceos.

1. Desarrollo

El uso de energía es básico para mejorar los niveles de bienestar de la sociedad, por esto es fundamental conocer el contexto energético mundial, en especial el petróleo y los combustibles fósiles debido a que es la principal fuente energética a corto, mediano y largo plazo. A escala mundial, los hidrocarburos aportan más de la mitad de la energía primaria consumida y específicamente el 31% del consumo energético primario global proviene del petróleo, convirtiéndose así en la fuente energética primaria con más demanda (REPSOL, 2015).

Ante ésta situación desde la década de los 90´s las autoridades se han pronunciado a favor del fomento de las energías alternativas como medio de incrementar la seguridad del abastecimiento energético y reducir el impacto sobre el ambiente (Retana, 2008). Las energías alternas constituyen una alternativa importante para la demanda actual energética a nivel nacional y mundial. Existen diferentes propuestas que abarcan: la energía hidroeléctrica, la nuclear, la biomasa, la eólica, la geotérmica, la solar y en caso de combustibles líquidos, los biocombustibles (González *et al.,* 2008).

La producción de biocombustibles ha generado interés en varios países debido a la disminución de las reservas de combustibles fósiles, la volatilidad de los precios del petróleo, los problemas del cambio climático y la contaminación del aire, así como una creciente demanda de combustibles en el sector del transporte (Lozada *et al.,* 2010), específicamente en éste último punto, el biodiésel es una de las fuentes sostenibles de energía para atender dicha demanda (Bhuiya *et al.,* 2015).

El biodiésel es un combustible líquido derivado de aceites o grasas de origen vegetal o animal, se produce gracias a una reacción química denominada transesterificación, lo que significa que los gliceroles contenidos en los aceites son combinados con alcohol ante la presencia de un catalizador, dando como resultado la generación de moléculas compuestas por un ácido graso de cadena larga y un alcohol (Castro *et al.,* 2007). Las propiedades del biodiésel comercial dependen tanto del proceso de fabricación, como de la naturaleza de los lípidos a partir de los cuales se ha producido (Ciria, 2007).

Debido a su origen y sus características fisicoquímicas, este producto es considerando un combustible seguro que genera menos emisiones de productos de combustión nocivos, comparado con los combustibles de origen fósil y se piensa que es de fácil degradación (Khan *et al.,* 2012).

El deterioro ambiental ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de energía para evitar la gran dependencia del petróleo. Esto ha llevado al desarrollo de una gran variedad de combustibles, los cuales también pueden ser contaminantes y tener como destino final el ambiente, lo que aumenta el riesgo de

exposición en diversos ecosistemas. Uno de ellos es el ambiente acuático, donde se llevan a cabo actividades humanas relacionadas con la explotación y el transporte de combustibles por lo que éstos tienen gran participación en la contaminación de sedimentos por lo que entran en contacto con los organismos acuáticos. Los contaminantes presentes en el sedimento pueden afectar a dichos animales acuáticos al ingerir estos la materia orgánica o el detrito presente en ellos mientras buscan alimento. Entre los animales acuáticos con más riesgo de exposición están los crustáceos, los cuales por su importante aportación nutrimental son organismos consumidos por el hombre, poniendo en riesgo la salud humana al ser ingeridos.

En el aspecto biológico, los crustáceos son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos; por su abundancia y diversidad dan estructura a las comunidades de macroinvertebrados que habitan en ellos; por la composición que ocupan en las cadenas tróficas, como consumidores secundarios, se encargan de la transformación de la materia orgánica en energía y proteínas consumibles por los eslabones finales (García *et al.*, 2012).

Las especies de crustáceos que resaltan por su susceptibilidad al cultivo y valor comercial son los camarones y los langostinos. Los langostinos de la familia *Palemonidae* son los más diversos dentro del orden *Decapoda*, estos tienen una amplia distribución geográfica y están representados por numerosas especies en los sistemas marinos, estuarinos y dulceacuícolas. En la subfamilia *Palaemoninae* se incluye al género *Macrobrachium* (Bate, 1868), el cual constituye uno de los géneros más diversos, abundantes y ampliamente distribuidos (Hernández, 2008).

La importancia de los crustáceos en la zona costera, así como la posibilidad de que se presenten fugas de combustible derivado del manejo de lanchas implica que el contacto de estos organismos con combustibles sea frecuente. Se ha demostrado el daño en crustáceos producido por contacto con diésel en agua (Tedengren *et al.*, 1988; Neff *et al.*, 2000), sin embargo, el daño asociado a la presencia de estos combustibles en el sedimento no se ha evaluado lo suficiente. Este tipo de trabajos es todavía más escaso en relación al biodiésel ya que sólo se ha evaluado el efecto de la fracción soluble (Leme *et al.*, 2011).

La evaluación del daño ecotoxicológico es indispensable para tener un mejor control de la calidad ambiental y para proteger a los ecosistemas acuáticos, en los que habitan especies de interés ecológico y comercial, las cuales se pescan y cultivan. Tal es caso de los crustáceos, los cuales, en caso de desarrollarse en ambientes sanos pueden garantizar a su vez la protección humana (Ramírez *et al.*, 2012). Para determinar si estos organismos se encuentran en condiciones adecuadas se hace uso de biomacadores.

Biomarcadores

Diversas respuestas biológicas dan cuenta de la magnitud del daño de los contaminantes sobre la biota, tal es el caso de los biomarcadores de efecto, que son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes. Los biomarcadores son útiles para generar datos cuantitativos asociados a la exposición a xenobióticos, que permiten deducir los efectos derivados de la exposición a sustancias químicas sobre los sistemas biológicos, que permiten evaluar la susceptibilidad del ecosistema cuando existe la presencia de tóxicos (Espina y Vanegas, 2005; Barrera, 2006).

Estabilidad lisosomal

Las interacciones de sustancias químicas antropogénicas con la biota se producen inicialmente a nivel celular, por lo tanto, las respuestas celulares se pueden utilizar como herramientas adecuadas para la detección temprana y sensible de la exposición a sustancias químicas (Cavalcante *et al.,* 2014). Tal es el caso de la estabilidad lisosomal; la cual es un parámetro que permite monitorear el impacto aditivo de los contaminantes ambientales sobre las funciones celulares (Zapata *et al.,* 2012).

Los lisosomas son organelos dinámicos y polimórficos que degradan macromoléculas, además juegan un papel importante en la desintoxicación y la defensa en los organismos marinos. El mantenimiento de las funciones celulares es consecuencia, entre otras cosas, de la estabilidad de estos organelos. Cuando existe una alteración en ellos, la estabilidad de la célula está comprometida porque puede degradarse (Leme *et al.*, 2011). La determinación de la condición de la estabilidad lisosomal depende de la capacidad para retener colorantes dentro del lisosoma. Los lisosomas dañados tienden a liberarlos hacia el citosol lo que se interpreta como un mayor daño celular (Svendsen *et al.,* 2004).

Los daños a nivel celular se reflejan eventualmente en las funciones de los organismos en otros niveles de organización, que involucran aspectos fisiológicos y en otra escala, aspectos conductuales los cuales están interconectados (Espina y Vanegas. 2005).

Nado contra corriente

Un biomarcador de efecto que indica daños a nivel fisiológico y que evalúa el estado de salud de los langostinos es la resistencia natatoria. La velocidad natatoria se ha utilizado como un parámetro de comportamiento en los organismos acuáticos expuestos a contaminantes (Silva *et al.* 2013). Morales y Meruane (2012), utilizaron como biomarcador el comportamiento natatorio de las larvas de *Cryphiops*

caementarius para la evaluación de la condición larvaria de la especie en cultivo. En condiciones normales, en los días previos a la metamorfosis se manifestó cierta lentitud en el nado de organismos en estado larval. Los ejemplares se ubicaron en la zona profunda del estanque de prueba, donde fueron estimulados a nadar principalmente por el impulso de la aeración. Esta conducta se asocia a la capacidad de escape frente a un estímulo de contacto con otras larvas.

De esta manera se plantea en este estudio evaluar el efecto tóxico de sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en juveniles de *Macrobrachium sp.* a través de la estabilidad lisosomal y el nado contra corriente.

2. Metodología

Colecta de organismos y sedimentos

Los crustáceos fueron capturados en el estero del Río Tecolutla, Veracruz, en las coordenadas N 20° 28´ 06.7" y W 97° 00´28.9". El punto de muestreo para la colecta de los organismos fue el sitio conocido como "El Tular". Se utilizó una red de cuchara, la cual se sumergió a la altura de las raíces del lirio acuático que habita en el río. Los organismos extraídos se seleccionaron al azar obteniendo juveniles de tallas entre 1.8 y 3.5 cm. Estos fueron depositados en cubetas de plástico con agua del sitio y se cubrieron con una malla para evitar que saltaran fuera del recipiente. Se colocó aireación continua durante su traslado al laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Asimismo, en la zona de muestreo se registraron los parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad y pH) utilizando un medidor multiparamétrico portátil (ProDSS) en agua y se midió la profundidad del sitio donde se realizó la recolecta de sedimentos. Estos se colectaron en bolsas de polietileno y se colocaron en hielera a 4°C para su traslado. En el laboratorio fueron congelados a -20°C hasta su procesamiento.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos del sitio de muestreo. De elaboración propia

	Temperatura (°C)	**Salinidad (ppm)**	**pH**	**Profundidad (m)**
Colecta 1	25.1	1	7.9	1.45
Colecta 2	25.6	1	7.8	1.10

Mantenimiento de los organismos en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, los crustáceos se colocaron en tres peceras de 40 L de capacidad con 50% de agua potable a una parte por mil de salinidad y 50% agua del sitio de colecta. Cada pecera contó con dos filtros de cascada, un refugio artificial, aireación continúa y una temperatura de 24±1°C. Los especímenes se mantuvieron con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 oscuridad; se alimentaron diariamente con pellet para langostino, en cantidades que variaron entre 3–17% de la biomasa del tanque (FAO, 1998). Diariamente se sifoneó cada pecera y se registraron los parámetros: temperatura, pH, oxígeno disuelto (OD) y salinidad utilizando un medidor multiparamétrico portátil (ProDSS). La aclimatación de los crustáceos tuvo una duración de al menos un mes con el fin de descartar interferencias en los resultados provocados por estrés o daños previos antes de su colecta en el punto de muestreo.

Preparación del sedimento

Al sedimento colectado se le retiraron los primeros dos centímetros de superficie utilizando una espátula metálica, con el fin de retirar el sedimento que estuvo en contacto con la bolsa de plástico y así evitar posibles interferencias con los componentes de éste material; el sedimento restante se colocó en recipientes de acero inoxidable para secarlo en un horno de convección (BINDER ED 23) a 60°C durante 48 h. Una vez que el sedimento se secó, fue triturado utilizando un molino manual para granos (Estrella, MM-E) con el fin de triturar las piezas de mayor tamaño. Posteriormente se utilizó un mortero de porcelana con el fin de obtener el tamaño de la partícula deseada, finalmente el sedimento fue tamizado (< 250µm) dos veces hasta tener una matriz homogénea y libre de macrofauna. Los sedimentos obtenidos mediante éste procedimiento se utilizaron como sedimento control.

Método de contaminación de sedimentos

Se utilizaron dos kilogramos de sedimentos previamente tratados como se menciona en el párrafo anterior, a los cuales se les agregó 600 mL de diésel comercial para preparar la concentración al 100% (Greg *et al.*, 1997). Se realizó la misma mezcla para biodiésel el cual fue obtenido gracias a una donación de SOLBEN®. Esta mezcla se colocó en cuatro frascos ámbar de un litro en un agitador rotatorio para pruebas analíticas (Associated Design & Manufacturing Co. Modelo 3740-8-BRE) durante 10 días. Posteriormente se dejó sedimentar la mezcla por 24 h para retirar el exceso de agua. Después, se agregaron 250 mL de agua para experimentación con una parte por mil de salinidad a los cuatro frascos para volver a rotar durante 24 h. Luego se les dejó sedimentar por 12 h y se retiró el exceso de agua; este procedimiento se repitió por triplicado. Con el fin de garantizar el adecuado enjuague del sedimento, éste se centrifugó durante tres min a 3000 revoluciones por minuto (rpm) en dos etapas utilizando 4 frascos de teflón de 250 mL.

Para preparar las diferentes concentraciones de diésel y biodiésel (3%, 6.25%, 12.5%, 25% y 50%) se tomó la mezcla de cada contaminante al 100% y se le añadió sedimento control en las cantidades indicadas por la Tabla 2, obteniendo así una mezcla total por cada concentración de 500 g. Posteriormente se colocó cada tratamiento en un frasco ámbar de 1 L agregando 200 mL de agua para experimentación, después fueron rotados durante 12 h con el fin de garantizar una mezcla homogénea.

Tabla 2. Proporciones para preparar las diferentes concentraciones de sedimentos contaminados. De elaboración propia.

	Control	**B 12.5 %**	**B 25%**	**B 50%**	**D 3%**	**D 6.25%**	**D 25%**	**D 50%**
Sedimento control	500 g	437.50 g	375 g	250 g	485 g	468.75 g	375 g	250 g
Sedimento con biodiésel al 100%	NA	62.50 g	125 g	250 g	NA	NA	NA	NA
Sedimento con diésel al 100%	NA	NA	NA	NA	15 g	31.25 g	125 g	250 g
Sedimento total	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g	500 g

B, biodiesel; D, diésel; NA, No Aplica para la mezcla..

El sedimento de cada frasco correspondió a una concentración y fue colocado cuidadosamente en su respectiva pecera. Cada frasco se enjuagó con cinco litros de agua para experimentación con el fin de retirar todo el sedimento que se pudiera quedar en las paredes del envase. La mezcla se dejó decantar durante 24 h y se procedió a llenar las peceras con agua para experimentación utilizando una manguera delgada adherida al vidrio de la pecera para evitar que el sedimento decantado volviera a agitarse de manera excesiva. Una vez llenas las peceras se dejaron reposar por 24 h para proceder a colocar 60 organismos al azar en cada uno de los recipientes.

Bioensayo

Se llevaron a cabo dos bioensayos, cada uno con una semana de diferencia. En el primer experimento se expusieron los organismos a las concentraciones de biodiésel en las siguientes proporciones: 12.5%, 25% y 50% más un control libre de contaminantes. Estas concentraciones fueron planteadas con base en los resultados obtenidos de un bioensayo preliminar en el cual la sobrevivencia de biodiesel fue

de 100%. En el segundo bioensayo, las concentraciones de diésel fueron un poco más bajas (3%, 6.25%, 12.5% y 25%) debido a la alta mortalidad que se presentó en el bioensayo preliminar. Cada pecera contó con un termostato y dos aireadores para mantener la concentración de oxígeno disuelto dentro del óptimo y la temperatura controlada. Todas las peceras fueron cubiertas con una cortina negra con el fin de no estresar a los organismos y controlar el fotoperiodo. Los crustáceos se seleccionaron al azar para su colocación en las peceras y se alimentaron diariamente con pellet de langostino en cantidades que fueron de 3% a 17% de la biomasa del tanque (FAO, 1998).

Las características fisicoquímicas del agua de cada una de las peceras: temperatura, oxígeno disuelto (O.D.), salinidad y pH fueron medidas diariamente utilizando el medidor multiparamétrico portátil (ProDSS).

Cada bioensayo tuvo una duración de 21 días y se midieron los biomarcadores de estabilidad lisosomal y resistencia al nado contra corriente los días 0, 7, 14 y 21; Se recomienda utilizar cuatro organismos de tallas superiores a los 3.5 cm para asegurar el volumen requerido de hemolinfa en la determinación de la estabilidad lisosomal. Se realizaron dos replicas por concentración.

Para la prueba de nado contra corriente se emplearon cuatro replicas. En la siguiente tabla se presentan las principales características para la realización de la prueba.

Tabla 3. Características generales y fisicoquímicas del bioensayo. De elaboración propia.

Tipo de bioensayo	Subcrónico
Tiempo de exposición	21 días
Días de evaluación	0,7, 14 y 21
Biomarcadores	Estabilidad lisosomal y nado contra corriente
Temperatura del agua	24 ± 1 °C
pH	8.79
Fotoperiodo	12 h. luz, 12 h. obscuridad
Aireación	Continua
Salinidad	1‰
Oxígeno disuelto	4 a 5 mg O_2/L
Tamaño de la pecera	40 L

Edad de los organismos	Juveniles
Gramos de sedimento por pecera	500g
N° de organismos por pecera	60
Concentraciones en sedimento	Control. Biodiésel: B 12.5%, B 25%, B 50% Diésel: D 3%, D 6.25%, D 25%, D 50%

Medición de estabilidad lisosomal

Para evaluar el efecto de la exposición a contaminantes sobre los lisosomas se empleó la técnica Retención de Rojo Neutro (RRN), descrita por Lowe *et al.* (1995). Para lo cual se extrajo la hemolinfa de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal utilizando una jeringa para insulina de un mililitro de capacidad previamente cargada con 100 µL de solución fisiológica salina. Se extrajeron 100 µL de hemolinfa de los organismos (entre cuatro y ocho ejemplares, dependiendo de su tamaño), el líquido se colocó en un tubo Eppendorf para posteriormente homogenizar la muestra en un equipo vórtex. En un portaobjetos se agregaron 40 µL de PolyLisina a los cuales se les adicionó 75 µL de la solución de hemolinfa y finalmente se le añadió 40 µL de colorante Rojo Neutro. Este proceso se llevó a cabo en dos laminillas por concentración. Se colocó un cubreobjetos y se observaron las laminillas a través de un microscopio óptico marca Leica modelo DM100, con el objetivo 40X, a una temperatura de 22°C y con baja intensidad de luz. Se determinaron los respectivos Tiempos de Retención de Rojo Neutro (TRRN). Se registró fotográficamente cada tratamiento y su réplica. Las observaciones se hicieron a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 min. La observación al inicio se consideró como la acumulación máxima de Rojo Neutro en los lisosomas y se terminó la prueba cuando se perdió el 50% de la tinción.

Resistencia al nado contra corriente

Para realizar la evaluación del estado físico de los crustáceos, estos se colocaron de manera individual en un dispositivo de forma rectangular, el cual contenía un volumen de 30 L de agua. Este contó con una bomba conectada a una manguera con el fin de recircular el agua y una barrera con orificios para mantener una presión de salida constante, con lo que se simuló la corriente en la que nadaron los organismos. Se encendió el motor para que corriera el agua sobre el dispositivo, posteriormente se colocó el organismo en un extremo del canal y se comenzó a tomar el tiempo durante el cual el organismo enfrentaba la corriente simulada. El conteo finalizó cuando el ejemplar dejó de nadar y fue arrastrado al otro extremo del dispositivo (Morales y Meruane, 2012). Este proceso se repitió en cuatro organismos por cada una de las concentraciones planteadas para este bioensayo en

los días 0, 7, 14 y 21. Sin embargo, al día 21 de la prueba, en la concentración D 50% no se realizó dicha evaluación debido a la alta mortalidad.

Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó a través del software STATISTICA 7. Se realizó un análisis de varianza para los controles de ambos contaminantes con el objeto de determinar si estos mostraban diferencias o podrían analizarse en conjunto.

Para determinar si los datos de estabilidad lisosomal y nado contra corriente presentaban un comportamiento normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En caso de existir normalidad se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre la respuesta de los organismos expuestos y los controles. Posteriormente se realizó la prueba de Fisher para determinar entre que contaminantes y que concentraciones se presentaban dichas diferencias.

3. Resultados

Estabilidad lisosomal

El TRRN permitió observar patrones de respuesta claros. Los controles de ambas pruebas tuvieron un comportamiento similar por lo que los datos de ambos bioensayos se unieron.

La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas ($p < 0.01$) en el tiempo de retención de los diferentes tratamientos.

En la Fig. 1 se observa la formación de tres grupos al día 7 de exposición. El grupo "a" con el mayor TRRN (120 min) conformado por el control y las concentraciones de B 12.5%, D 3% y D 6.25%, dichas concentraciones presentaron diferencias significativas entre el grupo "b" y "c". El grupo "b" formado por los organismos expuestos a las concentraciones B 25%, B 50% y D 12.5% (90 min) mostró diferencias significativas con respecto al grupo "a" y "c" y el grupo "c" con la concentración D 25% (60 min) se observó una disminución de la mitad de TRRN en comparación con el grupo "a" y manifestó diferencias significativas con respecto al grupo "a" y "b". En este día no se presentaron DE ya que tanto en la concentración como en su réplica el tiempo de pérdida de tinción fue el mismo.

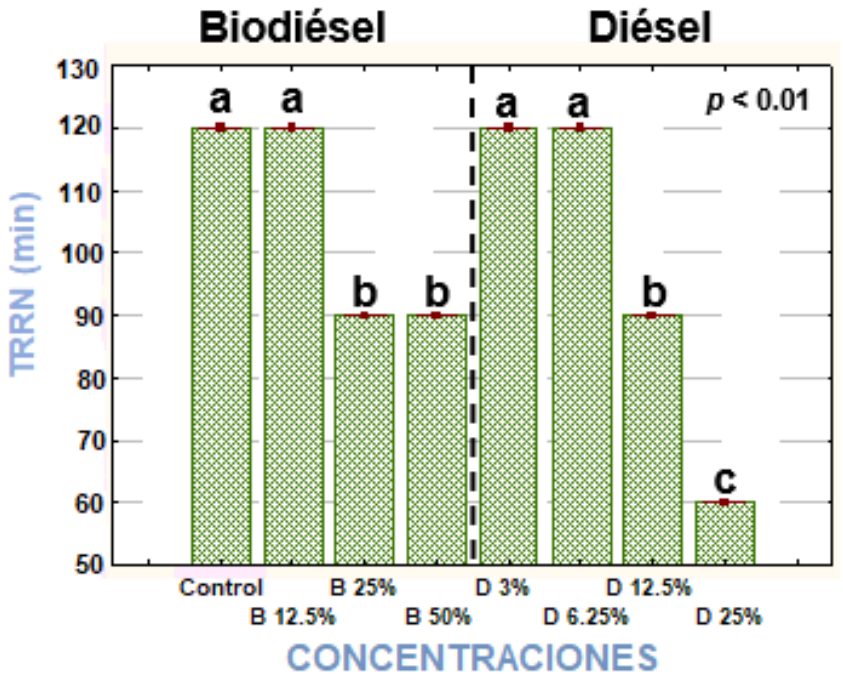


Figura 1. Tiempos de Retención promedio de organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 7. Grupo "a" diferencias significativas respecto a "b" y "c". Grupo "b" diferencias significativas respecto a "a" y "c". Grupo "c" diferencias significativas respecto a "a" y "b". De elaboración propia.

En el día 14 los resultados conformaron cuatro grupos ($p < 0.01$). El grupo "a" tuvo un TRRN promedio de 120 min el cual estuvo integrado por las concentraciones D 3%, D 6.25% y el control, los cuales mostraron diferencias significativas con los grupos "c" y "d". El grupo "b", lo conformó solamente la concentración D 12.5% con un promedio de 105 min ± 21.21 el cual demostró diferencias significativas con el grupo "d". El grupo "c", comprendió la concentración de B 12.5% obteniendo un promedio de 90 min en donde se observan diferencias significativas con respecto al grupo "d" y "a".

Finalmente el grupo "d" tuvo un TRRN promedio de 57.50 min ± 10.60 en las concentraciones de B 25%, B 50% y D 25% expresando diferencias significativas con respecto a los grupos "a", "b" y "c" (Fig. 2).

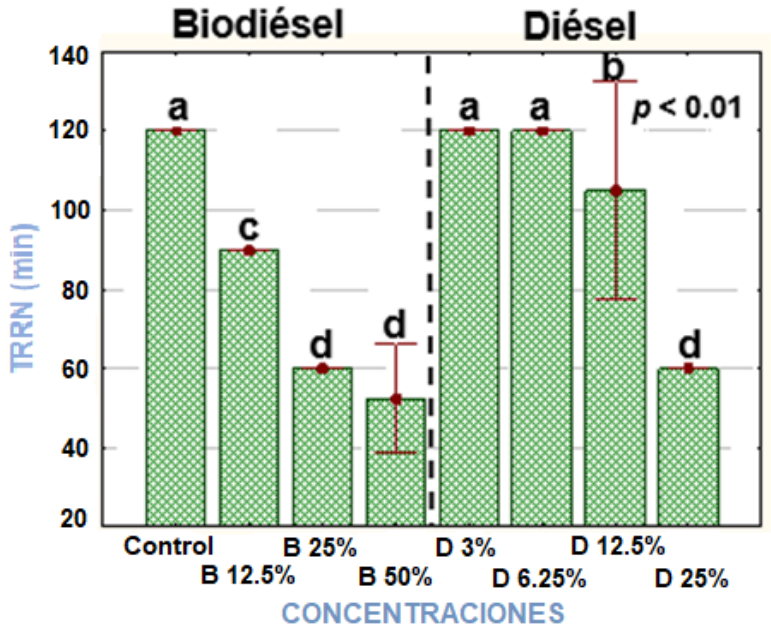


Figura 2. Tiempos de Retención promedios ± Intervalos de Confianza en organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 14. Grupo "a" diferencias significativas respecto a "c" y "d". Grupo "b" diferencias significativas respecto a "d". Grupo "c" diferencias significativas respecto a "a" y "d". Grupo "d" diferencias significativas respecto a "a", "b" y "c". De elaboración propia.

En la Fig. 3 se muestra el TRRN el día 21. En esta ocasión se formaron 4 grupos ($p < 0.01$). El grupo "a" estuvo conformado por el control y la concentración más baja de diésel (D 3%), con un promedio de 120 min indicando diferencias significativas con respecto a los grupos "b", "c" y "d" El grupo "b" estuvo conformado por las concentraciones: B 12.5%, D 6.25% y D 12.5%, con un promedio de 90 min, mostrando diferencias significativas con respecto a los grupos "a", "c" y "d". El grupo "c" formado únicamente por la concentración de B 25% (promedio de 60 min) expresando diferencias significativas con respecto a los grupos "a", "b" y "d"; y por último el grupo "d", con el TRRN más bajo durante todo el bioensayo que fue en promedio de 45 min, el cual incluyó a los organismos expuestos a las concentraciones más altas de ambos contaminantes (B 50% y D 25%) presentando diferencias significativas con respecto a los grupos "a", "b" y "c". Similar a lo sucedido en el día 7, en este día de evaluación no se presentaron DE ya que tanto en la concentración como en su réplica el tiempo de pérdida de tinción fue el mismo.

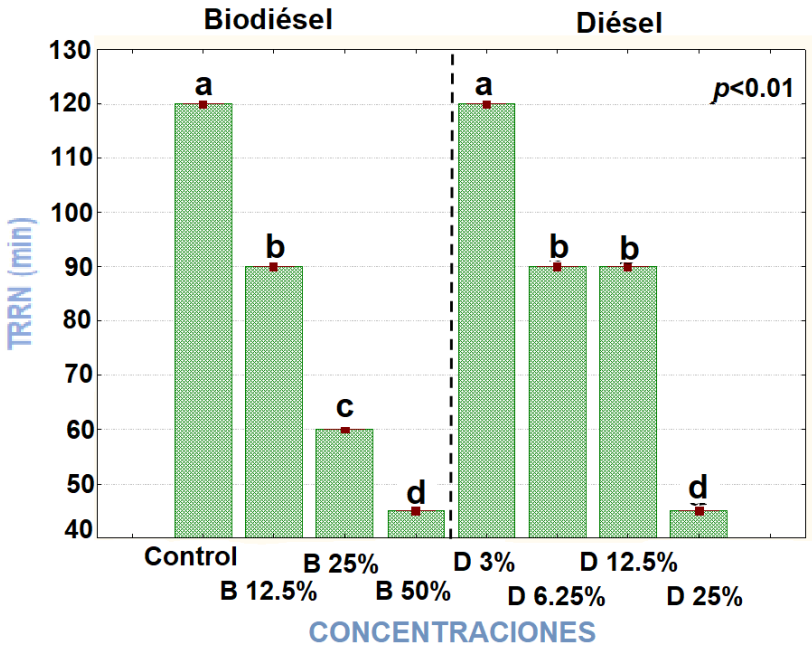


Figura 3. Tiempos de Retención promedio de organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 21. Grupo "a" diferencias significativas respecto a "b", "c" y "d". Grupo "b" diferencias significativas respecto "a", "c" y "d". Grupo "c" diferencias significativas respecto "a", "b" y "d". Grupo "d" diferencias significativas respecto "a", "b" y "c". De elaboración propia.

Nado contra corriente

Con el fin de conocer el estado locomotor inicial de los crustáceos, después de la etapa de mantenimiento y antes de los bioensayos, se tomaron cuatro organismos al azar para evaluar la resistencia natatoria. Se determinó un registro inicial promedio de 30.50 ± 4.20 min.

En la Fig. 4 se representa la resistencia de los organismos en el nado contra corriente al día 7. En este día se observó la formación de tres grupos que representaron las diferencias entre los tratamientos y el control ($p < 0.01$). El promedio más alto fue del grupo "a" cuyo tiempo promedio de nado en el control fue de 24.25 ± 7.72 min. En el mismo grupo, además del control, se incluyeron los organismos expuestos a las concentraciones B 12.5% y D 3%, estos presentaron diferencias significativas con respecto a los grupos "b" y "c". El grupo "b" quedó integrado por los crustáceos de las concentraciones B 25%, B 50%, D 6.25% y D 12.5%, en el cual sobresalieron diferencias significativas con a los grupos "a" y "c". Y el grupo "c" estuvo conformado por los organismos de la concentración más alta

de diésel (D 25%) con un tiempo de resistencia de 9.00 ± 2.94 min, el cual mostró diferencias significativas con respecto a los grupos "a" y "b".

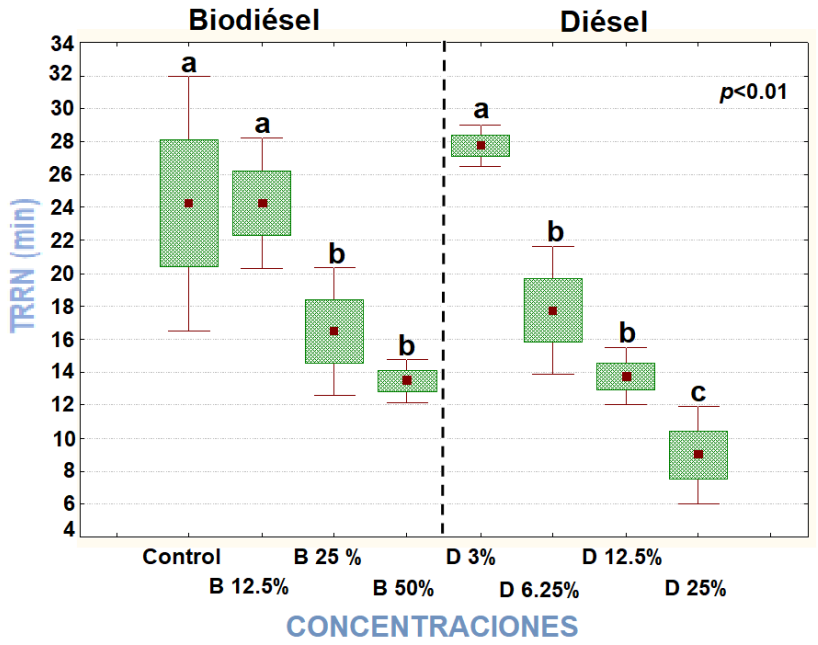


Figura 4. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 7 (promedios ± DE). Grupo "a" diferencias significativas respecto a "b" y "c". Grupo "b" diferencias significativas respecto a "a" y "c". Grupo "c" diferencias significativas respecto a "a" y "b". De elaboración propia.

La Fig. 5 corresponde a la evaluación del día 14 en la cual se observó de igual manera la formación de tres grupos con diferencias significativas entre sí ($p < 0.01$). El grupo "a" lo integró el control con un tiempo de nado contra corriente de 36.25 ± 3.30 min donde fue evidente la presencia de diferencias significativas respecto al resto de los grupos. El grupo "b" lo formaron los animales de las concentraciones B 12.5% y D 3% con promedios de 21.50 ± 5.07 y 17.50 ± 2.38 min respectivamente, exponiendo diferencias significativas con respecto a los grupos "a" y "c". Y finalmente el grupo "c" se conformó por los organismos de las concentraciones: B 25%, B 50%, D 6.25%, D 12.5% y D 25%. Las concentraciones más altas de ambos contaminantes tuvieron un tiempo de resistencia únicamente de 3.25 min, presentando el menor tiempo de resistencia de nado contra corriente en este día de medición. Dicho grupo presentó diferencias significativas con respecto a los grupos "a" y "b".

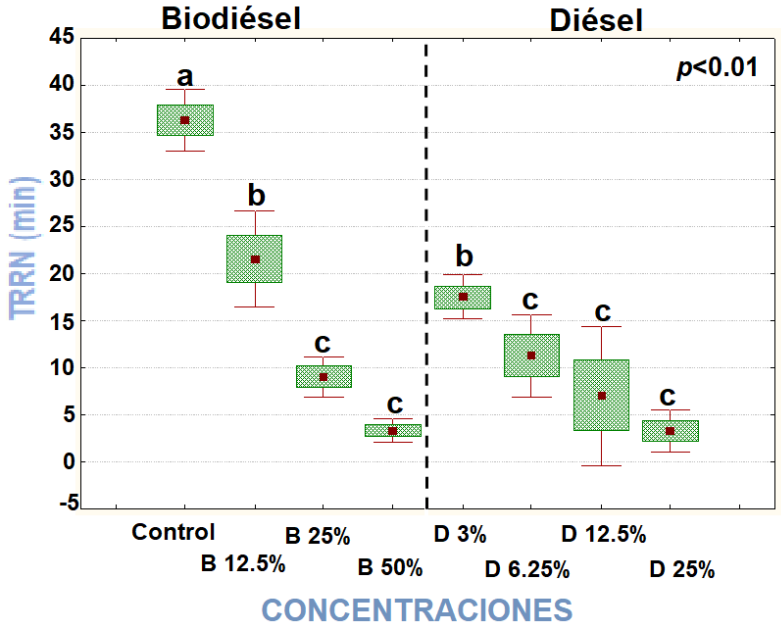


Figura 5. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 14 (promedio ± DE). Grupo "a" diferencias significativas respecto a "b" y "c". Grupo "b" diferencias significativas respecto a "a" y "c". Grupo "c" diferencias significativas respecto "a" y "b". De elaboración propia.

Al día 21 se mantuvo la formación de los 3 grupos (Fig. 6) ($p < 0.01$). El grupo "a" fue conformado por los organismos del control con una resistencia de 28.75 ± 3.86 min manifestando diferencias significativas con respecto a "b" y "c". Los ejemplares de la concentración B 12.5% conformaron el grupo "b" (21.00 ± 1.83 min), este mostró diferencias significativas con respecto al grupo "a" y al "c". Por último, los crustáceos del grupo "c" tuvo un tiempo de resistencia al nado contra corriente de 10.25 ± 2.22 min en D 3%. En este grupo también incluyeron las concentraciones: B 25%, B 50%, D 6.25%, y D 12.5% que tuvieron diferencias significativas con los grupos "a" y "b". Cabe mencionar que los organismos de la concentración más alta de diésel (D 25%) presentaron una mortalidad del 90% de manera que no fue posible llevar a cabo la última medición de éste biomarcador, ya que no se contaba con el número de organismos necesarios para cubrir las réplicas que se contemplaron en el diseño experimental, motivo por el cual no se presentan estos datos para ser analizados estadísticamente. Los organismos sobrevivientes fueron utilizados para evaluar estabilidad lisosomal.

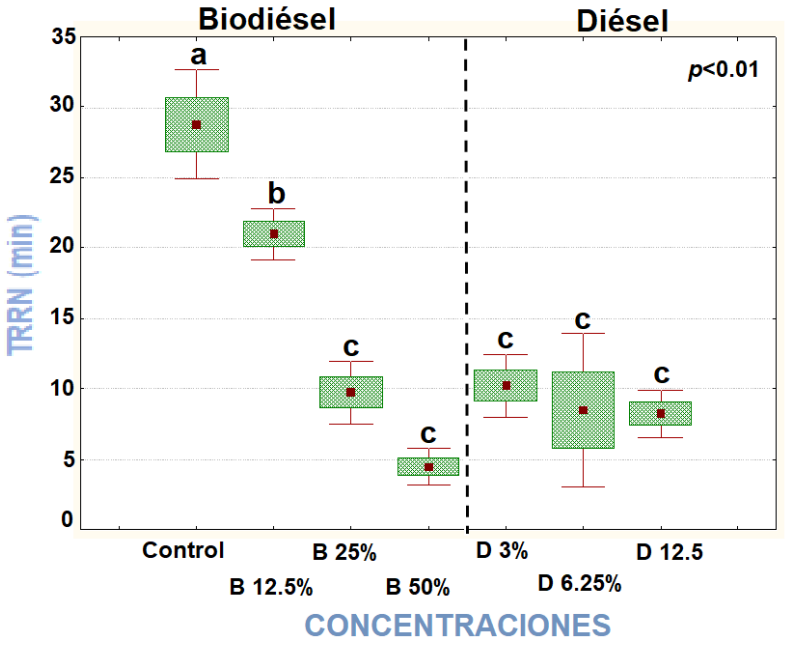


Figura 6. Tiempos de resistencia en crustáceos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel en el día 21 (promedio ± DE). Grupo "a" diferencias significativas respecto a "b" y "c". Grupo "b" diferencias significativas respecto a "a" y "c". Grupo "c" diferencias significativas respecto a "a" y "b". De elaboración propia.

4. Discusión

Estabilidad lisosomal

Los lisosomas son organelos intracelulares que actúan de manera óptima a un pH ácido, son importantes para el secuestro de contaminantes lipofílicos y su desintoxicación. Debido a esta condición, son propensos al daño oxidativo que, a su vez, puede conducir a la desestabilización de la membrana (Nolde *et al.*, 2006). El estrés oxidativo contribuye a la desestabilización de los lisosomas. El daño reflejado por el menor TRRN podría ser explicado por el daño oxidativo provocado por los radicales libres que se liberan durante el metabolismo de los compuestos que conforman el biodiésel, tales como: los ácidos grasos insaturados por ejemplo los monoinsaturados de ácido oléico (C18:1), los poliinsaturados de ácido linoléico (C18: 2) y el ácido linolénico (C18:3) (Bhuiya *et al.*, 2015: Yanamala *et al.*, 2013).

En este estudio se midió el TRRN en los lisosomas de langostinos expuestos a sedimentos contaminados con biodiésel, el daño celular se asoció a un menor TRRN con respecto al control; el TRRN disminuyó con el paso de los días, este

hecho se observó claramente en los organismos expuestos a la mayor concentración (50%) ya que al día 21 el TRRN disminuyó un 63% con respecto al grupo control. No existen estudios similares, por lo que este trabajo reporta por primera vez el daño a nivel celular que puede provocar el biodiésel que contamina los sedimentos. Sin embargo, Cavalcante *et al.*, (2014) en un estudio *in vitro* demostraron que la fracción soluble del biodiésel metílico también provoca daño de tipo oxidativo en células de pez cebra (ZFL), medido a través de la actividad de biotransformación de la enzima glutatión S-transferasa (GST).

En cuanto a los resultados obtenidos en el bioensayo con diésel, se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$) en el TRRN desde el día 7 en las concentraciones D 12.5 y D 25%. Cabe señalar que no se encontraron estudios por exposición a sedimentos contaminados con este combustible por lo que los resultados se comparan con estudios de toxicidad de la fracción soluble del diésel y otros hidrocarburos. En este sentido se pueden mencionar los trabajos de Lowe *et al.*, (1995), quienes reportaron una reducción significativa de la estabilidad lisosomal en las células digestivas de mejillones (*Mytilus edulis*) expuestos a 160 µl de fluoranteno durante 7 días.

La concentración menor de diésel (3%) tuvo una respuesta similar al control después los 21 días de exposición, por lo que se estableció ésta como la Concentración de Efecto no Observable o NOEL (por sus siglas en inglés), que podría ser sugerida como concentración objetivo en caso de la aplicación de algún método de bioensayos similares.

Un estudio realizado por Suarez-Rocha *et al.*, (2015) en el cual analizaron muestras de sedimento localizados en las cercanías de una refinería de petróleo en Brasil mostraron un potencial citotóxico, a través de la técnica de retención de rojo neutro, en la línea celular permanente de fibroblastos derivada del hígado de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) atribuyendo este daño a altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) principalmente fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno. Las características físicas y químicas de estos compuestos varían con el peso molecular. A mayor masa se incrementa su resistencia a la oxidación, reducción, vaporización e hidrosolubilidad, por lo que este tipo de compuestos presentará diferente comportamiento y distribución en el ambiente, y sus efectos en los sistemas biológicos también serán distintos. Los más ligeros producen toxicidad aguda significativa a los organismos acuáticos, mientras que los más pesados no producen efectos agudos, sin embargo, algunos de ellos se reconocen como carcinogénicos (Salazar, 2008).

Las concentraciones más altas de cada contaminante al final del bioensayo, mostraron el mismo TRRN denotando que el biodiésel causa de igual manera efectos adversos en la estructura de los lisosomas, convirtiéndola en una membrana frágil y más permeable (Lowe *et al*. 1992). La fragilidad de la membrana lisosomal,

se ha vinculado con el estrés oxidativo, ya que la presencia de contaminantes puede provocar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que al intentar estabilizarse reaccionan con los lípidos de la membrana convirtiéndolos en hidroperóxidos de lípidos, lo que ocasiona una reacción en cadena que daña la función de la membrana mediante la alteración de la fluidez, volviéndola más permeable y activando las fosfolipasas, que forman ampollas en la membrana y su eventual ruptura (Storey, 1996).

El resultado final del daño a la membrana lisosomal provocado por la exposición a diésel y biodiésel se observó claramente en el presente estudio durante los tres días de medición; se registraron TRRN menores a los del grupo control, lo que implica daños en las funciones esenciales de la célula. La ruptura de los lisosomas puede derivar en el deterioro del estado fisiológico de la célula, impacta la nutrición y la defensa celular, y en última instancia la pérdida de citoplasma (Moore *et al.*, 2008; Nolde *et al.*, 2006).

Analizando los resultados de las Figuras 1, 2 y 3 se hizo evidente que el efecto del diésel fue mayor en los organismos, debido a que se requirió una menor concentración para observar una disminución en el TRRN. Sin embargo, el efecto de la exposición a biodiésel no debe ser considerado menos peligroso, ya que, a lo largo del bioensayo, en la concentración más alta de este combustible (B 50%), se observó el mismo daño que en el diésel, lo que muestra que también el biodiésel es una sustancia tóxica para estos crustáceos.

Nado contra corriente

Además de demostrar el daño citotóxico que causan tanto el diésel como el biodiésel, éste trabajo demostró que ambos combustibles generan efectos nocivos en la locomoción de los organismos. En la prueba realizada con sedimentos contaminados utilizando biodiésel, se observó claramente en las gráficas presentadas (Figuras 4, 5 y 6), que en los tres días de medición existió una tendencia en la disminución del tiempo de nado de los crustáceos asociada a la concentración y tiempo en los días de exposición. Datos similares se obtuvieron en peces bentónicos expuestos a las cenizas de carbón acumuladas en los sedimentos, los cuales mostraron reducciones significativas en el rendimiento de la natación, con un valor medio de casi el 50% menor en los peces expuestos a cenizas, lo que demostró una toxicidad subletal evidente en la velocidad de los organismos. Lo anterior sugiere que el deterioro en el rendimiento de dichos animales puede ser un indicador sensible y más fácil de medir que los biomarcadores de toxicidad más tradicionales (Hopkings *et al.*, 2003).

Amin y Comoglio (2002), agregan que la eventual presencia de hidrocarburos en el medio marino, además de ser letal, aumenta la sensibilidad de las poblaciones ya que afecta procesos metabólicos y motrices que convierten a las especies en potenciales presas. Esta información coincide con los resultados

obtenidos en los langostinos expuestos a sedimentos contaminados con diésel en los que, al igual que la exposición a biodiésel, la resistencia en el nado contra corriente disminuyó conforme aumentó la concentración del diésel y el tiempo de exposición.

En la concentración de diésel más baja (D 3%) se pudo observar que en las primeras dos mediciones no existieron diferencias significativas con respecto al control, sólo al final de la prueba, el tiempo de resistencia en la natación llegó a una disminución de 10 min en comparación con el control que fue de 29 min. Esto indica que esta concentración no fue suficiente como para mostrar efectos nocivos en la locomoción de los organismos.

El día 21 en la concentración D 25% no fue posible la realización de la prueba de nado. En el resto de las concentraciones, se registró el tiempo de resistencia más bajo de todo el bioensayo. Este osciló entre los 10 y 8 min. Datos similares obtuvo Brodersen (1987), al día 21 de exposición a la fracción soluble de petróleo crudo (1-3 ppm) en larvas de "camarón espalda rota" (*Eualus suckleyi*), las cuales dejaron de nadar dentro del dispositivo experimental después de un intervalo de 20 min. Tedengren *et al*. (1988), menciona que el crustáceo *Grammarus* al ser expuesto a la fracción soluble del diésel (10 mg/L) durante 6 h, presentó un efecto de narcosis, decreciendo su actividad locomotora tal como se observó en esta prueba ante la exposición de los sedimentos contaminados con biodiésel al día 21.

Brodersen (1987) y Tendengren *et al.* (1988) coinciden en que uno de los primeros modos de respuesta de los organismos acuáticos en edad larval ante la presencia de hidrocarburos es la suspensión de la actividad natatoria, lo que les permite reservar la energía necesaria para mantener sus funciones básicas activas y no morir de inmediato cuando esta clase de contaminantes entra en su medio. En esta prueba, la sensibilidad de los organismos podría ser comparada con base en la morbilidad más que en la mortalidad (Amin y Comoglio, 2002). Otros efectos asociados a la exposición a hidrocarburos en larvas de diversos crustáceos son: el retraso en el desarrollo larval, y la inhibición en el crecimiento y la muda (Weis *et al.*, 1992). Estas respuestas se han asociado a la interferencia de este tipo de compuestos sobre las vías metabólicas normales de los ácidos grasos y a disrupciones energéticas en general (Amin y Comoglio, 2002).

Como menciona Sokolova (2012), los organismos sometidos a bajos niveles de estrés ambiental emplean numerosos mecanismos para reducir el impacto negativo. A nivel organismo, dichos mecanismos de compensación pueden involucrar un comportamiento de escape. En general, aunque los procesos de compensación son esenciales para la sobrevivencia, estos son energéticamente costosos y pueden comprometer funciones biológicas como la reproducción y el crecimiento. Por otro lado, cuando se presentan factores estresantes extremos, el

organismo suele buscar refugio sin la necesidad de invertir un esfuerzo extra en la actividad locomotora, por lo que lo vuelve más susceptible a ser depredado y comprometiendo la supervivencia de la especie.

Los resultados obtenidos a través de los diferentes biomarcadores evaluados nos indican que tanto el diésel como el biodiésel provocan daños a nivel celular y de organismo, en los juveniles de langostino *Macrobrachium sp.*, los cuales fueron evidentes en el TRRN y la resistencia al nado contra corriente.

Actualmente en México existen cuatro empresas dedicadas a la recolección de aceite de cocina usado (ARUC) para la producción y venta de biodiésel, una de ellas es SOLBEN. Esta empresa proveyó el biocombustible para la realización de este trabajo. El aumento de la producción y el consumo de éste producto debería alentar a realizar más investigaciones ambientales para evaluar el peligro potencial, así como su destino en el medio ambiente. A nivel comercial es necesario considerar este producto como otro combustible que puede llegar al ambiente a través de liberaciones accidentales y pérdidas de rutina asociadas con su uso, ya que no está exento de generar daño en la biota.

El sedimento proporciona a los crustáceos protección y alimento, de manera que las condiciones de contaminación que presente afectarán el desarrollo y desempeño de estos organismos. Los animales utilizados en estos ensayos, provienen de un ambiente natural, en el cual se obtuvo el sedimento utilizado. Este incluso puede tener contaminantes a los cuales los animales estuvieron pre-expuestos. Los resultados indican como los crustáceos que se desarrollan en condiciones naturales de algunos sitios en las costas mexicanas, pueden responder al incremento de contaminantes en el sedimento. Es conocido que se han presentado derrames de gasolina en la zona costera mexicana. En caso de que el diésel o biodiesel se utilicen en mayor cantidad en el futuro como una opción de combustibles, implica que existe un riesgo potencial de afectación a los crustáceos y otros organismos que se desarrollan en estos ambientes.

5. Conclusiones

Conforme aumentó el tiempo de exposición y las concentraciones en los sedimentos contaminados con diésel y biodiésel, se presentó una reducción en el TRRN en los lisosomas de *Macrobrachium sp.* durante los 21 días de exposición. La permeabilidad de los lisosomas fue inversamente proporcional a la concentración de los tratamientos.

El presente estudio aporta información sobre la resistencia locomotora de los organismos expuestos a sedimentos contaminados con diésel y biodiésel por 21

días. La actividad de nado contra corriente, se vio comprometida al aumentar la concentración de los combustibles, provocando un efecto de narcosis en los crustáceos. El aletargamiento en los ejemplares puede convertirlos en potenciales presas vulnerables en el ecosistema.

La estabilidad lisosomal y nado contra corriente resultaron menos alterados por el biodiésel, ya que se necesitó el doble de la concentración para producir el mismo efecto que el diésel.

A nivel temporal, el biodiésel presentó un comportamiento ecotoxicológico similar a la exposición con diésel en la recta final del bioensayo, ya que produjeron efectos de la misma magnitud en ambos combustibles, tanto en el biomarcador celular, como en el comportamiento de locomoción, en las diferentes concentraciones evaluadas.

El uso del biodiésel constituye una alternativa importante para cubrir la demanda energética a nivel nacional y mundial, es una propuesta que vino a sustituir paulatinamente al combustible diésel, asegurando no comprometer el estado de salud de los ecosistemas. Sin embargo, el presente estudio demostró que este combustible también genera efectos citotóxicos y daños en la locomoción de los langostinos, y en caso de ser una opción como combustible alternativo a los de origen fósil, es necesario también hacer un seguimiento de sus posibles repercusiones en el ambiente.

6. Referencias

Amin O. y Comoglio L. (2002). Toxicidad del petróleo diésel en el primer estadío larval de la centolla (*Lithodes santolla*) y del centollón (*Paralomis granulosa*). Revista de Biología Marina y Oceanografía, 37 (2), 139-144.

Barrera G. (2006). Toxicidad de cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la laguna de Mandinga, Veracruz. México, D.F. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Bhuiya M., Rasul M., Khan M., Ashwath N., Azad A. y Hazrat M. (2015). Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel – Part 2: Properties, performance and emission characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 55, 1129-1146.

Brodersen C. (1987). Rapid narcosis and delayed mortality in larvae of King Crabs and Kelp Shrimp exposed to the water-soluble fraction of crude oil. Marine Environmental Research, 22, 233-239.

Castro P., Coello J., y Castillo L. (2007). Opciones para la producción y uso de Biodiésel en el Perú. Soluciones Prácticas, ITDG. Lima, Perú.

Cavalcante D., Silva N., Marcarini J., Mantovani M., Marin M. y Martinez C. (2014). Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. Toxicology in Vitro, 28, 1117-1125.

Ciria J. (2007). Propiedades y características de combustibles diésel y biodiesel [en línea], disponible en https://es.scribd.com/document/39565615/Diesel.

Espina S. y Vanegas C. (2005). Ecofisiología y Ecotoxicología en: Botello A., Rendón J., Gold-Buchot G. y Agraz C. (Eds.), en Botello A. (2005) Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias. Segunda Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, 53-78.

FAO. (1998). Manual para la cría de camarones peneidos. Brasil: Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación. Programa corporativo gubernamental, FAO Italia. Proyecto GCP/RLA/075/ITA, c/o FAOR, Brasil.

García M., Villalobos J., Álvarez F., y Bastida R. (2012). Estado del conocimiento de los crustáceos de México. Ciencia y Mar, 16(46), 43-62.

González F., Jiménez I., Rodríguez M., Restrepo S. y Gómez J. (2008). Biocombustibles de segunda generación y Biodiésel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. Revista de ingeniería. Universidad de los Andes Bogotá, Colombia, 28, 70-82.

Gregg J., Fleeger J. y Carman K. (1997). Effects of suspended, diesel-contaminated sediment on feeding rate in the darter goby, *Gobionellus boleosoma* (Teleostei: Gobiidae). Marine pollution bulletin, 34(4), 269-275.

Hernández P. (2008). Efecto de la temperatura en el crecimiento y sobrevivencia del langostino *Macrobrachium occidentale* y del acocil *Cherax quadricarinatus*. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.

Hopkings W., Snodgrass J., Staub B., Jackson B. y Congdon J. (2003). Altered swimming performance of a benthic fish (*Erimyzon sucetta*) exposed to contaminated sediments. Achieves of Environmental Contamination and Toxicology, 44, 383-389.

Khan N., Warith M. y Luck G. (2012). A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. Journal of the Air y Waste Management Association, 57(3), 286-296.

Leme D., Grummt T., Heinze R., Sehr A., Skerswetat M., Rodrigues de Marchi M., Canto M. y Palma de Oliveira D. (2011). Citoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 2148-2155.

Lowe D., Moore M. y Evans B. (1992). Contaminant impact on interactions on molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. Marine Ecology Progresss Series 91, 135-140.

Lowe D., Soverchia, C., y Moore M. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic Toxicology 33, 105–112.

Lozada I., Islas. J. y Grande G. (2010). Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 486-492.

Moore M., Kohler A., Lowe D. y Viarengo A. (2008). Lysosomes and Autophagy in Aquatic Animals. In Daniel J. Klionsky, editor: Methods in Enzymology 451, 581-620.

Morales M. y Meruane J. (2012). Indicadores de condición larvaria aplicados al camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782), en condiciones de cultivo controlado. Latin American Journal of Aquatic Research 40, 730-742.

Neff J., Ostazeski S., Gardiner W. y Stejskal I. (2000). Effects of weathering on the toxicity of three offshore australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. Environmental Toxicology and Chemistry. 19(7), 1809-1821.

Nolde N., Drobne D., Valant J., Padovan I., y Horvat M. (2006). Lysosomal membrane stability in laboratory and field-exposed terrestrial isopods *porcellio scaber* (*Isopoda, crustacea*). Environmental Toxicology and Chemestry 25(8), 2114-2122.

Ramírez P., Guzmán M., Barrera G. y Guzmán X. (2012). La ecotoxicología, herramienta para la conservación y la óptima producción de organismos acuáticos. In: Acuicultura en México: Impacto en producción, manejo y conservación. Editorial Académica Española. 612.

REPSOL (2015). Biocombustibles [en línea] disponible en: https://www.repsol.com/es_es/corporacion/conocer-repsol/contexto-energetico/matriz-energetica-mundial/default.aspx.

Retana J. (2008). Transferencia tecnológica sobre las ventajas y desventajas de la utilización del biodiesel. Tesis de Maestría. Instituto Nacional de Aprendizaje, San José, Costa Rica.

Salazar L. (2008) Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.

Silva C., Oliveira C., Gravato C. y Almeida J. (2013). Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a) pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. Marine Environmental Research 90, 39-46.

Sokolova I., Frederich M., Bagwe R., Lanning G. y Sukhotin A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research 79, 1-15.

Storey K. (1996). Oxidative stress: animal adaptions in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29, 1715-1733.

Svendsen C., Spurgeon D., Hankard P. y Weeks J. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57(1), 20–29.

Suarez-Rocha P., Braunbeck T., de Francheschi D. y Marin-Morales M. (2015). Assessment of cytotoxicity and AhR-mediated toxicity in tropical fresh water sediment under the influence of an oil refinery. Environmental Science and Pollution Research 22, 12566-12575.

Tedengren M., Arniér M. y Kautsky N. (1988). Ecophysiology and stress response of marine and brackish water *Gammarus* species (Crustacea, Amphipoda) to changes in salinity and exposure to cadmium and diesel-oil. Marine Ecology-Progress Series 47, 107-116.

Weis J., Cristini A. y Rao K. (1992) Effects of pollutants on molting and regeneration in crustácea. American Zoologist, 32(3), 495-500.

Yanamala N., Hatfield M., Farcas M., Schwegler-Berry D., Hummer J., Shurin M., Birchd, M., Gutkin D., Kisin E., Kagan V., Bugarski A. y Shvedova, A. (2013). Biodiesel versus diesel exposure: Enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung. Toxicology and Applied Pharmacology 272, 373-383.

Zapata E., Rojas L., Sánchez G. y Barreto M. (2012). Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. Ciencias Marinas. 38(3), 517-528.

Capítulo 18

OCURRENCIA, DESTINO, DETECCIÓN Y EFECTOS TÓXICOS DE QUINOLONAS EN AMBIENTES ACUÁTICOS

Jonathan Ricardo Rosas-Ramírez [a]
Hariz Islas-Flores [a]
Leobardo Manuel Gómez-Oliván [a]

[a] Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón, intersección con Paseo Tollocan s/n, Colonia Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México.

[a] jon_rick@hotmail.com.

Resumen

En la actualidad el consumo de antibióticos de la familia de las quinolonas (Q's) y fluoroquinolonas (FQ'S) es muy importante en el tratamiento de enfermedades infecciosas, por lo que su fabricación, uso y desecho tienen un gran impacto a nivel mundial. Este grupo de antibióticos no sólo se emplean en medicina clínica, también son utilizados en mayores cantidades y concentraciones en veterinaria, agricultura, acuicultura y sector forestal, por lo que su uso es muy amplio.

Esta revisión reunió información sobre el consumo de antibióticos de las Q's y FQ's en unidades de Dosis Diaria Definida (DDD) y Unidades Estándar (UE) principalmente, por cada 1,000 habitantes, de acuerdo a lo reportado por la Red Europea de Vigilancia de Consumo de Antibióticos (ESAC-Net) y por la base de datos IQVIA MIDAS (EE UU), respectivamente.

Se detectó que la ocurrencia de este grupo de antibióticos se lleva a cabo en aguas superficiales, subterráneas, municipales y residuales principalmente, en los países donde se ha reportado un mayor consumo de estos fármacos. Debido en su mayoría a descargas municipales, industriales y hospitalarias.

Así mismo se reunió información importante sobre efectos toxicológicos identificados principalmente en fauna y microbiota de medios acuáticos.

Dada la relevancia de estos hallazgos, este escrito pretende ampliar el conocimiento acerca del efecto negativo que las Q's y FQ's pueden provocar al medio ambiente, generando consecuencias para la salud humana y animal, así como concientizar que, debido a su elevado consumo, su ocurrencia y destino en medios acuáticos cada vez es mayor, por lo que se requerirá de estudios más amplios y detallados para implementar futuras regulaciones del uso de este grupo de antibióticos.

*Palabras clave***:** Quinolonas, ambientes acuáticos, ocurrencia.

1. Introducción

Actualmente la contaminación ambiental es uno de los problemas que se presenta a nivel mundial. Esta se puede dar por diferentes factores debido la presencia de sustancias químicas como los fármacos. Estos son necesarios para preservar la salud humana y animal, por lo que su uso es muy extenso, lo cual aumenta la posibilidad de ser detectados en el ambiente. Un grupo importante de fármacos son los antibióticos, y dentro de estos se encuentran a las quinolonas (Q's) y las fluoroquinolonas (FQ's) las cuales poseen propiedades muy importantes como ejercer actividad antimicrobiana de muy amplio espectro (Cheng et al., 2013; Hooper y Wolfson, 1989). Esto genera un consumo muy extenso en muchos países. Debido a esta problemática se han realizado muchas investigaciones sobre el tema de la presencia, ocurrencia y destino de las Q's y FQ's en ambientes acuáticos, principalmente. La introducción de este grupo de antibióticos en ambientes acuáticos se puede dar por diferentes vías, primordialmente las descargas industriales, hospitalarias y no menos importantes las municipales. Se han llevado a cabo múltiples investigaciones abordando este tema, destacando aquellas que consideran cuestiones toxicológicas y efectos agudos en los organismos acuáticos en particular (Nie et al., 2009; Robinson et al, 2005; Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000;). Los residuos farmacéuticos que han sido detectados en ambientes acuáticos, especialmente en aguas residuales, efluentes, aguas superficiales, aguas marinas y aguas subterráneas (Santos et al., 2009; Golet et al., 2002; Halling-Sørensen et al., 1998) pueden provocar efectos adversos en gran cantidad de organismos, en particular en el crecimiento y desarrollo de los mismos (Štěpanova et al., 2012). Parte importante de este escrito es llevar a cabo una revisión de las características principales de las Q's y FQ's, su clasificación y mecanismo de acción. Así como la revisión del consumo estimado de estos fármacos por diferentes sectores como el mayorista y el minorista. De igual modo recabar información sobre el destino, ocurrencia y detección en diferentes ambientes acuáticos. Y revisar efectos tóxicos que estos pudieran llegar a tener en estos ambientes y en la fauna que allí habita en particular.

1.1 Descubrimiento de las quinolonas

El desarrollo de las quinolonas comenzó en 1962, cuando Lesher et al., realizó el descubrimiento accidental del ácido nalidíxico como subproducto de la síntesis de la cloroquina, compuesto utilizado para el tratamiento del paludismo.

Las quinolonas están conformadas por una estructura básica de dos anillos, un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 (Figura 1a) (Domagala, 1994).

El ácido nalidíxico fue la primera quinolona que se utilizó como agente antimicrobiano al resultar efectivo principalmente contra bacterias gramnegativas causantes de infección urinaria, la cual dio lugar a la formación de diferentes

especies de esta molécula (Jackson et al., 1998). Sobre la estructura de esta molécula se realizaron modificaciones con propiedades farmacocinéticas superiores que demostraron tener mayor espectro y actividad antibacteriana (Chin y Neu, 1984). Algunas moléculas representativas de las primeras síntesis de quinolonas fueron el ácido oxolínico, ácido pipemídico, cinoxacino, entre otras (Matsumoto y Minami, 1975).

Posteriormente se realizaron modificaciones a la estructura molecular básica de las quinolonas que dieron origen a nuevas estructuras que presentaron mejoras en características farmacodinámicas, perfiles farmacocinéticos, incremento en la potencia, solubilidad, actividad biológica y otras propiedades fisicoquímicas, a este nuevo grupo se le llamó piperazinil fluoroquinolonas o simplemente fluoroquinolonas (Hooper et al., 1989), y como su nombre lo dice, contienen mínimo un átomo de flúor en su molécula que da lugar a que la penetración celular se incremente (1 a 70 veces) y un anillo de piperazina que influye en la actividad inhibitoria de la ADN girasa bacteriana (2 a 17 veces) (Chu y Fernandes, 1989; Stein, 1988; Domagala et al., 1986) (Figura 1b). Dentro de estas nuevas estructuras se encontró principalmente al norfloxacino, enrofloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, entre otros (Tabla 1) (Hooper et al., 1989).

a) b)

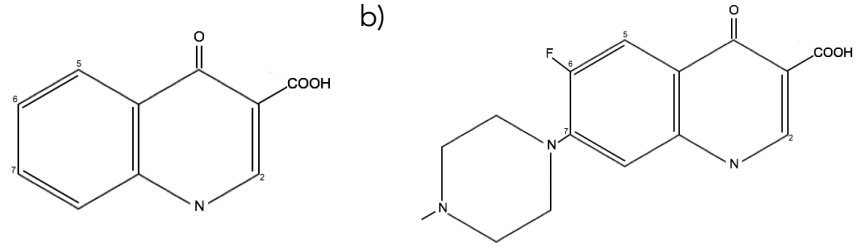


Figura 1. a) Estructura química básica quinolonas. b) Estructura química básica fluoroquinolonas.

1.2 Clasificación en quinolonas y fluoroquinolonas

Actualmente existen diferentes formas de clasificar a las quinolonas, debido a que las diferencias estructurales entre las distintas moléculas radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno, como en las cadenas laterales y la presencia de átomos de flúor (Neuman, 1988). Las quinolonas se pueden clasificar en dos grupos importantes; 4-quinolonas y 6-fluoroquinolonas o simplemente quinolonas y fluoroquinolonas respectivamente (Jackson et al., 1998), también pueden ser clasificadas por generación o por su estructura molecular de acuerdo a la evolución que presentaron a lo largo del tiempo (Kim et al., 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las quinolonas y fluoroquinolonas su descubrimiento cronológico.

	Año	Nombre	Año	Nombre				
Quinolonas	2014	Ozenoxacino	1979	Ácido piromídico				
	2009	Nemonoxacino	1976	Tioxacino				
	1980	Miloxacino	1972	Ácido oxolínico				
	1979	Ácido pipemídico	1964	Ácido nalidíxico				
Fluoroquinolonas	**Año**	**Nombre**	**Año**	**Nombre**	**Año**	**Nombre**	**Año**	**Nombre**
	2014	Levofloxacino (Isómero-L de Ofloxacino)	1997	Olamufloxacino	1991	Danofloxacino	1987	Lomefloxacino
	2011	Finafloxacino	1995	Orbifloxacino	1990	Nadifloxacino	1986	Norfloxacino
	2010	Avarofloxacino (Kocsis et al., 2016; Morrow et al., 2010)	1993	Trovofloxacino	1989	Ofloxacino	1986	Ibafloxacino
	2007	Besifloxacino	1993	Marbofloxacino	1989	Pefloxacino	1985	Sarafloxacino
	2004	Zabofloxacino	1992	Fleroxacino (Derivado de ciprofloxacino)	1989	Enoxacino	1985	Difloxacino
	2004	Cadrofloxacino	1992	Gatifloxacino	1989	Sparfloxacino	1984	Amifloxacino
	2003	Delafloxacino	1992	Fleroxacino	1989	Rufloxacino	1980	Cinoxacino
	2001	Garenoxacino	1992	Sitafloxacino	1988	Tosufloxacino	1979	Rosoxacino
	1997	Alatrofloxacino (Pro-derivado de Trovofloxacino)	1992	Balofloxacino	1988	Clinafloxacino	1977	Flumequina
	1997	Moxifloxacino	1992	Prulifloxacino	1988	Temafloxacino		
	1997	Gemifloxacino	1992	Pazufloxacino	1987	Ciprofloxacino		
	1997	Premafloxacino	1992	Grepafloxacino	1987	Enrofloxacino		

Información extraída de la base de datos PubChem (Kim et al., 2019) a excepción de la fluoroquinolona avarofloxacino. Elaboración propia

1.3 Mecanismo de acción

Las quinolonas actúan directamente en el ADN bacteriano, principalmente inhiben la acción de las topoisomerasas impidiendo la síntesis de ADN (Hooper, 2001). Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos de la cadena cromosómica. El ADN bacteriano normalmente se mantiene en un estado superenrollado. Las bacterias deben desenrollar su ADN para replicarse, lo que puede provocar dobleces y roturas en la cadena. La ADN girasa bacteriana corta, separa y vuelve a sellar las cadenas de ADN durante la replicación (Pallo-

Zimmerman et al., 2010). Se desconoce el mecanismo exacto por el cual las fluoroquinolonas provocan daño al ADN, pero se piensa que los pliegues y roturas no reparadas provocan la destrucción del ADN como consecuencia de la alteración de la ADN girasa (Maddison et al., 2008; Drlica y Zhao, 1997). Los mamíferos también dependen de las topoisomerasas para la reparación del ADN, es importante destacar que las fluoroquinolonas tienen una mayor afinidad por la ADN girasa bacteriana que por la ADN girasa de mamíferos (Maddison et al., 2008). Esta diferencia permite a las fluoroquinolonas tener una actividad bactericida rápida sin efectos adversos sobre el huesped. En bacterias gramnegativas, la topoisomerasa inhibida por las quinolonas es la ADN-girasa.

Por otro lado, en las bacterias grampositivas las fluoroquinolonas actúan sobre la topoisomerasa IV. Esta enzima es la encargada de mediar la relajación del ADN y está involucrada en la separación de los cromosomas hijos después de la replicación, lo que lleva a la muerte celular. La interrupción de la acción de esta enzima permite que el ADN bacteriano quede atrapado después de la replicación (Drlica y Zhao, 1997).

De manera general las quinolonas en la girasa interactúan con aminoácidos de las alfa hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. También es importante mencionar que las quinolonas participan en la formación del complejo quinolona-enzima-ADN, pero con la característica de que este ADN está roto. Alteraciones en alguna de las subunidades de la ADN-girasa o de la topoisomerasa IV son los mecanismos más significativos (Alós, 2003). La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima (Kampranis y Maxwell, 1998). Pero su actividad bactericida depende de la concentración suministrada y su acción se extiende con el empleo del átomo de flúor en la posición 6 (Bolon, 2011; Alós, 2003). El primer paso para que un antibiótico pueda ejercer su acción bactericida, es la incorporación de este al interior del citoplasma bacteriano. Llevado a cabo por dos principales mecanismos, la difusión pasiva que se define como el transporte de moléculas a través de la membrana celular por diferencia de concentraciones, o bien por transporte activo que es aquel que requiere energía para transportar moléculas en contra de un gradiente de concentraciones (Mouton y Leroy, 1991).

1.4 Principales propiedades farmacocinéticas de las quinolonas

Relativamente todas las fluoroquinolonas tienen una acción farmacocinética similar. Posterior a la administración oral, marbofloxacino, enrofloxacino, difloxacino y orbifloxacino se absorben en más del 80% en el tracto gastrointestinal con una biodisponibilidad oral del 100% (Maddison et al., 2008).

La selección del fármaco y la dosis se basan en varios factores, que incluyen la función renal y hepática, el uso simultáneo con otros medicamentos, el metabolismo y la penetración de tejidos. Se sabe que las fluoroquinolonas alcanzan

altas concentraciones en sitios extravasculares (Vance-Bryan et al., 1990). Existe evidencia de que las fluoroquinolonas se acumulan en las células inflamatorias, impidiendo una actividad aún mayor en las áreas con inflamación celular significativa. La mayoría de las fluoroquinolonas se excretan de forma inalterada en la orina, lo que las convierte en una excelente opción para el tratamiento de las infecciones urogenitales (Cartier et al., 1990).

1.5 Consumo estimado de quinolonas y fluoroquinolonas a nivel mundial

El consumo de los diferentes tipos de antibióticos, las dosis y las prescripciones de estos pueden variar dentro de cada país y entre países. En el año 2002, de acuerdo con lo estimado por (Wise, 2002) se consumieron entre 100,000 – 200,000 toneladas de antibióticos en todo el mundo.

En México, las estadísticas más recientes sobre el consumo de antibióticos son emitidas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), este instituto indicó que en el año 2017 se consumieron un total de 632,310 piezas de antibióticos, y para el primer cuatrimestre del año 2018 se consumieron 214,937 piezas generando un total de 24 millones 410 mil pesos mexicanos. A diferencia del reporte del consumo de otros países, México lo hace en número de piezas, lo que no permite diferenciar la presentación farmacéutica ni el consumo total en toneladas (INEGI, 2018) (Tabla 2).

También ha sido reportado el consumo y la producción de antibióticos de otros países como China, el cual es uno de los mayores productores y consumidores de antibióticos del mundo. En el año 2013 se reportó en este país que el consumo aproximado de antibióticos fue de 92,700 toneladas, de las cuales 25,500 toneladas correspondieron a fluoroquinolonas (norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, lomefloxacino, enrofloxacino, fleroxacino, pefloxacino y difloxacino), 3,300 toneladas fueron consumidas por humanos y el resto por animales (cerdos, pollos, entre otros) (Tabla 2) (Zhang et al., 2015).

En Estados Unidos (EE UU) la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) reportó el uso de fármacos comprendido entre los años 2010 y 2011 en el Drug Use Review (FDA, 2012). En este reporte se informaron las ventas de fármacos generadas por diferentes fabricantes en unidades de kilogramos o unidades internacionales de la molécula activa, para un solo ingrediente o para productos combinados a varios sectores; minoristas y no minoristas (farmacias, hospitales, clínicas etc.), sin embargo, no se reflejó lo que se vendió o se administró directamente a los pacientes. Los reportes de ventas concluyeron que en el año 2011 se vendieron aproximadamente 3,289 toneladas de antibióticos en el mercado de EE UU. También se reportan las ventas de diferentes grupos de antibióticos, constatando que las fluoroquinolonas representaron el 8.4% de las ventas totales en este año correspondientes a 277.4 toneladas (Tabla 2).

El consumo de antibióticos por humanos en Inglaterra correspondiente a los años 2012-2016 se indicó en el English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR)-Report 2017 (Public Healt England Publications, 2017), en este país las prescripciones de antibióticos son escritas por médicos, médicos dentales, enfermería en general, consultorios dentales, hospitales y otros servicios comunitarios como los centros de atención y los servicios fuera de atención. Y el reporte de uso de antibióticos reveló que en el año 2016 se consumieron 21.4 DDD (dosis diarias definidas por 1 000 habitantes por día) (Tabla 2, Figura 2). El indicador DDD es una unidad de medida estandarizada para proporcionar datos del uso de antibióticos en humanos y permite hacer comparaciones entre países, la dosis diaria estandarizada para cada antibiótico es establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y refleja una dosis normal por adulto en un día (WHO, 2013).

En el año 2016 en Canadá, se reportó que se dispensaron un total de 247,014 kg de ingredientes antibióticos, de los cuales 206,262 kg fueron dispensados por farmacias y 40,752 kg fueron adquiridos por hospitales, generando un gasto aproximado de 766 millones de dólares (674 millones por la comunidad en general y 92 millones por hospitales). Estos datos reflejaron que en el año 2016 en Canadá se consumieron 17.4 DDD de antibióticos, por parte de la comunidad en general y 1.4 DDD de antibióticos por hospitales (Public Health Agency Canada, 2017) (Tabla 2, Figura 2).

La Red Europea de Vigilancia de Consumo de Antibióticos (ESAC-Net) a través del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) maneja información sobre el consumo general de antibióticos para uso sistémico en entornos hospitalarios y comunitarios en el "Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union" (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017), donde se informó sobre el consumo de antibióticos en unidades de DDD de veintinueve países de la Unión Europea en el año 2016 y uno en 2015 (Tabla 2, Figura 2) para dos sectores; comunitario y hospitalario (veinticuatro para los dos sectores y seis para el sector comunitario). Los datos son tratados utilizando el sistema de clasificación Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) y la metodología de dosis diaria definida desarrollada por la OMS (WHO, 2013).

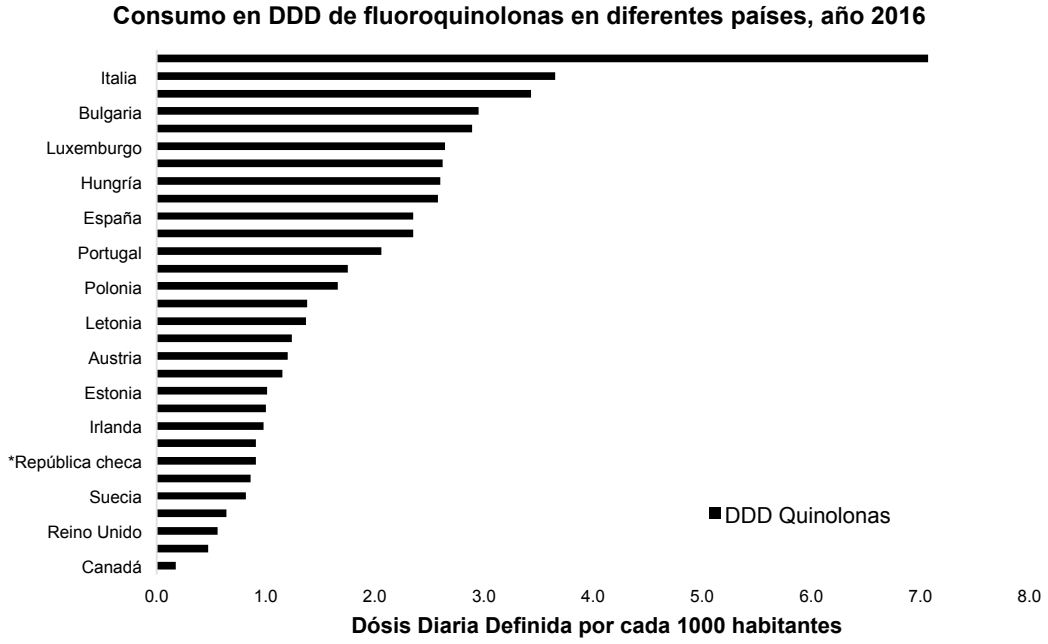
Tabla 2. Consumo de quinolonas y fluoroquinolonas en diferentes países por los sectores comunitario y hospitalario, año 2016, expresado en dosis diaria definida (DDD) (Elaboración propia)

País	DDD $_{Fluoroquinolonas}$	País	DDD $_{Fluoroquinolonas}$
*México	[1] 214,937 [2] 632,310	Islandia	0.91
**China	[4] 25,500	Inglaterra	[6] 21.4
**EE UU	[5] 277.4	Bulgaria	2.95

Netherlands	0.86	Reino Unido	0.56
Austria	1.2	España	2.35
Estonia	1.01	Croacia	[6] 22.57
Suecia	0.82	Portugal	2.06
Alemania	1.24	Polonia	1.66
Letonia	1.37	Irlanda	0.98
Eslovenia	1.38	Eslovaquia	2.62
Hungría	2.6	Luxemburgo	2.64
Noruega	0.47	Bélgica	2.58
Dinamarca	0.64	Italia	3.65
Canadá	0.17	Rumania	3.43
Finlandia	1	Francia	1.75
Malta	2.35	Chipre	7.07
República checa	[3] 0.91	Grecia	2.89
Lituania	1.15		

*Consumo reportado en número de piezas; **Consumo reportado en toneladas/año.

[1]Reporte del consumo del primer cuatrimestre del año 2018 en México, antibióticos en general; [2]Reporte del consumo del año 2017 en México, antibióticos en general; [3]Reporte del consumo del año 2015, [4]Reporte del consumo del año 2013, [5]Reporte del consumo del año 2001; [6]DDD de antibióticos en general.



*Consumo reportado para el año 2015. Valores no especificados para Inglaterra y Croacia, no se incluyeron en la gráfica.

Figura 2. Comparación del consumo de fluoroquinolonas de diferentes países, para el año 2016, expresado en DDD (Elaboración propia).

Otra fuente de información que reporta el uso de antibióticos a nivel mundial se hace a través de la base de datos de IQVIA MIDAS ("ResistanceMap - Antibiotic Use," n.d.). Esta base de datos estima el consumo de antibióticos por el volumen de ventas en farmacias minoristas y hospitales en base a encuestas nacionales de muestras realizadas por los canales de distribución de ventas farmacéuticas (es decir, del fabricante al mayorista y al minorista).

Los resultados se reportan en el ResistanceMap, una colección de herramientas de visualización de datos basada en la web que permite la exploración interactiva de la resistencia a los antibióticos y tendencias de uso de antibióticos en países de todo el mundo ("ResistanceMap - Antibiotic Use," n.d.). Se recopilan los datos para estimar las ventas directas de los fabricantes de antibióticos y las ventas indirectas de los mayoristas.

Las estimaciones de ventas de estas muestras se proyectan con el uso de un algoritmo desarrollado por IQVIA para aproximar los volúmenes totales de ventas y consumo. Este algoritmo utiliza factores regionales, sectores específicos y canales de distribución específicos para proyectar el consumo nacional estimado de antibióticos. Sin embargo, los detalles precisos del algoritmo no se encuentran disponibles por motivos de propiedad.

Los datos sobre las ventas de fluoroquinolonas se reportan en Unidades Estándar por cada 1000 habitantes (UE), las unidades estándar es una designación de IQVIA que representa una unidad de dosis única como una tableta, cápsula o ampolleta.

Para permitir una comparación significativa entre países, las UE por cada 1000 habitantes se calculan dividiendo el número reportado de unidades estándar por estimaciones de población del Banco mundial. Cabe mencionar que los procedimientos de recopilación de datos imponen limitaciones adicionales para algunos países que no pudieron ser completamente contabilizados. Por ejemplo, algunos países registraron datos de ventas solo para hospitales o sectores minoristas y, en algunos casos, no se incluyeron ciertos tipos de ventas de este tipo de antibióticos, como los que se realizan en supermercados o a través de canales gubernamentales.

En la Tabla 3 y Figura 3 se muestra el consumo de fluoroquinolonas en UE por cada 1000 habitantes, para diferentes países y agrupados por continente, durante el año 2015. También se muestra la población estimada por el Banco Mundial correspondiente a cada país para el mismo año.

Tabla 3. Consumo en unidades estándar de fluoroquinolonas reportados por hospitales y farmacias de diferentes
países en el año 2015.

	País	Población	Consumo UE 1000 habitantes
Europa	Noruega	5,188,610	472
	Reino Unido	65,128,860	479
	Dinamarca	5,683,480	482
	Suecia	9,799,190	588
	Finlandia	5,479,530	610
	Estonia	1,315,410	692
	República Checa	10,546,060	762
	Letonia	1,977,530	763
	Irlanda	4,676,840	805
	Eslovenia	2,063,530	864
	Lituania	2,904,910	1,014
	Austria	8,633,170	1,083
	Polonia	37,986,410	1,102
	Ucrania	45,154,030	1,114
	Suiza	8,282,400	1,197
	Francia	66,624,070	1,211
	Alemania	81,686,610	1,238
	Portugal	10,358,080	1,282
	Croacia	4,203,600	1,288
	Bosnia y Herzegovina	3,535,960	1,436
	España	46,447,700	1,601
	Hungría	9,843,030	1,620
	Bélgica	11,274,200	1,695
	Bulgaria	7,177,990	1,732
	Luxemburgo	569,600	1,739
	Rusia	144,096,870	1,784
	Grecia	10,820,880	1,848
	Turquía	78,271,470	1,848
	Serbia	7,095,380	1,880
	Kazajistán	17,544,130	1,918
	Italia	60,730,580	1,929
	Eslovaquia	5,423,800	1,950

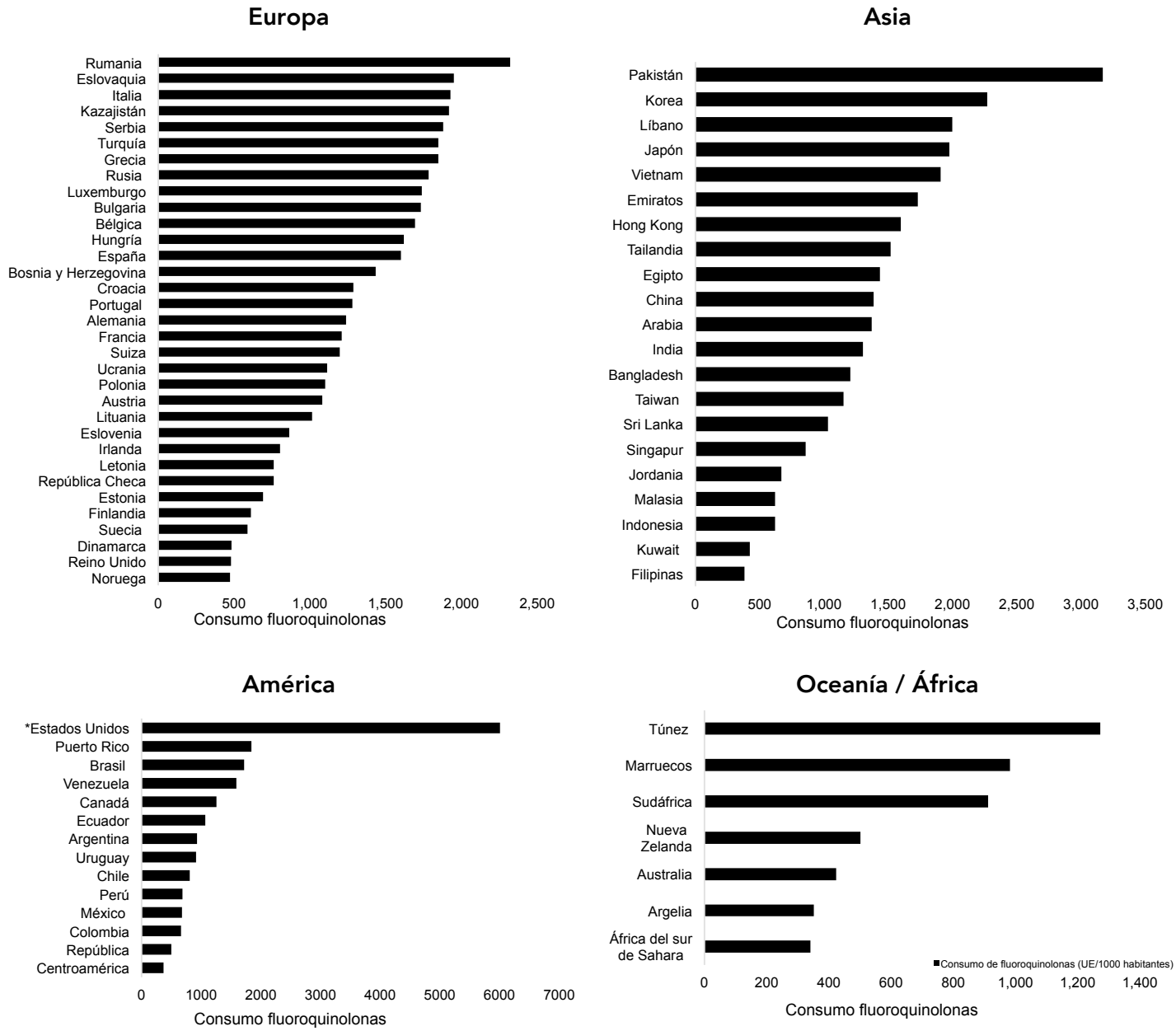
	País	Población	Consumo UE 1000 habitantes
América	Centroamérica	603,644,860	364
	República Dominicana	10,528,390	498
	Colombia	48,228,700	661
	México	125,890,950	675
	Perú	31,376,670	688
	Chile	17,762,680	808
	Uruguay	3,431,550	916
	Argentina	43,417,760	928
	Ecuador	16,144,370	1,070
	Canadá	35,848,610	1,254
	Venezuela	31,155,130	1,585
	Brasil	205,962,110	1,719
	Puerto Rico	3,473,180	1,844
	*Estados Unidos	313,998,380	6,011
África / Oceanía	África del sur de Sahara	1,005,570,800	341
	Argelia	39,871,530	352
	Australia	23,789,340	423
	Nueva Zelanda	4,595,700	501
	Sudáfrica	55,011,980	912
	Marruecos	34,803,320	982
	Túnez	11,273,660	1,272

Asia	Rumania	19,815,480	2,323
	Filipinas	101,716,360	382
	Kuwait	3,935,790	423
	Indonesia	258,162,110	619
	Malasia	30,723,150	619
	Jordania	9,159,300	669
	Singapur	5,535,000	858
	Sri Lanka	20,966,000	1,031
	Taiwán	**23,492,000	1,152
	Bangladesh	161,200,890	1,205
	India	1,309,053,980	1,303
	Arabia Saudita	31,557,140	1,370
	China	1,371,220,000	1,387
	Egipto	93,778,170	1,435
	Tailandia	68,657,600	1,520
	Hong Kong	7,305,700	1,599
	Emiratos Árabes	9,154,300	1,731
	Vietnam	91,713,300	1,906
	Japón	127,141,000	1,975
	Líbano	5,851,480	1,999
	Corea	25,243,920	2,269
	Pakistán	189,380,510	3,170

*Datos correspondientes al número de prescripciones dispensadas en farmacias minoristas (cadenas, comerciantes en serie, farmacias independientes y tiendas de alimentos) y población del año 2012.

**La población de Taiwán no se encontró disponible en las estimaciones de población del Banco Mundial por lo que fue extraída de la página web de las Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población("Home | United Nations," n.d.). La distribución de fluoroquinolonas tomadas en cuenta fueron moxifloxacino, ciprofloxacino, gemifloxacino, ofloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, norfloxacino, enoxacino, gatifloxacino, trovafloxacino y esparfloxacina.

Elaboración propia



[r]EE UU, consumo del año 2012.

Figura 3. Consumo de antibióticos y fluoroquinolonas por continente en unidades estándar por cada 1000 habitantes (Elaboración propia).

1.6 Aplicaciones y uso de las quinolonas y fluoroquinolonas en general

Las quinolonas y fluoroquinolonas como agentes antimicrobianos son ampliamente utilizadas, no sólo como medicamentos veterinarios para tratar enfermedades en animales, sino también como un complemento alimenticio para prevenir enfermedades y promover el crecimiento en animales (Zhao et al., 2018). El uso y aplicación de este grupo de antibióticos es muy amplio ya que son

utilizadas en numerosos campos, por ejemplo en la acuicultura, la industria alimenticia, el mejoramiento de la salud animal y humana, además del desempeño tan importante en la prevención de enfermedades patógenas en humanos (Fortt et al., 2007).

Actualmente, el uso y la aplicación de quinolonas en general para el tratamiento de diferentes enfermedades va en aumento. Las quinolonas y fluoroquinolonas representan una clase importante de agentes quimioterapéuticos de relevancia médica (Wentland et al., 1993). Su uso es tan amplio que tienen aplicaciones no bacterianas (Leyva-Ramos et al., 2017). Tal es el caso de recientes descubrimientos de nuevas fluoroquinolonas con potente actividad eucariótica, donde se indica que podrían ser utilizados para el tratamiento del cáncer en humanos (Topcu, 2001). También es el caso de investigaciones que muestran que este grupo de antibióticos pueden servir como agentes anticancerígenos que presentan actividad contra las enzimas topoisomerasas de procariota y eucariota, generando nuevas moléculas para el tratamiento del cáncer (Barrett et al., 1989). Tal es el caso de una molécula derivada de las quinolonas que se conoce como Vareloxin fue la primera en ser aceptada formalmente como agente anticancerígeno (Advani et al., 2010).

Las quinolonas son utilizadas también por su eficacia antifúngica. Se ha demostrado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de micelios de la especie *Rhizoctonia solani* (entre el 83–94%) al aplicar derivados de norfloxacino, el cual genera un efecto similar a carbendazima (anifúngico comercial) (Yu et al., 2009).

Las quinolonas también han sido objeto de investigación para el tratamiento del VIH, actualmente existen reportes en la literatura que sugieren el reemplazo del átomo de flúor por un grupo amínico (Stevens et al., 2007) generando una fuerte actividad sobre el VIH-1 (Richter et al., 2005). Aunque el mecanismo de acción antiviral de las quinolonas sobre el VIH no se ha determinado, sí se conocen algunos aspectos importantes que permiten comprender su acción antiviral como la integración del ADN proviral hacia el ARNm (Daelemans et al., 1999). Los estudios realizados para el tratamiento de VIH, han promovido la síntesis de nuevos fármacos basados en quinolonas, que pueden representar una nueva generación de inhibidores (Kumar et al., 2012).

Existen muchas investigaciones en curso sobre el uso y aplicación de las quinolonas, así como el desarrollo de nuevas estructuras para su aplicación en el tratamiento y conservación a nivel veterinario y clínico.

1.7 Uso animal

Actualmente el tratamiento animal con quinolonas o fluoroquinolonas puede representar un riesgo potencial a la salud de consumidores de animales tratados, debido a que estos fármacos generalmente persisten en los tejidos de algunos animales (Fernando y Michael, 2016).

La Unión Europea ha dividido los compuestos quinolónicos en aplicaciones humanas, y veterinarias. Las fluoroquinolonas para uso humano no están permitidas para aplicaciones veterinarias, excepto moxifloxacina, aunque el uso de esta en animales no es una práctica común (Papich, 2016). También se sabe que ciprofloxacino se usa sin autorización de forma frecuente en el tratamiento de animales de compañía (Pallo-Zimmerman et al., 2010). El ciprofloxacino se absorbe en más del 80%, pero tiene una disponibilidad del 40% en perros y del 33% en gatos (Albarellos et al., 2004). También se ha reportado que del 10% al 40% del enrofloxacino absorbido se convierte en ciprofloxacino en perros y gatos (Boothe et al., 2006). Por lo tanto, dada su farmacocinética, el uso no indicado de ciprofloxacino en animales de compañía está poco justificado. La conversión metabólica de enrofloxacino a una forma activa de ciprofloxacino hace que el uso de ciprofloxacino sea redundante en medicina veterinaria.

Las quinolonas de uso veterinario son utilizadas principalmente en la industria ganadera y en los criaderos de peces. Cuando estos animales presentan cuadros infecciosos de tipo pulmonar, urinario y digestivo. Estos antibióticos son utilizados de manera controlada, con el objetivo de minimizar el riesgo a la salud humana asociado con el consumo de animales tratados y sus residuos en tejidos (Talero-Pérez et al., 2014).

El uso de quinolonas también es aplicado en veterinaría en los sectores acuícola y agricultor y doméstico en animales de compañía. En EE UU, la FDA aprobó el uso de enrofloxacino, indicando que esta fluoroquinolona se puede usar vía intramuscular o subcutánea para el control de la colibacilosis en cerdos donde se ha diagnosticado *E. coli* adicional a la indicación previa para el tratamiento y control de la enfermedad respiratoria porcina. Haciendo énfasis en que los animales destinados a consumo humano no se deben sacrificar en los cinco días posteriores a la administración de una dosis de este antibiótico. Así como prohibir el uso en animales productores de alimentos ("AASV, 2015). El enrofloxacino y ciprofloxacino son ampliamente utilizados por tener efectos antibacteriales en enfermedades causadas por *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Cytophaga* en la acuicultura (Ministry of Agriculture, 2007). El uso de fluoroquinolonas en la producción acuícola se considera un factor importante que contribuye al aumento en la concentración y/o acumulación en áreas naturales y acuícolas (Gaudin et al., 2016). En este sector las quinolonas son utilizadas para preservar la producción animal, lo cual constituye una de las principales preocupaciones acerca de la seguridad de los alimentos de origen animal que son consumidos por humanos. Entre el año 1998 y 2002, el uso

de la flumequina, una fluoroquinolona usada exclusivamente en la acuicultura, mostró un aumento su consumo de 30 a 100 toneladas, el cuan es consistente con el incremento en la producción de salmón de 258 a 494 toneladas en este periodo (Fortt et al., 2007). Los peces de consumo humano que son criados por acuicultura generalmente resultan en la administración aumentada de antibióticos profilácticos. Los peces reciben antibióticos como componente de su alimento y en ocasiones, en cambios de medio o incluso inyecciones (Sørum, 2006). Pero los alimentos no consumidos y las heces de los peces, que contienen antibióticos, quedan suspendidas, disueltas o alcanzan el sedimento en el fondo de las jaulas. Los fármacos se filtran a través de corrientes subterráneas o muchas veces son lavados por corrientes a sitios distantes (Sørum, 2006; Boxall et al., 2004). Y ya en otros sitios, estos antibióticos pueden ser ingeridos por otros peces u organismos como los mariscos. Y en muchos casos estos fármacos permanecen en el sedimento alterando su composición provocando la resistencia bacteriana (Sørum, 2006; Balaban et al., 2004).

1.8 Ocurrencia

Tener el conocimiento de la ocurrencia de una amplia gama de quinolonas es importante para comprender sus riesgos ambientales. Factores importantes como la excreción humana y animal, las descargas de acuicultores, la eliminación de la industria farmacéutica, la disposición de los residuos domésticos y hospitalarios, que contienen producto, producto vencido y/o no aplicado son los principales responsables de la ocurrencia de fármacos en el ambiente (Kümmerer, 2009).

Recientemente se ha demostrado que incluso en pequeñas cantidades del orden de ng/L algunos de estos compuestos tienen la capacidad de ocasionar daño a la vida acuática (Nikolaou et al., 2007).

Las principales investigaciones sobre ocurrencia de quinolonas en ambientes acuáticos (agua potable, agua para abastecimiento público, afluente y efluente de plantas de tratamiento de aguas residuales, efluente hospitalario y efluente pecuario) han sido realizadas en Europa (Francia, España, Australia, Holanda, Suiza, Grecia, Italia y Suecia), Asia (China, Vietnam y Taiwán) y Estados Unidos. Las concentraciones de quinolonas que han sido reportadas en aguas residuales se encuentran en rangos van desde 1.3 a 2,292.0 ngL-1 para el caso de norfloxacino en China y ciprofloxacino en España, respectivamente. Así mismo, las concentraciones en aguas superficiales han sido reportadas en rangos que van desde 0.3 a 740 ngL-1 de enrofloxacino en China y ciprofloxacino en España, respectivamente, de acuerdo con lo mencionado mencionado en la Tabla 4 en donde se puede apreciar que el rango de concentraciones es variable entre ambientes y países.

Las fluoroquinolonas y tetraciclinas son considerablemente más estables en el ambiente en comparación con otros antibióticos, lo cual les permite persistir

por largos periodos, extenderse aún más y acumular mayores concentraciones que contaminan cuerpos de agua y suelos (Ingerslev et al., 2001).

Tabla 4. Ocurrencia de quinolonas en ambientes acuáticos.

País	Fármaco	Concentración (ng/L)	Efluente
España (provincias de Castellón y Valencia) (Gracia-Lor et al., 2011).	Ácido nalidíxico	14.0	Agua superficial
		60.0	Agua residual
	Ácido oxolínico	23.0	Agua superficial
	Ácido pipemídico	245.0	Agua superficial
		430.0	Agua residual
	Ciprofloxacino	740.0	Agua superficial
		2,292.0	Agua residual
	Enrofloxacino	70.0	Agua superficial
		220.0	Agua residual
	Flumequina	20.0	Agua superficial
		41.0	Agua residual
	Moxifloxacino	205.0	Agua superficial
		540.0	Agua residual
	Norfloxacino	21.0	Agua superficial
		310.0	Agua residual
	Ofloxacino	400.0	Agua superficial
		925.0	Agua residual
	Pefloxacino	64.0	Agua superficial
		112.0	Agua residual
	Sarafloxacino	55.0	Agua superficial
		52.0	Agua residual
Estados Unidos (Arkansas) (Massey et al., 2010)	Ciprofloxacino	5.0 – 116.0	Agua superficial
		17.0 – 94.0	
	Ofloxacino	84.0 – 182.0	
China (Lago Baiyangdian, Norte de China) (Li et al., 2012).	Ciprofloxacino	60.3	Agua superficial
	Enrofloxacino	4.4	
	Fleroxacino	6.3	
	Norfloxacino	156.0	
	Ofloxacino	32.6	Agua de grifo
	Sarafloxacino	28.2	
China (Macao)(Yiruh et al., 2010)	Ciprofloxacino	2.0 – 8.2	Agua de grifo
	Norfloxacino	7.0 – 17.1	
	Lomefloxacino	8.9 – 37.1	
	Enrofloxacino	2.8 – 5.2	
China (Guangzhou) (Yiruhan et al., 2010)	Ciprofloxacino	6.0 – 679.7	Agua de grifo
	Norfloxacino	82.7	
	Lomefloxacino	179.0	
	Enrofloxacino	8.3	
China (Chongqing) (Chang et al., 2010)	Ciprofloxacino	458.0 ± 78.0	Agua residual
	Lomefloxacino	143.0 ± 45.0	
	Norfloxacino	859.0 ± 186.0	
	Ofloxacino	780.0 ± 132.0	

España (Granada) (Dorival-García et al., 2013).	Ácido nalidíxico	200.0 – 500.0	Agua residual	China (Beijing) (Xu et al., 2015)	Ofloxacino	74.0 ± 9.0	Agua superficial
	Ácido oxolínico	300.0 – 600.0			Ofloxacino Enrofloxacino Ciprofloxacino Norfloxacino	3664.0	Influente
	Ácido piromídico	200.0 – 1100.0			Ofloxacino Enrofloxacino Ciprofloxacino Norfloxacino	3866.0	Efluente
	Ácido pipemídico	200.0 – 1,500.0		China (Shandong) (Hanna et al., 2018)	Enrofloxacino	0.3	Agua superficial
	Ciprofloxacino	200.0 – 2,000.0			Norfloxacino	0.4	
	Enoxacino	100.0 – 1,200.0			Ciprofloxacino	0.4	
	Moxifloxacino	200.0 – 2,500.0			Enrofloxacino	1.9	Agua residual
	Norfloxacino	200.0 – 1,600.0			Norfloxacino	1.3	
	Ofloxacino	200.0 – 1,700.0			Ciprofloxacino	4.4	Agua potable
China (Beijing) (Jia et al., 2012)	Ácido pipemídico	86.0 ± 17.0	Agua residual		Ciprofloxacino	21.4	
	Fleroxacino	14.0 ± 1.0					
	Ofloxacino	1,287.0 ± 97.0					
	Norfloxacino	775.0 ± 87.0					
	Ciprofloxacino	99.0 ± 21.0					
	Enrofloxacino	8.3 ± 3.2					
	Lomefloxacino	162.0 ± 4.0					
	Gatifloxacino	66.0 ± 7.0					
	Sparfloxacino	4.4 ± 0.3					
	Moxifloxacino	72.0 ± 34.0					

Elaboración propia

El consumo de medicamentos como los antibióticos que incluyen a las quinolonas está en constante aumento en muchos países, lo que resulta en su detección en aguas superficiales (López-Serna et al., 2013; Teijon et al., 2010; Fick et al., 2009; Standley et al., 2008;), alcantarillado municipal (Lindberg et al., 2010), sedimento (Pei et al., 2006) y lodo (Lindberg et al., 2010; Göbel et al., 2005) en todo el mundo. Al saber que las quinolonas forman parte de los antibióticos cabe mencionar que los tipos y concentraciones de antibióticos que se detectan en el medio ambiente varían por cada país y dentro de cada uno de ellos, dependiendo de diferentes patrones como el uso, parámetros ambientales, así como el comportamiento en el medio ambiente de diferentes antibiótico como la adsorción, biodegradación o fotodegradación (Li y Zhang, 2010; Kümmerer, 2009; Díaz-Cruz et al., 2003).

1.9 Destino ambiental de las Quinolonas

Las quinolonas se encuentran entre cinco clases de antibióticos (β-lactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas) frecuentemente detectadas en el ambiente, relativamente en altas concentraciones (Díaz-Cruz y Barceló, 2006). Su presencia se ha reportado en aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas e incluso en agua potable. Su amplio uso ha dado lugar al aumento en su ocurrencia y resistencia bacteriana a este tipo de antibióticos detectados en aguas residuales de hospitales, zonas de alimentación de ganado, efluentes, ríos y lodo de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (Barnes et al., 2008; Gros et al., 2007; Khetan y Collins 2007).

Las quinolonas tienen una tasa metabólica superior al 20%, lo cual las clasifica como de moderada metabolización. De esta manera, una vez que las quinolonas son administradas, estas pueden ser excretadas a la naturaleza por medio de la orina o de las heces. Esta clase de fármacos no son completamente degradados o removidos en las estaciones convencionales de tratamiento de agua y alcantarillado (Wang y Huang, 2010). Los efluentes con residuos de antibióticos pueden tener por destino receptores ambientales tales como ríos, lagos, estuarios e incluso aguas destinadas al abastecimiento público (Rodrigues-Silva et al., 2014). Principalmente la excreción animal y la aplicación de fármacos en la acuicultura son los medios mayoritarios de diseminación de las quinolonas en el medio ambiente acuático (Kemper, 2008).

En una investigación del consumo y destino de los antibióticos en China se concluyó que 92,700 toneladas de antibióticos fueron consumidas en el 2013 y el 46% fueron liberados a los ríos a través de afluentes cloacales y el resto a la tierra a través de la difusión de la tierra de abono y estiércol (Zhang et al., 2015).

1.10 Impacto ambiental

Las quinolonas presentan riesgos importantes para los humanos, los animales, el medio ambiente y el equilibrio en este. Habitualmente generan residuos que muestran alta persistencia y distribución en diferentes ambientes (agua, suelo aire) provocando que exista en muchos casos la acumulación de estos, el alojamiento en organismos para consumo y la presencia en alimentos. Uno de los riesgos más importantes debido a la presencia de quinolonas en ambientes acuáticos es la formación de resistencia bacteriana. Las bacterias expuestas a antibióticos como las quinolonas en el medio ambiente sufren modificaciones genéticas provocando resistencia (Bila y Dezotti, 2003). El aumento de la resistencia bacteriana hace necesario el uso de antibióticos cada vez más potentes y costosos en el tratamiento de enfermedades. Al utilizar la resistencia como referencia es posible determinar aquellos antibióticos que predominan en determinado efluente acuático. La resistencia a cierta quinolona es por tanto el reflejo de concentraciones

importantes en ambientes acuáticos. Pero no siempre es directa ya que los microorganismos pueden tener resistencias inherentes a diferentes medicamentos (Rhodes et al., 2000).

Otro factor importante que genera un impacto medioambiental es la disposición y acumulación continua, muchas veces permanente de las quinolonas en ambientes acuáticos como lagunas, lodos, sedimentos marinos e instalaciones de acuacultura. Esto aumenta la posibilidad de bioacumulación provocando un gran daño a la flora o a la fauna endémica. Así diferentes especies de peces silvestres pueden ser expuestos de manera involuntaria a estos fármacos, teniendo entonces la posibilidad de acumularse en ellos, generando un riesgo mayor debido a cadenas tróficas que en muchos casos provoca riesgo a humanos debido al consumo de organismos contaminados (Fortt Z et al., 2007).

La presencia de fármacos residuales en ambientes acuáticos puede presentar efectos adversos muy importantes en organismos que en estos habitan. El efecto negativo puede ser en cualquier nivel de jerarquía biológica: célula, órganos, organismo, población, ecosistema. Algunos de estos efectos pueden ser observados en concentraciones a partir del orden de ng/L (Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000). En la misma temática He et al., (2016) investigaron la exposición de quinolonas (norfloxacino, ciprofloxacino y enrofloxacino) en muestras de peces cultivados del río Perla Delta al sur de China, revelando que las quinolonas se distribuyeron principalmente en tejido entre 2.5 – 185.7 μg kg^{-1} de peso húmedo. Ellos concluyeron que los residuos de antibióticos en la acuicultura pueden estimular la propagación de genes de resistencia a los antibióticos en los microorganismos, así mismo las bacterias resistentes pueden transferirse a través de la cadena alimenticia.

Un trabajo realizado por Fortt Z et al., 2007 explica que peces como róbalo (*Scorpaena hystrio*), cabrilla (*Elginops maclovinus*) y trucha de vida libre (*Oncorhynchus mykiss*), cercanos a un recinto acuicultor y que son consumidos por humanos, son alimentados con preparado de salmón enriquecido con antibióticos u otros fármacos. Estos fármacos mostraron la capacidad de alojarse en el tejido de estos peces. Y se concluyó que se detectaron concentraciones de 2ppb y 4ppb de flumequina en cabrilla y róbalo, respectivamente, en el tejido de estos peces. Esto sugiere que el uso de fármacos en acuicultura tiene efectos ambientales que se proyectan más allá de los recintos de estas actividades.

Actualmente, la evaluación de riesgo ambiental debido a la contaminación por diferentes fármacos ha sido tema a revisar en varios países (Koschorreck et al., 2002). Por lo que gran cantidad de investigadores alrededor del mundo realizan metodologías en materia de ecotoxicología y modelos para evaluación de riesgo ambiental por diversos fármacos (Jørgensen y Halling-Sørensen, 2000) .

2 Conclusiones

La presencia de diversos farmacos, incluyendo a las quinolonas en ambientes acuáticos, es actualmente una preocupación debido a los impactos ambientales que estos generan. Por lo que investigadores alrededor del mundo han aportado conocimiento sobre este tema, para la identificación, detección y evaluación de riesgos de quinolonas en ambientes acuáticos derivado de su empleo en medicina humana, veterinaria, uso doméstico e industrial principalmente.

La literatura muestra evidencia de la presencia y efectos negativos de este tipo de fármacos en ambientes acuáticos, pero no es suficiente para conocer efectos específicos. Este es un tema importante para la generación de evidencia toxicológica sobre el tema de las quinolonas en el medio ambiente.

Es necesario llevar a cabo una evaluación exhaustiva de los efectos mediambientales negativos causados por quinolonas, para establecer límites de sensibilidad o detección. También es necesario llevar a cabo el monitoreo de la descarga de quinolonas por vías como la municipal, hospitalaria e industrial para sugerir métodos para el tratamiento, reducción y eliminación de la ocurrencia en efluentes y ambientes acuáticos.

Este tema es de gran importancia y se sugiere abordar más sobre él en materia de ocurrencia, detección y efectos tóxicos a manera de que en el futuro se promueva el monitoreo, tratamiento y procesos de eliminación adecuados para este grupo de antibióticos.

3. Referencias

AASV News archive - Baytril FDA Approved for Control of E. coli in Swine. (2015). Retrieved May 2, 2018, from https://www.aasv.org/news/story.php?id=7798

Advani, R. H., Hurwitz, H. I., Gordon, M. S., Ebbinghaus, S. W., Mendelson, D. S., Wakelee, H. A., … Adelman, D. C. (2010). Voreloxin, a first-in-class anticancer quinolone derivative, in relapsed/refractory solid tumors: A report on two dosing schedules. *Clinical Cancer Research*, *16*(7), 2167–2175. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2236

Albarellos, G. A., Kreil, V. E., and Landoni, M. F. (2004). Pharmacokinetics of ciproloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *27*(3), 155–162. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00573.x

Alós, J.-I. (2003). Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *21*(5), 261–268. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72932-2

Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5690), 1622–1625. https://doi.org/10.1126/science.1099390

Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., and Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of The Total Environment*, *402*(2–3), 192–200. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2008.04.028

Barrett, J. F., Gootz, T. D., McGuirk, P. R., Farrell, C. A., and Sokolowski, S. A. (1989). Use of in vitro topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *33*(10), 1697–1703. https://doi.org/10.1128/AAC.33.10.1697

Bila, D. M., and Dezotti, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. *Quimica Nova*, Vol. 26, pp. 523–530. https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015

Bolon, M. K. (2011). The Newer Fluoroquinolones. *Medical Clinics of North America*, *95*(4), 793–817. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.03.006

Boothe, D. M., Boeckh, A., Simpson, R. B., and Dubose, K. (2006). Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *20*(6), 1297–1306. https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[1297:COPAPI]2.0.CO;2

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Blackwell, P. A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E. J., and Croxford, A. (2004). *Veterinary Medicines in the Environment*. https://doi.org/10.1007/0-387-21729-0_1

Cartier, M. B., Scorneaux, B., Zenebergh, A., Desnottes, J. F., and Talkers, P. M. (1990). Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *26*, 27–39. https://doi.org/10.1093/jac/26.suppl_B.27

Chang, X., Meyer, M. T., Liu, X., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J. an, … Shu, W. (2010). Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution*, *158*(5), 1444–1450.

https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.034

Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z., and Yuan, Z. (2013). Antibacterial action of quinolones: From target to network. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 66, pp. 555–562. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.057

Chin, N. X., and Neu, H. C. (1984). Ciprofloxacin, a quinolone carboxylic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *25*(3), 319–326. https://doi.org/10.1128/AAC.25.3.319

Chu, D. T. W., and Fernandes, P. B. (1989). Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *33*(2), 131–135. https://doi.org/10.1128/AAC.33.2.131

Daelemans, D., Vandamme, A. M., and De Clercq, E. (1999). Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, *10*(1), 1-14. https://doi.org/10.1177/095632029901000101

Díaz-Cruz, M. S., and Barceló, D. (2006, October 4). Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 386, pp. 973–985. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z

Díaz-Cruz, M. S., López De Alda, M. J., and Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *22*(6), 340–351. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4

Domagala, J M. (1994). Structure-activity and structure-side effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *33*(4), 685–706.

Domagala, John M, Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., and Solomon, M. (1986). New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *Journal of Medicinal Chemistry*, *29*(3), 394–404.

Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Cantarero, S., Navalón, A., and Vílchez, J. L. (2013). Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, *106*, 323–

333. https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.09.002

Drlica, K., and Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *61*(3), 377–392. https://doi.org/D - NLM: PMC232616 EDAT- 1997/09/18 MHDA- 1997/09/18 00:01 CRDT- 1997/09/18 00:00 PST - ppublish

European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union ESAC-Net surveillance data November 2017. Retrieved from https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final_2017_EAAD_ESAC-Net_Summary-edited - FINALwith erratum.pdf

FDA. (2012). Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Office of Surveillance and Epidemiology, Drug Use Review. Retrieved from Report No. 2012-544 website: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/UCM319435.pdf

Fernando, G. J., and Michael, R. M. (2016). Determinación de fluoroquinolonas en tejido animal mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. *Revista Científica Ecuatoriana*, *2*(2).

Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., and Larsson, D. G. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*(12), 2522–2527. https://doi.org/10.1897/09-073.1

Fortt Z, A., Cabello C, F., and Buschmann R, A. (2007). Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, *24*(1), 14–18. https://doi.org/10.4067/S0716-10182007000100002

Gaudin, V., Hedou, C., Soumet, C., and Verdon, E. (2016). Evaluation and validation of a multi-residue method based on biochip technology for the simultaneous screening of six families of antibiotics in muscle and aquaculture products. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *33*(3), 403–419. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1125529

Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C. S., Alder, A. C., Giger, W., Theiß, N., … Ternes, T. A. (2005). Extraction and determination of sulfonamides, macrolides,

and trimethoprim in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, *1085*(2), 179–189. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.051

Golet, E. M., Alder, A. C., and Giger, W. (2002). Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology*, *36*(17), 3645–3651. https://doi.org/10.1021/es0256212

Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., and Hernández, F. (2011). Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1218*(16), 2264–2275. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.026

Gros, M., Petrović, M., and Barceló, D. (2007). Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the ebro river basin (northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *26*(8), 1553–1562. https://doi.org/10.1897/06-495R.1

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., and Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere*, *36*(2), 357–393. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8

Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., … Stålsby Lundborg, C. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, *114*(July 2017), 131–142. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003

He, X., Deng, M., Wang, Q., Yang, Y., Yang, Y., and Nie, X. (2016). Residues and health risk assessment of quinolones and sulfonamides in cultured fish from Pearl River Delta, China. *Aquaculture*, *458*, 38–46. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.006

Home | United Nations. (n.d.). Retrieved April 24, 2018, from http://www.un.org/en/index.html

Hooper, David C., Wolfson, J. S. (1989). Mode of Action of the Quinolone Antimicrobial Agents : Review of Recent Information. *Reviews of Infectious Diseases*, *11*(5), 902–911.

Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on

Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(Supplement 1), S9–S15. https://doi.org/10.1086/319370

Hooper, David C, and Wolfson, J. S. (1989). Fluoroquinolone Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *2*(4), 378–424. Retrieved from http://cmr.asm.org/

Ingerslev, F., Toräng, L., Loke, M. L., Halling-Sorensen, B., and Nyholm, N. (2001). Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. *Chemosphere*, *44*(4), 865–872. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00479-3

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). Banco de Información Económica (BIE). Retrieved July 2, 2018, from Instituto Nacional de Estadística y Geografía website: http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/default.aspx?idserPadre=104001000142011000400020#D104001000142011000400020

Jackson, L. C., Machado, L. A., and Hamilton, M. L. (1998). Quinolonas y terapia antimicrobiana. *ACTA Médica*, *8*(1), 58–65.

Jia, A., Wan, Y., Xiao, Y., and Hu, J. (2012). Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, *46*(2), 387–394. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.055

Jørgensen, S. E., and Halling-Sørensen, B. (2000). Drugs in the environment. In *Chemosphere* (Vol. 40). Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001908662

Kampranis, S. C., and Maxwell, A. (1998). The DNA Gyrase-Quinolone Complex ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. In *The journal of biological chemistry* (Vol. 273). Retrieved from http://www.jbc.org/

Kemper, N. (2008, January 1). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, Vol. 8, pp. 1–13. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002

Khetan, S. K., and Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemisty. *Chemical Reviews*, Vol. 107, pp. 2319–2364. https://doi.org/10.1021/cr020441w

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., … Bolton, E. E. (2019). *PubChem 2019 update : improved access to chemical data*. *47*(October 2018), 1102–1109. https://doi.org/10.1093/nar/gky1033

Kocsis, B., Domokos, J., and Szabo, D. (2016). Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *15*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s12941-016-0150-4

Koschorreck, J., Koch, C., and Rönnefahrt, I. (2002). Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU - A regulatory perspective. *Toxicology Letters*, *131*(1–2), 117–124. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00047-4

Kumar, D. V., Rai, R., Brameld, K. A., Riggs, J., Somoza, J. R., Rajagopalan, R., … Green, M. J. (2012). 3-Heterocyclyl quinolone inhibitors of the HCV NS5B polymerase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *22*(1), 300–304. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.013

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*, *75*(4), 417–434. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086

Lesher, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R. P. (1962). Communication t o the e d i t o r. *Juornal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. https://doi.org/10.1021/jm01240a021

Leyva-Ramos, Socorro; Hernández-López, H. (2017). Fluoroquinolonas: perspectivas no antibacterianas. *Rev Esp Quimioter*, *30*(1), 01–08. Retrieved from http://www.seq.es/seq/0214-3429/30/1/leyva15dec2016.pdf

Li, B., and Zhang, T. (2010). Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environmental Science and Technology*, *44*(9), 3468–3473. https://doi.org/10.1021/es903490h

Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., and Cai, Y. (2012). Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, *89*(11), 1307–1315. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.079

Lindberg, R. H., Fick, J., and Tysklind, M. (2010). Screening of antimycotics in Swedish sewage treatment plants - Waters and sludge. *Water Research*, *44*(2), 649–657. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.034

López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M., and Barceló, D. (2013). Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in

urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain. *Environmental Pollution*, *174*, 305–315. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.022

Maddison, J. E., Page, S. W., and Church, D. B. (2008). *Small animal clinical pharmacology*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2858-8.X5001-5

Massey, L. B., Haggard, B. E., Galloway, J. M., Loftin, K. A., Meyer, M. T., and Green, W. R. (2010). Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. *Ecological Engineering*, *36*(7), 930–938. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.04.009

Matsumoto, J., and Minami, S. (1975). Pyrido[2,3-d]pyrimidine Antibacterial Agents. 3 .I 8-Alkyl- and 8-Vinyl-5,8-dihydro-5-oxo-2-(l-piperazinyl)pyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carboxylic Acids and Their Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, *18*(1), 74–79.

Ministry of Agriculture. (2007). Specifications for the Application of Norfloxacin and Enrofloxacin in Aquaculture, Beijing, China.

Morrow, B. J., He, W., Amsler, K. M., Foleno, B. D., Macielag, M. J., Lynch, A. S., and Bush, K. (2010). In Vitro antibacterial activities of JNJ-Q2, a new broad-spectrum fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(5), 1955–1964. https://doi.org/10.1128/AAC.01374-09

Mouton, Y., and Leroy, O. (1991). Ofloxacin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *1*(2), 57–74.

Neuman, M. (1988). Clinical Pharmacokinetics of the Newer Antibacterial 4-Quinolones. *Clinical Pharmacokinetics*, *14*(2), 96–121. https://doi.org/10.2165/00003088-198814020-00003

Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W., and Yang, Y. (2009). Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga Scenedesmus obliquus. *Ecotoxicology*, *18*(6), 677–684. https://doi.org/10.1007/s10646-009-0334-1

Nikolaou, A., Meric, S., and Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *387*(4), 1225–1234. https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8

Pallo-Zimmerman, L. M., Byron, J. K., and Graves, T. K. (2010). Fluoroquinolones: then and now. *Compendium (Yardley, PA)*, *32*(July), E1-9; quiz E9. Retrieved

from https://pdfs.semanticscholar.org/717a/a5221dd949c92d3d7677d95f1f6cad42990b.pdf

Papich, M. G. (2016). Gabapentin. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (pp. 349–350). https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00016-4

Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., and Pruden, A. (2006). Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, *40*(12), 2427–2435. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017

Public Healt England publications gateway number 2017491. (2017). English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR), report 2017. Retrieved from https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/656611/ESPAUR_report_2017.pdf

Public Health Agency Canada. (2017). *Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System 2017 Report*.

ResistanceMap - Antibiotic Use. (n.d.). Retrieved April 16, 2018, from https://resistancemap.cddep.org/AntibioticUse.php

Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P., and Pickup, R. W. (2000). Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant tet A. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3883–3890. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966404%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC92234

Richter, S. N., Gatto, B., Tabarrini, O., Fravolini, A., and Palumbo, M. (2005). Antiviral 6-amino-quinolones: Molecular basis for potency and selectivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *15*(19), 4247–4251. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.06.074

Robinson, A. A., Belden, J. B., and Lydy, M. J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *24*(2), 423–430. https://doi.org/10.1897/04-210R.1

Rodrigues-Silva, C., Maniero, M. G., Peres, M. S., and Guimarães, J. R. (2014). Ocorrencia y degradación de quinolonas por procesos oxidativos avanzados.

Quimica Nova, Vol. 37, pp. 868–885. https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140139

Santos, J. L., Aparicio, I., Callejón, M., and Alonso, E. (2009). Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, *164*(2–3), 1509–1516. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.073

Sørum, H. (2006). *Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens*. 213–238. https://doi.org/10.1128/9781555817534.CH13

Standley, L. J., Rudel, R. A., Swartz, C. H., Attfield, K. R., Christian, J., Erickson, M., and Brody, J. G. (2008). Wastewater-contaminated grounwater as a soure of endogenous hormones and pharmaceuticals to surface water ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(12), 2457–2468. https://doi.org/10.1897%2F07-604.1

Stein, G. E. (1988). The 4-Quinolone Antibiotics: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *8*(6), 301–314. https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1988.tb04088.x

Štěpanova, S., Plhalová, L., Doleželov, P., Prokeš, M., Maršálek, P., Škorič, M., and Svobodová, Z. (2012). The effects of subchronic exposure to terbuthylazine on early developmental stages of common carp. *The Scientific World Journal*, *2012*(SUPPL. 2), 25638368–351014. https://doi.org/10.1100/2012/615920

Stevens, M., Pollicita, M., Pannecouque, C., Verbeken, E., Tabarrini, O., Cecchetti, V., … Balzarini, J. (2007). Novel in vivo model for the study of human immunodeficiency virus type 1 transcription inhibitors: Evaluation of new 6-desfluoroquinolone derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(4), 1407–1413. https://doi.org/10.1128/AAC.01251-06

Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., and Rozo-Núñez, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum*, *19*(1), 11–28. https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci

Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., and Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*, *408*(17), 3584–3595. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.041

Topcu, Z. (2001, December 31). DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Vol. 26, pp. 405–416. https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2001.00368.x

Vance-Bryan, K., Guay, D. R. P., and Rotschafer, J. C. (1990). Clinical Pharmacokinetics of Ciprofloxacin. *Clinical Pharmacokinetics*, *19*(6), 434–461. https://doi.org/10.2165/00003088-199019060-00003

Wang, P., He, Y. L., and Huang, C. H. (2010). Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. *Water Research*, *44*(20), 5989–5998. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.053

Wentland, M. P., Lesher, G. Y., Reuman, M., Pilling, G. M., Saindane, M. T., Perni, R. B., … Coughlin, S. A. (1993). Relationship of structure of bridged (2,6-dimethyl-4-pyridinyl)quinolones to mammalian topoisomerase II inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *3*(8), 1711–1716. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80048-7

Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(4), 585–586. https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585

World Health Organization. (2013). Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013. Retrieved from https://www.whocc.no/filearchive/publications/1_2013guidelines.pdf

Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., … Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, *119*, 1379–1385. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040

Yiruhan, Wang, Q. J., Mo, C. H., Li, Y. W., Gao, P., Tai, Y. P., … Xu, J. W. (2010, July 1). Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environmental Pollution*, Vol. 158, pp. 2350–2358. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.019

Yu, Z., Shi, G., Sun, Q., Jin, H., Teng, Y., Tao, K., … Hou, T. (2009). Design, synthesis and in vitro antibacterial/antifungal evaluation of novel 1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7(1-piperazinyl)quinoline-3-carboxylic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(11), 4726–4733. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.028

Zhang, Q. Q., Ying, G. G., Pan, C. G., Liu, Y. S., and Zhao, J. L. (2015). A comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environmental Science and Technology*, *49*(11), 6772–6782. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00729

Zhao, H., Quan, W., Bekele, T. G., Chen, M., Zhang, X., and Qu, B. (2018). Effect of copper on the accumulation and elimination kinetics of fluoroquinolones in the zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *156*(March), 135–140. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.025

Capítulo 19

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL BIODIÉSEL EN RENACUAJOS DE RANA TORO *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)

Claudia Verónica De La Cruz Moreno[1*]

Guadalupe Barrera Escorcia[2]

Patricia Ramírez Romero [2]

Xenia Mena Espino[3]

Héctor Barrera Villa Zevallos[4]

[1] Posgrado en Energía y Medio Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[2] Depto. de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[3] Depto. Ingeniería en Procesos e Hidraúlica Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

[4] Universidad Anahuac.

* veronik.delacruzm@gmail.com

Resumen

Los combustibles generan contaminación, por ello se impulsa el uso de biocombustibles como el biodiésel y sus mezclas, que se consideran menos tóxicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la toxicidad del diésel, el biodiésel (B100) y una mezcla (B20) en renacuajos de rana toro *Lithobates catesbeianus*. Se realizaron dos pruebas (aguda y subletal), ambas de 96 h con un mes de recuperación. Las concentraciones de la prueba aguda fueron de 0.06 a 1.00% de la fracción soluble de cada combustible. No se alcanzó el 50% de mortandad a las 96 h, sin embargo, hubo mortalidad en la fase de recuperación. En la prueba subletal se determinaron: consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y estrés metabólico los días uno, dos, cuatro (fase de exposición), 15 y 30 (fase de recuperación). El día dos los combustibles incrementaron la excreción nitrogenada y disminuyeron la relación O:N de los renacuajos, lo que significa un importante estrés metabólico. Sin embargo, el día 15 el estrés fue menor. Se concluye que el daño generado por los tres combustibles se presenta en el periodo de exposición, así como posteriormente, aunque se observa cierta recuperación. Los efectos fueron menores con el biodiesel y la mezcla, en comparación con el diésel. Además, se corroboró que las evaluaciones inmediatas no son suficientes para evaluar los daños generados por estos combustibles, por lo que, en caso de un derrame, es necesario llevar a cabo evaluaciones a mediano plazo para tener un panorama completo.

Palabras clave: Toxicidad, diésel, biodiésel, *Lithobates catesbeianus.*

Introducción

Durante años, los ecosistemas naturales han sido expuestos a diversos compuestos que se introducen al ambiente como consecuencia de fugas y derrames de los desechos de algunas industrias. En el caso de la industria petrolera, es importante señalar que la magnitud del riesgo ecológico y la toxicidad de los combustibles dependen de su solubilidad en el agua. Las fases solubles de los hidrocarburos con baja densidad forman capas gruesas en la parte superior de los cuerpos de agua, mismas que cubren el cuerpo de los organismos y pueden causarles la muerte (WHO, 1996).

El diésel, al considerarse un combustible fósil derivado del petróleo crudo, se estima como uno de los principales causantes del calentamiento atmosférico y del cambio climático global por la emisión de CO_2 y otros gases de efecto invernadero., debido a que los componentes fundamentales de este combustible son las parafinas, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, por sus siglas en inglés), y además pueden contener compuestos metálicos con azufre o nitrógeno, mismas sustancias que son consideradas dañinas para la salud.

Desde 1970 se han utilizado como alternativa biocombustibles como el biodiésel, un compuesto de monoalquil-ésteres de ácidos grasos de cadena larga, derivados de aceites vegetales o grasas animales, llamado B100. Un monoalquil-éster es el producto de una reacción entre un alcohol (etanol o metanol) de cadena lineal y una grasa animal o aceite vegetal (triglicérido), para formar glicerol y ésteres de ácidos grasos de cadena larga (Van Gerpen, 2004). Algunos estudios han demostrado que el biodiésel se degrada en menos tiempo que el diésel (Pasqualino *et al.*, 2006; Prince *et al.*, 2008) y produce menos gases de efecto invernadero (Lee *et al.*, 2004; Balat & Balat, 2010). Además, se debe mencionar que el primero se utiliza para formular diversas mezclas con diésel que también se usan como combustibles, de las cuales la más utilizada es la B20 (constituida por 20% de biodiésel y 80% de diésel). Esta combinación se emplea en automotores (sin necesidad de cambiar la estructura mecánica de los vehículos) y se considera menos tóxica que el diésel. Cabe mencionar que existen pocos estudios que evalúan los efectos tóxicos de dichos biocombustibles sobre los ecosistemas (Khan *et al.*, 2007), por lo que se desconoce el riesgo ecológico potencial que se puede atribuir a la liberación de estos en el ambiente.

Se han implementado bioensayos para evaluar el daño que provocan sobre los organismos los tóxicos vertidos en el ambiente. Para calcular esos efectos, los ensayos pueden ser de dos tipos: letales, o agudos, y subletales o crónicos. Con estas pruebas se analizan las secuelas que uno o más contaminantes (sean sustancias químicas conocidas o muestras ambientales de composición incierta) generan a los organismos como consecuencia de la exposición, durante un periodo determinado. Dichos efectos incluyen cambios fisiológicos o morfológicos en los

organismos evaluados, por mencionar algunos. Para realizar estos ensayos se utilizan organismos que se consideran bioindicadores, es decir, especies o grupos taxonómicos capaces de reflejar el estado de conservación del medio donde viven (Blaustein, 1994; Blaustein & Wake, 1995).

Los anfibios se consideran organismos bioindicadores importantes, pues durante muchos años se han considerado como una de las clases de vertebrados más susceptible a la contaminación química (Sima-Álvarez, *et al.*, 2001). Cuando las comunidades de anfibios presentan cambios poblacionales (escasez o abundancia de individuos), es posible sospechar de la presencia de xenobióticos en el ambiente (Rueda-Almonacid, 2000). El potencial de estos animales como bioindicadores se debe a su doble ciclo vital, puesto que durante sus primeras fases de desarrollo presentan una vida acuática, esto es, desde que se colocan como huevos, hasta las etapas de larvas y renacuajos, y son capaces de vivir en el ambiente terrestre en la etapa adulta (ranas).

Durante el estadio temprano de desarrollo de los renacuajos, hay una transformación de sus órganos notable en sus sistemas, digestivo, respiratorio y circulatorio. En consecuencia, estos organismos son más susceptibles a los efectos de la contaminación química en esta etapa, puesto que dichos órganos, como ocurre con las branquias, quedan expuestos y se absorben y acumulan con facilidad productos tóxicos disueltos en el agua. Estos órganos además sirven para el intercambio gaseoso; es por ello que estos individuos no pueden eludir el contacto directo con los contaminantes presentes en su hábitat (Berrill *et al.,* 1994; Marco, 2002). Cabe mencionar que en la fase de metamorfosis sucede lo mismo, ya que la piel complementa el intercambio gaseoso que estos organismos necesitan para subsistir, pues sus pulmones que se desarrollan son primitivos, por lo que son ineficaces para la respiración.

Los animales en etapa larvaria suelen ser más sensibles a la contaminación del agua que los embriones (Berrill *et al.,* 1994; Marco, 2002). Esto se debe a que la matriz gelatinosa que envuelve los huevos de la mayoría de los anfibios, protege a los embriones de diferentes amenazas naturales (Waldman & Ryan, 1983; Ward & Sexton, 1981; Marco & Blastein, 1998). Dicha barrera es capaz de evitar la entrada de contaminantes a la membrana perivitelina. En contraste, hay evidencias de la alta sensibilidad de las larvas de anfibios a factores que deterioran la calidad del agua, ya sea por su contenido de sustancias químicas contaminantes, como por la acidificación o la eutrofización (Freda, 1986; Pierce, 1985). En la etapa adulta, la absorción de contaminantes ocurre sobre todo por ingestión de alimento contaminado. De esta manera, las sustancias tóxicas se acumulan en diversos órganos y tejidos de los anfibios (Canton & Slooff, 1982; Hall, 1990; Hall & Kolbe, 1980; Nebeker *et al.,* 1995). Cabe mencionar que estas sustancias pueden tener diferentes efectos en los organismos, que van desde alteraciones funcionales,

conductuales o del desarrollo, hasta trastornos de la pigmentación, e incluso malformaciones (Bantle *et al.*, 1991; Devillers & Exbrayat, 1992; Ouellet, 2001).

En ocasiones, los daños que ocurren a causa de la exposición a diversos xenobióticos no son apreciables a simple vista. Por esta razón se emplean biomarcadores, que son herramientas útiles en los estudios de evaluación de riesgo toxicológico, debido a su capacidad para estimar el daño temprano y su bajo costo (Gold-Bouchot & Zapata-Pérez, 2004). Estos se evalúan a través de cambios fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, histopatológicos y de comportamiento en diferentes especies. (US NRC, 1989).

La valoración se puede realizar en diferentes niveles de organización (Gold-Bouchot & Zapata-Pérez, 2004), que van desde la célula hasta los ecosistemas. Esto permite obtener una visión holística de los efectos de tóxicos. El estrés metabólico es un biomarcador de efecto a nivel fisiológico; se mide a través de la razón que hay entre el consumo de oxígeno y la generación de productos nitrogenados (O:N) y proporciona información sobre la energía que gasta el organismo en relación al sustrato que consume (Mayzaud & Conover, 1988).

Por lo antes mencionado es evidente que, si bien existen estudios sobre los daños toxicológicos del diésel, es importante resaltar que los ensayos que se enfocan en la toxicidad de los biocombustibles, como el biodiésel y sus mezclas, son escasos (Khan *et al.*, 2007) y por lo tanto no se conoce el posible riesgo ecológico que implica su presencia en el ambiente. El uso frecuente del biodiésel en automotores aumenta la posibilidad de que haya derrames accidentales, por lo tanto, es necesario realizar estudios para determinar el riesgo que estos representan para los organismos acuáticos. Es por ello que en este trabajo se evaluó y comparó la toxicidad de la fracción soluble del diésel, el biodiésel (B100) y la mezcla (B20), en renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* (Shaw, 1802).

2. Materiales y métodos

La toxicidad de los combustibles se evaluó en dos bioensayos; el primero incluyó la evaluación de la toxicidad aguda y el segundo los efectos subletales. Ambos ensayos contaron con dos fases: la de exposición (de 96h) y la de depuración (de un mes).

Se colectaron renacuajos de *L. catesbeianus* en los estadios XX a XXV de desarrollo según Gosner (Gosner, 1960). Los organismos se eligieron de un estanque de la granja de la comunidad de San Lorenzo, ubicada en Ciudad Hidalgo en el estado de Michoacán.

La colecta se realizó por medio de pequeñas redes en los meses de abril y julio de 2015; estos organismos provinieron de un solo desove (tuvieron tallas semejantes de 1.5 a 3 cm de longitud). Se registraron *in situ* el oxígeno disuelto (con un oxímetro YSI54A ± 0.05 mg/L), la temperatura (con termómetro de cubeta ± 0.5°C) y el pH (con un potenciómetro Hanna modelo HI981 ± 0.05 unidades). Además, se tomó una muestra de agua de la granja (en un recipiente de plástico de 250 mL), misma a la que posteriormente se le midió la dureza (mg/L de $CaCO_3$) con el método de titulación con adición de EDTA. Ésta se determinó a partir de 25 mL de una muestra en la cual se agregó 1 mL de solución buffer de dureza (Hardness1) y una almohadilla indicadora de dureza (Man ver 2). Mediante agitación se introdujo el titulador digital para liberar EDTA y se multiplicó la cantidad que se requirió para ocasionar un viraje (Man ver 2) a color azul por el factor de corrección en función del número de cartucho utilizado (factor de corrección 0.4) (Contreras, 1984; Goetz& Smith, 1959)

Los renacuajos y la muestra de agua se trasladaron al laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM - I). Es importante mencionar que los organismos se transportaron en una hielera con agua del estanque de donde se extrajeron, en la que permanecieron durante dos días (se les colocó aireación por medio de bombas y una temperatura de 23 ± 2°C).

Para la instalación de las peceras en el laboratorio se utilizó agua limpia que se transportó desde la granja. Por otro lado, se preparó agua semidura (120 L) que permaneció en aireación. En esta se ajustaron el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto para que fuera similar al agua del sitio de colecta. Después de dos días se mezcló con el agua de la granja y se llenaron cuatro peceras de 35 L acondicionadas con un filtro de carbón y bombas de aireación, en las cuales se colocaron los organismos durante el periodo de mantenimiento. La temperatura del agua en este periodo fue de 18 a 21 °C, el pH de 7.5 a 8.3 y el oxígeno disuelto de 5.0 a 6.0 mg/L. La dureza se mantuvo de 60 a 100 mg/L. Los organismos se revisaron antes de colocarlos en las peceras, para evitar incluir animales muertos o en mal estado.

2.1 Mantenimiento de los organismos en el laboratorio

Para evitar eventos de canibalismo se tomó en cuenta el tamaño de los animales; es decir, renacuajos de un centímetro de longitud o menos se ubicaron en tanques diferentes a los de los animales con una talla mayor. La permanencia de estos especímenes fue de 15 a 30 días antes de exponerlos a los contaminantes.

El registro de los parámetros fisicoquímicos y la limpieza de las peceras se realizaron diariamente. Cada tercer día se llevó a cabo un recambio parcial de agua (10 L). En la primera colecta (abril), se introdujeron entre 30 y 50 organismos en cada

pecera y en la segunda (junio) 35 por acuario; estos dispositivos se instalaron en un lugar cerrado para evitar fluctuaciones de temperatura y facilitar el mantenimiento de las condiciones óptimas, como lo estipula la bibliografía (Xipe, 2013)

Los organismos se alimentaron por cámara con 0.045 g de hojuela molida para peces tropicales (pellet de camarón con vitaminas) cada tercer día, para ello se detenía el funcionamiento de las bombas de aireación y los filtros. Después de tres horas de la administración del alimento se realizaba la limpieza de las peceras y se colocaba de nuevo el equipo para el mantenimiento de los organismos (las bombas de aireación y los filtros).

2.2 Obtención de la fracción soluble de los combustibles

El agua que se utilizó para obtener la fracción soluble (FS) de los contaminantes fue semidura (con 60 a 100 mg/L de $CaCO_3$) y fue la misma que se usó para el mantenimiento de los organismos y para las pruebas de la toxicidad aguda y la subletal.

Los contaminantes que se utilizaron en este estudio fueron diésel, biodiésel (B100) y mezcla (B20); el primero se adquirió en una gasolinera de PEMEX y el segundo fue donado por la empresa SOLBEN® (generado a partir de aceites vegetales reciclados mediante el método "*Batchprocessing*") (Van Gerpen, 2004). La mezcla B20 se produjo de la combinación de los combustibles que se mencionaron con anterioridad, en una proporción de 80% diésel y 20% biodiesel. Por último, las fracciones solubles de cada uno de los contaminantes se obtuvieron mediante el método de Anderson *et al.* (1974). Se colocaron proporciones 1:4 v/v, de combustible y de agua, que se agitaron durante 24 h, posteriormente se decantó y recuperó la fase acuosa para las pruebas (100% de dilución).

2.3 Métodos utilizados en las fases experimentales

Durante las dos fases experimentales (aguda y subletal) de este trabajo se registraron diariamente las variaciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto en los acuarios de mantenimiento y en los dispositivos experimentales. El oxígeno disuelto se registró con un oxímetro YSI54A, la temperatura con termómetro de cubeta y el pH con un potenciómetro Hanna modelo HI981.

Ambos bioensayos se llevaron a cabo en agua dulce semidura (60-100 mg/L de $CaCO_3$), a una temperatura de 22 ± 2°C, condiciones similares a las de las piletas de la granja de San Lorenzo (lugar de colecta). La duración del periodo experimental fue de 96 h, en ambas fases. Se llevaron a cabo recambios parciales de la mitad del

volumen de agua de los dispositivos cada 48 h, tanto en la fase de exposición, como en la de recuperación. Los recambios se llevaron a cabo con el fin de mantener una calidad adecuada del agua e impedir la acumulación de desechos de los animales. En cada recambio se colocó la concentración de los contaminantes para mantener constantes las condiciones de exposición en los dispositivos. Al final del ensayo se registraron los parámetros morfométricos en los animales (longitud, peso y anchura) con una regla y una balanza digital *(Ohaus Analytical Plus).*

2.4 Evaluación de la toxicidad aguda

2.4.1 Fase de exposición aguda

Se utilizó un sistema semi-estático de 48 cámaras experimentales con capacidad de 1920 mL, en las cuales se colocaron las fracciones solubles (FS) de cada contaminante. Se incrementaron las concentraciones de forma geométrica (Diechman & Mergara, 1948), utilizando las siguientes: 0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.00% de las FS de cada combustible, cada una de las cuales incluyó tres réplicas.

En cada cámara se colocaron cinco organismos. Estos dispositivos se hicieron por triplicado, exponiendo así 15 individuos en cada una de las cinco concentraciones. para sumar 75 organismos por combustible. Dado que se evaluaron tres combustibles, se expusieron a éstos 225 organismos. Adicionalmente, se colocaron tres cámaras con cinco animales cada una como control (15 organismos). Así, este ensayo utilizó un total de 240 animales. Las observaciones realizadas durante esta prueba se registraron a los 60 minutos, después a las tres, seis, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Después de las 96 h se dio por concluida esta fase y se determinó la $CL_{50\text{-}96h}$ de los organismos expuestos con el método Probit, usando el programa EPA *Probit Analysis program* version 1.5 .

Los parámetros fisicoquímicos de los dispositivos experimentales se midieron y evaluaron a diario.

2.4.2 Fase de depuración en la prueba aguda

Al finalizar la fase de exposición, y después de cinco días de observación, se decidió colocar a todos los animales expuestos a un tipo de contaminante en peceras de 35 L con agua limpia. Esta etapa duró 31 días y se registró la muerte de los organismos diariamente. A partir de los resultados obtenidos en la prueba aguda, se seleccionaron las concentraciones para el ensayo de subletalidad, como se describe más adelante. Al final de este lapso se sacrificaron cinco renacuajos para la estandarización de la técnica de estrés metabólico.

2.5 Evaluación de la toxicidad subletal

2.5.1 Fase de exposición subletal

Este ensayo también fue semi-estático. Se utilizaron dos concentraciones de exposición por combustible (Diesel, biodiesel y mezcla B20). Se colocaron 12 organismos por dispositivo por triplicado (36 renacuajos por concentración). Además, se colocaron tres dispositivos control, cada uno con 10 organismos. Así, se contó con 21 cámaras experimentales de 3780 mL cada una. Se utilizaron 246 organismos en total. Esta fase también duró 96 h; el análisis del estrés metabólico se realizó en cinco de los organismos en los días uno, dos y cuatro. Este procedimiento se describe más adelante. Los animales no fueron alimentados en esta etapa.

2.5.2 Fase de depuración en prueba subletal

Durante este periodo, los organismos permanecieron en las mismas cámaras, con agua limpia. En esta fase los renacuajos persistieron durante un mes, lapso en el que los animales fueron alimentados diariamente. El análisis del biomarcador (estrés metabólico) se realizó con cinco organismos los días 15 y 30 (tabla 1).

Tabla 1. Número de organismos (renacuajos de rana toro *L. catesbeianus)* en los que se evaluó el estrés metabólico

	Por contaminante	C	FSD		FSB		FSM	
		n = 30	n = 72		n = 72		n = 72	
Días de evaluación	Por concentración		0.06%	0.12%	0.06%	0.12%	0.06%	0.12%
		30	36	36	36	36	36	36
1		5	5	5	5	5	5	5
2	Para la evaluación de estrés metabólico	5	5	5	5	5	5	5
4		5	5	5	5	5	5	5
15		5	5	5	5	5	5	5
30		5	5	5	5	5	5	5

n = número de organismos utilizados; C = controles; FSD = fracción soluble de diésel; FSB = fracción soluble del biodiesel; FSM = fracción soluble de la mezcla.

2.6 Estrés metabólico a través de la relación O:N

Para determinar la razón O:N con base en la técnica propuesta por Maizaud y Connover (1988), modificada por Barrera-Escorcia (2006), se requiere medir el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada. Para ello se utilizaron cámaras herméticas de 270 mL con agua semidura previamente preparada como se mencionó con anterioridad, y en cada una se colocó un organismo. Estos se seleccionaron al azar desde los dispositivos experimentales, para colocarlos en las cámaras y registrar los parámetros que se detallan a continuación.

Se registró el oxígeno disuelto en las cámaras, las cuales se cerraron durante seis horas, evitando la presencia de burbujas de aire. Este se registró también al término de la prueba para calcular el consumo de este gas (en mg/h* gPS); éste se midió con un oxímetro YSI54A (± 0.05 mg/L).

Para determinar la excreción nitrogenada, se midió el nitrógeno amoniacal al inicio y al término de la prueba con un espectrofotómetro HACH. Este parámetro se cuantificó por medio del método Nessler, para lo cual se colocó 25 mL de la muestra en una probeta de 50 mL, se agregaron 3 gotas de estabilizador mineral, 3 gotas de alcohol polivínilico, y un mililitro de reactivo Nessler y se dio lectura con el programa 7 con una longitud de onda de 490 nm. (APHA, 1992; Contreras, 1984).La producción se estableció también en el periodo de seis horas (en mg/h* gPS).

Al término de la prueba se obtuvieron los datos morfométricos (longitud, anchura y peso) de los individuos. Posteriormente, estos renacuajos se sometieron a la técnica de adormecimiento a baja temperatura durante dos horas, y después se sacrificaron con una herramienta punzocortante. El tejido de estos animales se colocó en un crisol que fue pesado con anticipación y en la estufa (Felisa Mod. 131) a 60°C durante 48 h. Una vez generado un peso constante se obtuvo el peso seco del tejido de los organismos.

Se determinó la razón O:N con el cálculo de la relación átomo gramo del oxígeno consumido respecto al nitrógeno producido.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con la prueba de ANOVA o la de Kruskal-Wallis (Marques de Cantú, 1991) después de comprobar la normalidad en los datos por la prueba de Levene, utilizando el paquete estadístico NCSS11.

3. Resultados y discusión

3.1 Evaluación de la toxicidad aguda

3.1.1 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros de control de la prueba aguda indicaron lo siguiente. Los valores de temperatura, pH y oxígeno disuelto (OD) obtenidos en esta fase demostraron similitud entre las tres réplicas, tanto de los controles como de cada una de las concentraciones de los combustibles (0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.0%).

La temperatura promedio fue 23 ± 2°C y esta no mostró diferencia entre controles y expuestos a los combustibles.

En el caso del pH, el agua de las cámaras control tuvo un valor promedio mayor (8.0 ± 0.2 desviación estándar) en comparación con la que se encontraba en los dispositivos con todas las concentraciones del diésel (7.9 ± 0.2) ($p < 0.05$). En la evaluación del biodiésel, las diferencias sólo se registraron en el agua con las concentraciones más altas (0.25, 0.5 y 1.0%); cuyo promedio fue 7.8 ± 0.2. No se registraron diferencias entre el agua de las cámaras control y la de las de la mezcla en ninguna concentración, su valor promedio fue 7.9 ± 0.3.

Los valores de OD en general fueron bajos. Se observó sólo una diferencia significativa entre el OD contenido en el agua de las cámaras de los organismos control con respecto al de los dispositivos con la mezcla B20 al 1.0% ($p < 0.05$); el valor promedio del agua del control fue 2.8 ± 1.4 mg/L, mientras que en estos recipientes de la mezcla se registró 1.8 ± 1.1 mg/L. El valor promedio del oxígeno en el resto de los dispositivos con la mezcla B20 sin incluir la concentración 1.0% fue de 2.3 ± 1.2 mg/L. Cabe mencionar que las condiciones de aireación fueron las mismas en todos los dispositivos

3.1.2 Mortalidad en la fase de exposición aguda

Los resultados obtenidos durante esta fase demostraron que en las concentraciones más altas de diésel (0.50 y 1.0%) se presentó mortalidad, como se puede observar en la tabla 2. La tasa de mortalidad de los renacuajos del grupo control fue cero, mientras que en los animales expuestos a las FS varió sólo de cero a 13%. Sólo en el caso del diésel se pudo observar un aumento de la mortalidad asociado al aumento de la concentración. En el caso del biodiésel y la mezcla, las concentraciones utilizadas causaron un número de organismos muertos similar en todas las concentraciones, lo que dificultó el cálculo de la $CL_{50\text{-}96h.}$ Sin embargo, fue posible determinar la mortalidad de los renacuajos expuestos al diésel. Castro *et al.* (2007) mencionan que el biodiésel puede ser tóxico e incluso letal, aunque si el consumo de este combustible es mínimo, lo consideran inofensivo para la fauna acuática.

Fue posible calcular una $CL_{50\text{-}96h}$ de 2.85% de la FS del diesel y una $CL_{1\text{-}96h}$ de 0.27%. A partir de ella se propusieron valores inferiores (0.06 y 0.12%) para la prueba de subletalidad.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad a las 96 h de renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* en exposición aguda a las fracciones solubles de Diesel (FSD), Biodiesel (FSB) y mezcla 20% Biodiesel (FSM). Elaboración propia

Concentraciones de las FS (%)	controles	FSD	FSB	FSM
0.06	0	0	13	6
0.12	0	0	6	0
0.25	0	0	13	6
0.50	0	6	6	13
1.00	0	13	6	6

En 2007, Khan *et al.,* compararon efectos de toxicidad aguda en organismos acuáticos (*Daphnia magna* y *Oncorhynchus mykiss*) expuestos a diésel convencional, a biodiésel (B100) y a las mezclas B50 y B20 y concluyeron que el biodiésel y sus mezclas producidos con aceites no comestibles son menos tóxicos que el diésel. Estos generaron un porcentaje de mortalidad bajo y no obtuvieron la CL_{50}. Por otro lado, Bluhm *et al.* (2016), evaluaron la toxicidad aguda de tres biocombustibles potenciales y dos combustibles fósiles en el pez cebra *Danio rerio*. La gasolina y el biodiésel no presentaron una CL_{50} y concluyeron que la toxicidad del biodiésel fue menor que la del diésel. En la presente investigación el biodiésel (B100) y la mezcla (B20) resultaron ser menos tóxicos que el diésel. Los resultados que coinciden con los de Bluhm *et al.* (2016) y Khan *et al.,* (2007).

3.1.3 Mortalidad en la fase de recuperación

Los organismos sobrevivientes de la fase aguda se conservaron en agua sin contaminantes durante 31 días, debido a que los resultados de mortandad entre las diferentes concentraciones no fueron claros. Cabe mencionar que en un principio no se planteó una etapa de recuperación; sin embargo, en este periodo se observó una mortalidad importante (fig. 1).

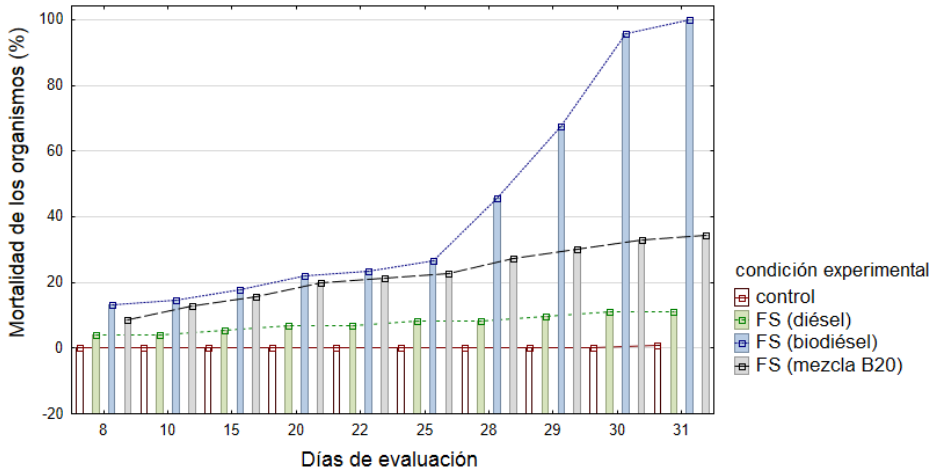


Figura 1. Mortalidad acumulada en la fase de depuración (31 días) de renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* expuestos a las fracciones solubles de Diesel (FSD), Biodiesel (FSB) y mezcla 20% Biodiesel (FSM). Elaboración propia.

Al término de este periodo (día 31) los porcentajes de mortalidad acumulada fueron los siguientes: en las cámaras de los organismos control se registró sólo 1%, en los animales expuestos a las concentraciones de la fracción soluble del diésel (FSD) la mortalidad fue 11%, en el caso de los renacuajos colocados en los dispositivos de las fracciones de la mezcla (FSM) se obtuvo un 34%. Por otro lado, en las cámaras de las concentraciones del biodiésel (FSB) murieron todos los especímenes. A pesar de que los organismos no mostraron efectos relevantes durante el periodo de exposición de 96h, la mortalidad se presentó después, aún en ausencia de los combustibles. Por lo anterior debe considerarse que, en pruebas de toxicidad asociada a este tipo de compuestos, se debería extender el periodo de observación posterior a la exposición.

3.2 Prueba de toxicidad subletal

3.2.1 Parámetros fisicoquímicos de la fase subletal

Al realizar una evaluación general se demostraron similitudes de temperatura y oxígeno disuelto en el agua, y diferencias significativas de pH en las diferentes condiciones experimentales.

El valor promedio de la temperatura del agua fue de 21.0 ± 1.4°C y la media del OD fue 6.10 ± 0.53 mg/L. Se demostró únicamente una diferencia significativa en el pH del agua de las cámaras control con respecto a la de los organismos

expuestos a la concentración 0.12% del biodiésel. Los promedios de pH registrados fueron 7.9 ± 0.3 en los recipientes de controles y 7.2 ± 0.5 en los contaminados ($p < 0.05$). Esta diferencia se puede relacionar sólo con el tipo de combustible que se utilizó, pues las condiciones iniciales fueron iguales para todas las cámaras de los individuos.

3.2.2 Parámetros morfométricos

La evaluación de estas variables se realizó en todos los renacuajos en condiciones experimentales; debido a que en el análisis estadístico se demostró que no hubo diferencias significativas entre controles y expuestos ($p > 0.05$), es decir, se demostró similitud entre ellos, se obtuvo un promedio general de cada uno de los parámetros evaluados. Estos fueron: peso húmedo 1.31 ± 0.31 g, longitud 4.28 ± 0.65 cm y ancho 0.96 ± 0.18 cm.

Con el análisis estadístico también se demostró que los lotes de organismos sometidos a bioensayo presentaban tallas similares, y los posibles cambios en estos parámetros se pueden vincular sólo a la exposición de los combustibles.

3.2.3 Evaluación del estrés metabólico

La evaluación del estrés metabólico se realizó en las dos fases del bioensayo subletal, es decir, durante las fases de exposición y de depuración.

Se compararon las respuestas de los organismos en las diferentes condiciones y se determinó que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los organismos control y los expuestos en los días dos y 15, como se puede observar en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros fisiológicos determinados en renacuajos de rana toro L. catesbeianus en los diferentes días durante el bioensayo subletal (promedio ± desviación estándar).

Fase de evaluación y días evaluados	Consumo de oxígeno (mg/h* gPS)		Excreción nitrogenada (mg/h*gPS)		Relación O:N	
	Promedio ± DS	Mínimo – máximo	Promedio ± DS	Mínimo – Máximo	Promedio ± DS	Mínimo - Máximo
Exposición	0.56 ± 0.35	0.07 - 1.37	0.07 ± 0.05	0.02 - 0.30	10.08 ± 5.88	2.50 -26.15

1 (24 h), 2 (48 h), 4 (96 h)	1.65 ± 1.33 [a]	0.25 – 5.60	0.52 ± 0.28 [b]	0.17 - 1.34	7.57 ± 13.92[c]	0.50-60.36
	0.70 ± 0.24	0.11 - 1.21	0.01 ± 0.01	0.00 - 0.06	56.02 ±35.35	6.83–146.63
Depuración 15 (días), 30 (días)	0.97 ± 0.28	0.38 - 1.47	0.06 ± 0.03 [d]	0.01-0.13	22.70 ± 10.65[e]	6.72 – 42.50
	0.86 ± 0.31	0.27 - 1.74	0.03 ± 0.02	0.01 - 0.17	30.93 ± 17.74	9.37 - 90.31

Diferencias de los controles respecto a: [a] los expuestos al diésel (0.06 y 0.12%) y al biodiesel 0.12%; [b] a los expuestos a todos los combustibles; [c] a todos excepto a los de biodiesel y la mezcla 0.06; [d] al diésel y a la mezcla 0.06%, [e] a todos excepto a los expuestos al biodiesel 0.06 y la mezcla 0.12% (p <0.05, Kruskal-Wallis). Elaboración propia.

Se observó variación en el consumo de oxígeno a través del tiempo, sin embargo, el valor más alto se registró en todos los organismos en el día dos (48 h de la fase de exposición) (p <0.05), con un valor promedio general de 1.65 ± 1.33 mg/h/gPS (fig. 2-A).

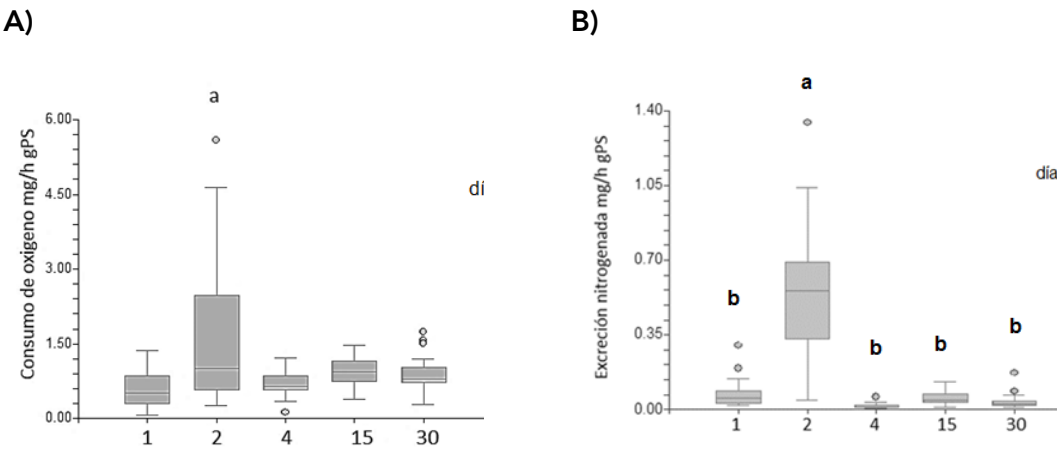


Figura 2. A) Consumo de Oxígeno (mg/h/ gPS) y B) excreción nitrogenada (mg/h/gPS) de renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* en los diferentes días (d) del bioensayo subletal. [a] Diferencias significativas (p < 0.05) en el consumo de oxígeno

de los renacuajos con respecto a los analizados los demás días (d). Elaboración propia.

La excreción nitrogenada también fue mayor en el segundo día ($p < 0.05$) con una tasa de 0.52 ± 0.28 mg/h/gPS (fig. 2-B). Cabe mencionar que el resto de los valores registrados fueron muy inferiores.

Los resultados de estrés metabólico determinado a través de la relación O:N, demuestran que en este mismo día los valores fueron bajos con una media de 7.57 ± 13.92 mg/h/gPs, con respecto a los demás días ($p < 0.05$), como se muestra en la figura 3.

En los días 15 y 30 (fase de recuperación) se observó que el estrés metabólico registrado fue en promedio 22.70 ± 10.65 y 30.93 ± 17.74, y las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto al día dos ($p < 0.05$) (fig. 3).

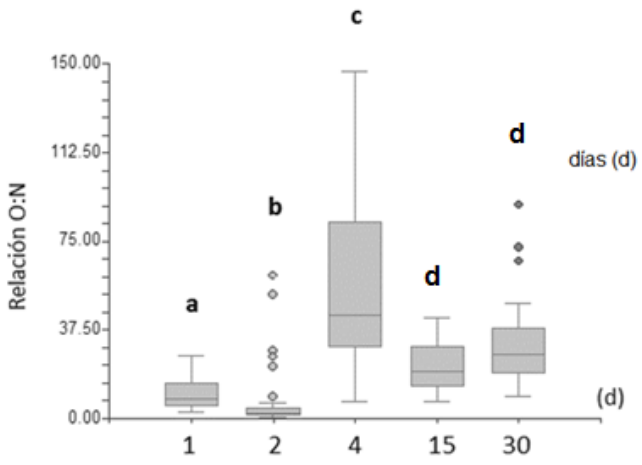


Figura 3. Relación O:N de renacuajos de rana toro *L. catesbeianus*, evaluada en diferentes días del bioensayo subletal. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) en la evaluación de la razón O:N. Elaboración propia.

Comportamiento de los parámetros fisiológicos el día dos

En este día se exhibieron efectos evidentes por exposición a los combustibles. Cabe mencionar que los organismos se encontraban en periodo de exposición y la evaluación se llevó a cabo antes del recambio de la mitad de agua, puesto que éste se realizó a las 48 h. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Se observó que en el día dos, los individuos sin contaminar consumieron más oxígeno que los animales contaminados ($p < 0.05$) (tabla 4 y fig. 4-A). En términos

generales, los renacuajos expuestos a las dos concentraciones de cada combustible tuvieron un comportamiento similar. En cuanto a la excreción nitrogenada los animales control presentaron los valores más bajos, en comparación con los organismos expuestos ($p < 0.05$ y fig. 4-B), lo cual se podría atribuir a la exposición a los combustibles.

Con respecto a la relación O:N, se demostró que los renacuajos de las cámaras control presentaron un valor mayor ($p < 0.05$) que los especímenes expuestos a los tres combustibles (fig. 5).

Tabla 4. Parámetros fisiológicos determinados en renacuajos de rana toro L. catesbeianus el día 2 de exposición del bioensayo subletal (promedios ± desviaciones estándar).

Concentraciones	Consumo de oxígeno (mg/h*gPs)		Excreción nitrogenada (mg/h* gPs)		Relación O:N	
	Promedio ± DS	Mínimo Máximo	Promedio ± DS	Mínimo Máximo	Promedio ± DS	Mínimo Máximo
Control	3.67 ± 1.20 [a]	2.63 5.60	0.11 ± 0.04 [a]	0.04 0.15	37.68 ± 17.38 [a]	21.58 60.36
FSD 0.06%	0.68 ± 0.31 [b]	0.35 1.17	0.51 ± 0.26 [b]	0.17 0.78	1.79 ± 1.12 [b]	0.50 3.35
FSD 0.12%	0.73 ± 0.18 [b]	0.50 0.90	0.59 ± 0.15 [b]	0.33 0.73	1.37 ± 0.39 [b]	0.82 1.86
FSB 0.06%	2.43 ± 1.53 [c]	1.01 4.63	0.58 ± 0.08 [b]	0.47 0.69	4.39 ± 2.82 [b]	1.80 8.75
FSB 0.12%	0.86 ± 0.87 [b]	0.25 2.40	0.66 ± 0.24 [b]	0.40 1.03	1.85 ± 2.53 [b]	0.50 6.35
FSM 0.06%	1.77 ± 1.13 [bc]	0.48 3.15	0.60 ± 0.47 [b]	0.17 1.34	3.31 ± 0.62 [b]	2.50 4.10
FSM 0.12%	1.39 ± 0.53 [bc]	0.75 2.12	0.57 ± 0.18 [a]	0.37 0.83	2.63 ± 0.94 [b]	1.80 3.92

Diferencia de los organismos control respecto a: [a] todos los organismos expuestos; [b] organismos expuestos con valores bajos; [c] organismos expuestos con valores intermedios ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Fracción soluble del diésel (FSD); fracción soluble del biodiésel (FSB); fracción soluble de la mezcla (FSM); desviación estándar (DS). Elaboración propia.

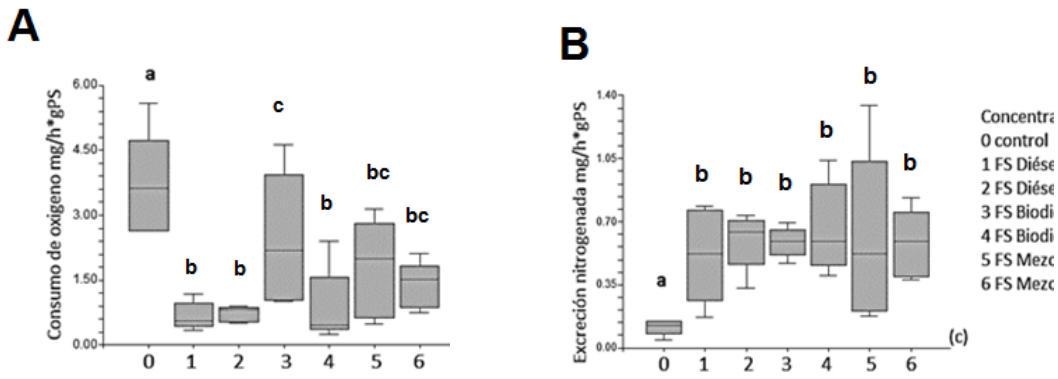


Figura 4. A) Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) y (B) excreción nitrogenada (mg/h*gPS) de todos los renacuajos de *L. catesbeianus*; controles y expuestos a las fracciones solubles de Diesel (FSD), Biodiesel (FSB) y mezcla 20% Biodiesel (FSM) el día dos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0.05). Elaboración propia.

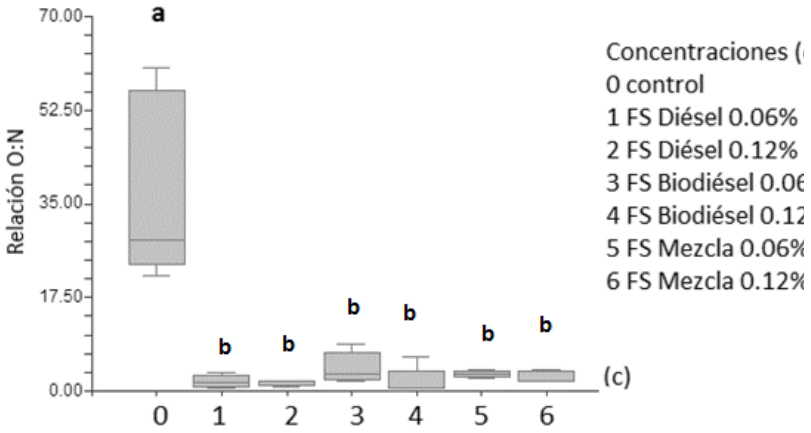


Figura 5. Relación O:N de renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* evaluada el día dos. Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0.05). Elaboración propia

Comportamiento de los parámetros fisiológicos el día 15

Los resultados obtenidos en el día 15 se muestran en la tabla 5 y la figura 6. Cabe mencionar que, aunque los organismos se encontraban en periodo de depuración se observaron algunos efectos.En este día, los organismos control mostraron diferencias en la excreción nitrogenada y la razón O:N respecto a los organismos anteriormente expuestos al diésel (0.06%) y la mezcla (0.06%) (fig. 6-B y 7).

Tabla 5. Parámetros fisiológicos determinados en renacuajos de rana toro *L. catesbeianus* en el día 15 de exposición (promedios ± desviaciones estándar).

Condición experimental	Consumo de oxígeno (mg/h gPs)		Excreción nitrogenada (mg/h/ gPs)		Relación O:N	
	Promedio ± DS	Mínimo Máximo	Promedio ± DS	Mínimo Máximo	Promedio ± DS	Mínimo Máximo
Control	0.95 ± 0.29 ^{ab}	0.53 1.33	0.03 ± 0.01 ^{a}	0.01 0.04	35.32 ± 8.65 ^{a}	23.37 42.50
FSD 0.06%	1.14 ± 0.22 ^{b}	0.92 1.45	0.08 ± 0.02 ^{c}	0.06 0.11	14.12 ± 3.36 ^{bc}	10.62 19.61
FSD 0.12%	0.87 ± 0.27 ^{ab}	0.46 1.13	0.05 ± 0.02 ^{abc}	0.03 0.08	21.72 ± 12.39 ^{bc}	12.14 39.31
FSB 0.06%	0.81 ± 0.10 ^{a}	0.70 0.95	0.05 ± 0.04 ^{ab}	0.02 0.13	22.92 ± 13.70 ^{abc}	6.72 38.25
FSB 0.12%	0.85 ± 0.20 ^{a}	0.58 1.09	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.02 0.07	18.70 ± 5.73 ^{b}	12.61 27.32
FSM 0.06%	1.19 ± 0.28 ^{b}	0.76 1.47	0.08 ± 0.02 ^{bc}	0.05 0.11	17.02 ± 7.46 ^{b}	7.47 25.80
FSM 0.12%	0.94 ± 0.37 ^{ab}	0.38 1.31	0.03 ± 0.01 ^{a}	0.01 0.05	29.10 ± 6.70 ^{a}	19.92 38.25

En consumo de oxígeno ^{a} Diferente de ^{b}; en excreción nitrogenada ^{a} diferente de ^{c}; En O:N ^{a} Diferente de ^{b} y ^{c} ($p < 0.05$); fracción soluble del diésel (FSD); fracción soluble del biodiésel (FSB); fracción soluble de la mezcla (FSM); desviación estándar (DS). Elaboración propia.

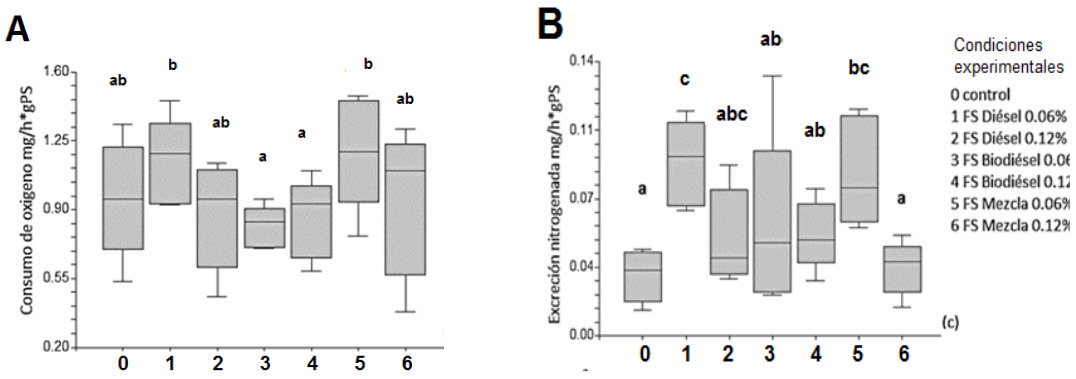


Figura 6. A) Consumo de oxígeno (mg/h*gPS) y (B) excreción nitrogenada (mg/h*gPS) de todos los renacuajos de *L. catesbeianus*; controles y expuestos a las fracciones solubles de Diesel (FSD), Biodiesel (FSB) y mezcla 20% Biodiesel (FSM), evaluado el día 15. *Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0.05).* Elaboración propia.

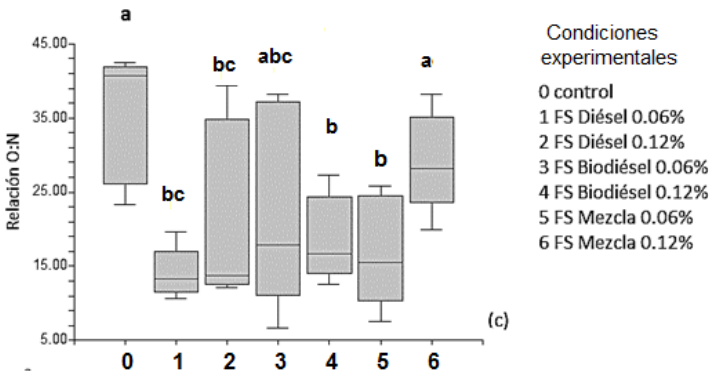


Figura 7. Relación O:N de de *L. catesbeianus* evaluada el día 15. Letras diferentes indican diferencias significativas (p <0.05). Elaboración propia.

Los días dos y 15 se compararon. Se observó que no se presentaron diferencias (p >0.05) en el consumo de oxígeno (1.65 ± 1.33 y 0.97 ± 0.28 mg/h*gPs, respectivamente). Sin embargo, en los valores de la excreción nitrogenada se observaron diferencias en la evaluación comparativa entre ambos días (p <0.05); este parámetro fisiológico fue mayor el día dos (0.52 ± 0.28 mg/h/gPS) que el día 15 (0.06 ± 0.03 mg/h/gPS). Por otro lado, en la evaluación de estrés metabólico se observaron diferencias en la relación O:N de los organismos en

ambos días ($p < 0.05$) con valores de 7.57 ± 13.92 el día dos y 22.70 ± 10.65, el día 15.

Los puntos relevantes de esta comparación se detallan a continuación. Los valores obtenidos en la relación O:N en los organismos control fue de 37.68 el día dos; éste es un valor que se encuentra dentro de los parámetros normales de estrés metabólico (Mayzaud & Conover, 1988), no obstante, en los animales expuestos los valores fueron bajos. En la FSD fueron 1. 79 y 1.37, en la FSB 4.39 y 1.85 y por último en la FSM 3.31 y 2.63 y (tabla 4 y fig. 4).

En lo que respecta a los resultados obtenidos el día 15, los organismos control presentaron una tasa O:N de 35.32, la cual fue similar a la del día dos, sin embargo, los renacuajos contaminados, si bien no mostraron valores tan contrastantes como en el día dos, manifestaron algunos efectos, pues se obtuvieron valores inferiores en la razón O:N, aunque eso sucedió únicamente en los animales contaminados por la FSD 0.06% (14.12) y por la FSM 0.06% (17.02) (fig. 7), en comparación con los controles. Con el análisis estadístico se confirmó que la razón O:N de los organismos expuestos a los combustibles fue menor el día dos que el día 15 ($p < 0.05$).

La disminución de la razón O:N se atribuyó más a la excreción nitrogenada, que al consumo de oxígeno, ya que los valores de O:N tuvieron una relación inversa con la excreción nitrogenada de $r = - 0.43$ ($p<0.01$), mientras que el consumo de oxígeno no presentó relación alguna con el estrés metabólico. Lo anterior indica un esfuerzo de los organismos por eliminar al contaminante.

El efecto de los combustibles sobre la respiración fue evidente el día 2 (fase de exposición), mientras que en la fase de recuperación las diferencias entre controles y expuestos no fueron obvias. La excreción nitrogenada, en contraste, indicó el impacto de los combustibles tanto en exposición como en recuperación. Ambos parámetros integrados indicaron un importante estrés metabólico en los organismos durante la exposición, parámetro que mostro una mejoría relativa en el periodo de recuperación.

Los anfibios no requieren mucho gasto energético para su metabolismo al ser organismos ectotermos y no consumen grandes cantidades de oxígeno (Fuentes y Massol-Deyá,2002). En el presente estudio los organismos expuestos a los combustibles presentaron menor consumo de oxígeno. Sin embargo, la excreción nitrogenada dio resultados más relevantes, ya que los organismos incrementaron esta respuesta como consecuencia de la exposición. Los patrones de excreción de nitrógeno no proteico en los anfibios varían dependiendo de la etapa ontogénica en la que se encuentren. Los renacuajos son organismos son amoniotélicos con baja excreción de urea (Coppo, 2003). En *L. catesbeianus* no se han reportado niveles de amoniaco NH_3 excretado, de manera que este trabajo aporta información sobre el desempeño de la especie y el impacto de los combustibles en la excreción

nitrogenada. El incremento en esta forma de excreción generó las modificaciones en la relación O:N. Los valores alcanzados en etapa de exposición indican que los organismos expuestos llevaron a cabo el consumo de sus proteínas (Mayzaud & Connover, 1988), a pesar de contar con alimento suficiente. Cuando los organismos pierden la capacidad de compensar, resistir o adaptarse a los cambios que ocurren en el ambiente, se encuentran en condición de estrés fisiológico (Capó, 2002).

La importancia de los estudios en anfibios se relaciona con su biología. Coppo (2003), menciona que, en etapas de desarrollo previas al adulto, los renacuajos presentan respiración branquial, viven en agua y la incorporación de los tóxicos se genera con mayor frecuencia por absorción cutánea. De esta manera los tóxicos presentes en el agua afectan de manera directa a los anfibios. El derrame accidental de combustibles como el diésel o el biodiesel implica riesgo a este tipo de organismos. Existen pocos estudios acerca del daño ambiental y a la salud que estos combustibles podrían causar a la biota en caso de un incidente o derrame (De Mello, 2007). La falta de información sobre este tema sustenta la relevancia de este trabajo, puesto que en la actualidad o en un futuro los biocombustibles serán el sustituto del diésel y por ende se ocuparán en mayor cantidad, por lo que los accidentes con dichas sustancias no serán inusuales. Según Bucas y Saliot (2002), ya se han registrado numerosas catástrofes de aceite vegetal (vertido de forma directa) en el mar. Y esto puede presentarse también en ambientes terrestres y en cuerpos acuáticos de agua dulce.

4. Conclusiones.

La $CL_{50\text{-}96h}$ fue de 2.85% para la fracción soluble del diésel y la $CL_{1\text{-}96h}$ fue de 0.27%. No se logró calcular este parámetro para los organismos expuestos al biodiesel y a la mezcla.

En el periodo de recuperación de la fase de exposición aguda (30 días), se presentó una mortalidad en los organismos previamente expuestos a los combustibles, ésta fue del 100% en el caso del biodiesel. Aunque los organismos no mostraron deterioro evidente durante la fase de exposición. Esto sugiere que los daños ocasionados por los biocombustibles no siempre son inmediatos, por lo que en caso de un accidente se deben realizar estudios en el momento del incidente y en plazos posteriores.

Los resultados comparativos de la toxicidad del diésel, el biodiesel y la mezcla B20, indican que las diferencias en su toxicidad son muy sutiles. Se puede considerar que el diésel y la mezcla generan efectos más dañinos que el biodiesel, sin embargo, tanto el biodiésel como la mezcla causaron daños a los organismos,

incluso en concentraciones bajas, por lo que se requiere realizar más estudios para que se haga un mejor manejo de estos biocombustibles.

Los organismos expuestos a los combustibles mostraron un incremento notable en la excreción nitrogenada y un importante estrés metabólico en exposición a las concentraciones 0.06 y 0.12% de los combustibles, si bien mostraron cierta recuperación posteriormente. En la fase de exposición, el día dos, los valores indicaron que los animales intoxicados consumieron sus propias proteínas. El día 15 (recuperación), los organismos previamente expuestos al biodiesel 0.06% la mezcla 0.12% mostraron pocas afectaciones.

Si bien el biodiésel se considera amigable para el ambiente y menos dañino que el diésel para algunos organismos acuáticos, en *L. catesbeianus* se demostró que todos los combustibles causaron afectaciones, con excepción de la concentración 0.06% de la fracción soluble del biodiesel.

Debido a que existen pocos estudios sobre la toxicidad de estos biocombustibles y a que su uso en un futuro cercano será mayor, la posibilidad de que se generen accidentes o derrames puede incrementarse y con ello afectaciones a la fauna silvestre. Este estudio proporciona elementos que podrían contribuir para un mejor manejo de estos combustibles.

5. Referencias

Anderson, J. W., J. M. Neff., B. A. Cox., H. E. Tatem., & G. M. Hightower 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine.Biology*, 27(1): 75-88.

APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th. dition. *American Public Health Association.* Washington, D. C.

Balat, M., & H. Balat. 2010. Progress in biodiésel processing. *Applied Energy*, 87: 1815-1835.

Bantle, J., J. Dumont., R. Finch., & G. Linder. 1991. Atlas of abnormalities. A guide for the performance of FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*). U.S. *Army Medical Research and Development Command*, Washington, D.C.68 pp.

Barrera-Escorcia, G. 2006. Toxicidad del cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Tesis de doctorado en ciencias (Biología). Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico. 252 pp.

Berrill, M., S. Bertram., L. McGillivray., M. Kolohon., & B. Pauli. 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(4): 657-664.

Blaustein, A. R. 1994. Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. Herpetologica, 50 (1): 85-97

Blaustein, A. R., & D. B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. Scientific American**,** 272 (4): 52-57.

Bluhm, K., T. B. Seiler., N. Ander., J. Klankermayer., A. Schaeffer., & H. Hollert. 2016. Acute embryo toxicity and teratogenicity of three potential biofuels also used as flavor or solvent. *Science of the Total Environment,* 566: 786-795.

Bucas, G., & A. Saliot. 2002. Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences. *Marine Pollution Bulletin,* 44: 1388-1396.

Canton, J. H., & W. Slooff. 1982. Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd) with freshwater organism of different trophic levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 6 (1): 113-128.

Capó, M. 2002. Principios de Ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Madrid, McGraw-Hill.

Castro, P., J. Coello., & L. Castillo. 2007. Opciones para la producción y uso del biodiésel en el Perú. Soluciones prácticas ITDG (Tecnología derivado de la pobreza). Lima, Serie Libros N°51.

Contreras, E. F. 1984. Manual de técnicas hidrobiológicas. UAM. México. 150 p.

Coppo, J. A. 2003. El medio interno de la "rana toro" (Rana catesbeiana, Shaw, 1802). *Revista Veterinaria, 14(*1): 25-41.

De Mello, J. A., C. A. Carmichael., E. E. Peacock., R. K. Nelson., J. S. Arey., & C. M. Reddy. 2007. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Marine Pollution Bulletin*, 54 (7): 894-904.

Devillers, J., & J. M. Exbrayar. 1992. Ecotoxicity of chemicals to amphibians. *Gordan and Breach Science Publishers*, Lyon, France, 337 pp.

Freda, J. 1986. The influence of acidic pond water on amphibians: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 30(1): 439-450.

Fuentes F., & Massol-Deyá A. 2002. Nutrientes y Gases. Manual de laboratorios ecología de microorganismos.Universidad de Puerto Rico, 17 pp.

Gold-Bouchot, G., & O. Zapata-Pérez. 2004. "Contaminación, ecotoxicología y manejo costero" In: Rivera Arriaga, E., G. J. Villalobos, I. Azuz Adeath., & F. Rosado-May (eds.). El Manejo Costero en México. Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo, 654: 277-286.

Goetz, C.A., R.C. Smith. 1959. Evaluation of various methods and reagents for total harness and calcium hardness in water. Iowa State Journal of Science 34:81.

Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 16 (3): 183-190.

Hall, 1990; Hall, R. J. 1990. Accumulation, metabolism and toxicity of parathion in tadpoles. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 44(4): 629-635.

Hall & Kolbe, 1980; Hall, R. J., & Kolbe, E. (1980). Bioconcentration of organophosphorus pesticides to hazardous levels by amphibians. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A Current Issues, 6(4): 853-860.

Khan, N., M. Mostafa., A.Warith., & G. Luk. 2007. A Comparison of Acute Toxicity of Biodiésel,biodiesel blend, and diesel on acuatic organism. *Journal of the Air & Waste Management Association,* 57(3): 286-296.

Lee, S.W., T. Herage., & B. Young. 2004. Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel. *Fuel* 83(11): 1607-1613.

Marco, A., & A. Blastein. 1998. Egg gelatinous matrix protects *Ambistoma gracile* embryos from prolonged exposure to air. *Herpetological Journal*, *8*(4): 207-11.

Marco, A. 2002. Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios. *Revista Española de Herpetología,* Vol. Especial: 97-109.

Marques de Cantú, M.J. 1991. Probabilidad de Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Ed. McGraw-Hill Interamericana de México, México, 657 p.

Mayzaud, P., & R. J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, *45*(3): 289-302.

Nebeker, A.V., G. S, Schuytema., & S. L Ott. 1995. Effects of cadmium on growth and bioacumulation in the northwestern salamander *Ambystoma gracile*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *29*(4): 492-499.

Ouellet, M. 2001. Amphibian deformities: current state of knowlodge, pp.617-646, in Sparling, D. W., G. Linder., & C. A. Bishop, (eds.). Ecotoxicology of amphibians and reptiles. SETAC Press, Pensacola,FL. In: Marco, A. 2003. Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfíbios. *Munibe*, *16*: 44-45.

Pasqualino, J. C., D. Montané., & J. Salvadó. 2006. Synergic effects of biodiésel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and bioenergy*, 30(10): 874–879.

Pierce, B. A.1985. Acid tolerance in amphibians. *Bio Science*, 35 (4): 239-243.

Prince, R. C., C. Haitmanek., & C. C Lee. 2008. The primary aerobic biodegradation of biodiésel B20. Chemosphere, 71(8): 1446-1451.

Rueda-Almonacid, J. V. 2000. Situación actual y problemática generada por la introducción de "Rana Toro" a Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales,* 23 (Suplemento especial): 367-393.

Sima-Álvarez, R., M. Mejía-Muñoz., M. Rodríguez-Serna., & F. J. Güemes-Ricalde. 2001 Determinación de la concentración Letal media (Cl_{50})y efecto histopatológico del permanganato de potasio en renacuajos de rana toro *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). *Universidad y Ciencia, 34(17): 65-72.*

US NRC, 1989. Biologic markers in reproductive toxicology. US National Research Council. Washington, DC, National Academy Press.

Van Gerpen, J. 2004. Biodiésel Fuels. *Encyclopedia of Energy*. *Science direct,* 151-162. pp

Waldman, B., & M. J. Ryan.1983. Thermal advanges of comunal egg mass deposition in Wood frogs (Rana sylvatica). *Journal of Herpetology*, 17(1): 70-72.

Ward, D., & O. J. Sexton. 1981. Anti-predator role of salamander egg membranes,. *Copeia.* 3, 724-726.

WHO. 1996. Diésel Fuel and Exhaust Emissions. Wold Healt organization International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 171, Prepared by members of the Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research, Germany, under the coordination of G. Rosner. WHO, Geneva Switzerland.

Xipe A. C. 2013. Manual de producción de Rana Toro. Alternativa sustentable de produccion rural. Tuxpan, Michoacán.

Capítulo 20

DETERMINACIÓN DE UNA CEPA SILVESTRE DE *PLANKTOTHRIX AGARDII* PRODUCTORA DE SAXITOXINA PROCEDENTE DE LA LAGUNA DE ZUMPANGO, ESTADO DE MÉXICO

Luis A. Rodríguez-Guerrero[1]

Víctor M. Luna-Pabello[1]

[1] Laboratorio de Microbiología Experimental, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, CdMx, México.

* rodriguez_luis@live.com.mx

Resumen

La cianobacteria *Planktothrix agardhii* es considerada una de las especies con mayor distribución en cuerpos de aguas eutróficos en hábitat de agua dulce o salobre a nivel mundial, donde conforma el sistema planctónico, este organismo puede producir un potente alcaloide neurotóxico llamado saxitoxina, hasta 1 µg L^{-1} de equivalente de STX por un millón de células, lo que ocasiona problemas a la salud de la población que interactua o consume productos del cuerpo de agua. A nivel mundial se han confirmado la presencia de cepas de *P. agardhii* productoras de saxitoxina en el continente Europeo y Americano, en el presente estudio se determinó morfológica y molecularmente la presencia de *P. agardhii* en la comunidad fitoplactica de la Laguna de Zumpango, en el Estado de México; así como la presencia de 153.0 ng L^{-1} de saxitoxina en este cuerpo de agua, valor inferior al lìmite máximo permisible de la EPA de 200 ng L^{-1}.

Palabras clave: Cianobacteria, cianotoxina, neurotoxina, saxitoxina, *Planktothrix agardii*.

1. Introducción.

La cianobacteria *Planktothrix agardhii* es considerada una de las especies con mayor distribución en cuerpos de aguas eutróficos en hábitat de agua dulce o salobre conformando el sistema planctónico (Catarina *et al.*, 2017). Sus células vegetativas forman filamentos o tricomas que tienen morfología recta que llegan a medir 4 mm de largo y 3 µm de diámetro, con terminación ligeramente cónica y de agrupación solitaria (Kurmayer *et al.*, 2016). Esta especie puede producir hasta 1 µg L^{-1} de equivalente de STX por un millón de células (Pomati F et al., 2000).

La saxitoxina es un potente alcaloide neurotóxico, que contiene un esqueleto tricíclico de 3,4-propinoperhidropurina ($C_{10}H_{17}N_7O_4$), con un peso molecular de 299.29 UMA (Wiese *et al.*, 2010; Adrinolo *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016). La saxitoxina forma parte de las toxinas paralizantes de mariscos (PST), dentro de la cuál es el análogo más investigado y potente, con una dosis letal intravenosa en ratones de 1 µg Kg^{-1} (Landsberg, 2002; Zhang et al., 2014). A pesar de que su dosis letal intravenosa no varía entre especies, la dosis letal oral puede ser significativamente diferente, en ratones es de 263 µg Kg^{-1} (Price et al., 1991; Zhang et al., 2014), en peces es de 125 µg Kg^{-1} (Teegarden et al., 1996) y en humanos de 1.0 mg $persona_{70kg}^{-1}$ (Apeldoorn et al., 2007; Gad et al., 2014; Zhang et al., 2014). Se han investigado los posibles usos farmacéuticos de la saxitoxina como droga dirigida para prolongar la duración del efecto anestésico local (Wiese *et al.*, 2010), así como su uso en el área cosmética siendo un sustituto de la toxina botulínica en el rejuvecimiento facial (Lagos-Wilson 2014).

Se han confirmado la producción de saxitoxina por *P. agardhii* en Europa en el país de Italia (Pomati F et al., 2000) y en el continente Americáno en Brazil (Lopes *et al.*, 2018). En los Estados Unidos Mexicanos, se ha observado que en la Laguna de Zumpango y reservorios del Valle de Bravo, en el Estado de México, la presencia de los generos de cianobacterias que predominaba durante la temporada de floración del fitoplacton en la región de la laguna son Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon y Cylindrospermopsis. En casos de eutrofización de los cuerpos de agua, su concentración celular media anual ha rebasado el millón de células por mililitro (Vasconcelos *et al.*, 2010). Lo anterior representa una alta probabilidad de ocasionar efectos nocivos a la salud pública de la población en cuerpos de agua donde exista un florecimiento algal nocivo (FAN) de *P. agardhii*, de acuerdo al valor guía para la concentración de cianobacterias establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

A pesar de los estudios realizados, en donde se desconoce con precisión las especies de cianobacterias que conforman la comunidad fitoplanctica de la Laguna de Zumpango y si son cepas productoras de saxitoxina. Por lo que el presente estudio se enfoca en la obtención de una muestra de la columna de agua y

determinar morfológica y molecularmente cual es la especie predominante que conforma la comunidad fitoplanctica de la Laguna. Asimismo, se evaluará si existe o no la presencia de saxitoxina en la columna de agua, y en su caso si rebasa los límites máximos permisibles para este compuesto de acuerdo a la normatividad correspondiente.

2. Material y metodos.

Se relizó el muestreo en la Laguana de Zumpango durante el mes de septiembre, derivado a que en este mes se presenta en la localidad las condiciones ambientales propicias para la proliferación de *P. agardhii*, siendo una temperatura media de 25°C, una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activa de 20 $\mu_{fotón}$ $m^{-2}s^{-1}$ y una relación de NO_3:PO_4 de 16:1 (Microbial Culture Collectio, 2016; Huerto-Delgadillo *et al.*, 2011).

Al tratarse *P. agardhii* de una cianobacteria formadora de vesículas de gas, está se encuentra presente en toda la columna de agua, por lo que el muestreo se realizó en la superfie de la Laguna.

2.1. Muestreo de P. agardhii.

Se analizó a través del sensor remoto Aqua de la NASA (Parkinson, C.L., 2003), la zona que presentó mayor concentración de clorofila en la Laguna de Zumpango, en el municipio de Zumpango de Ocampo, Estado de México, durante el mes de septiembre, siendo la zona litoral de la Laguna de Zumpango junto al Parque Ecoturístico, con coordenadas geográficas 19°46´34´´ Norte y 99°07´15´´ Oeste, ver Figura 1. Cabe mencionar, que la zona de la laguna que no presenta color se debe a que el nadir que sigue el satélite no escaneó la zona.

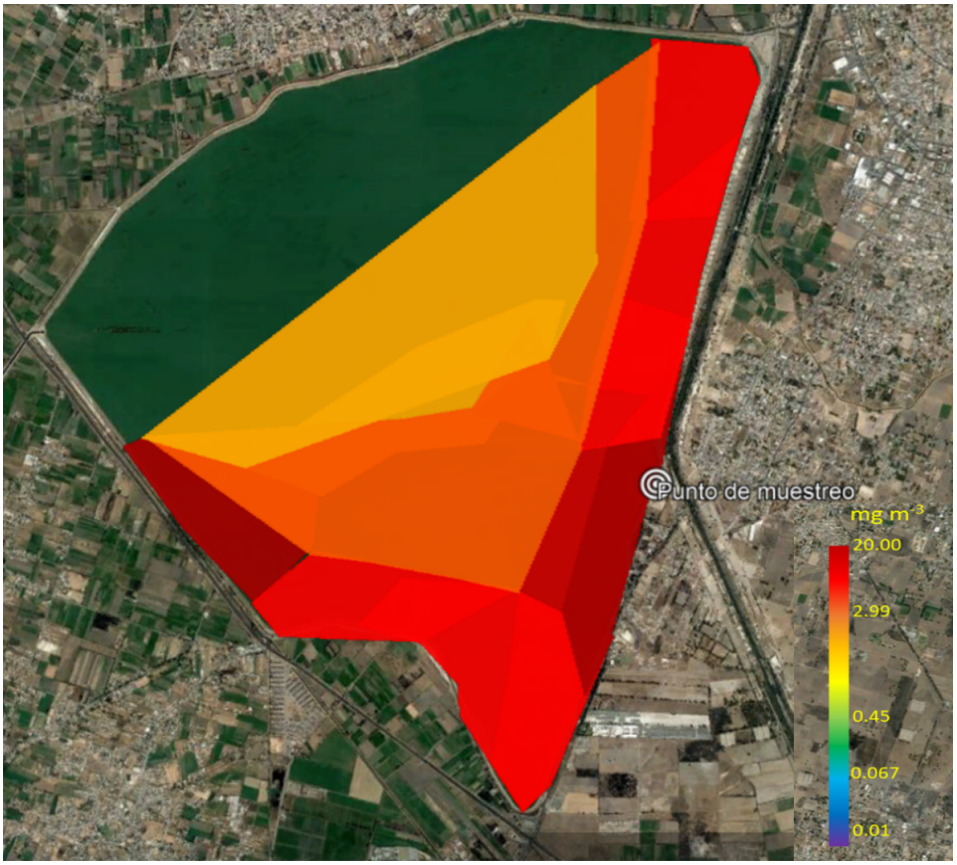


Figura 1. Punto de muestreo, en la Laguna de Zumpango, Estado de México, mapa de referencia del programa google earth con capas de concentración de clorofila otorgado por el sensor Aqua de la NASA. Referencia: Elaboración propia.

Las tomas se obtuvieron de la zona litoral del punto de muestreo indicado; en las muestras viables, se concentró 500 mL de la muestra por medio de red de fitoplancton con apertura de malla de 25 µm y se conservó a baja temperatura mediante baño de hielo para su traslado y posterior procesamiento en el Laboratorio de Microbiología Experimental, en Ciudad Universitaria; en el caso de la muestra fija que serviría para el análisis morfológico, se preservó una muestra de 5 mL con formol al 3 % (Comunicación personal del Dr. Novelo, Facultad de Ciencias de la UNAM).

2.2. Saxitoxina.

La extracción de la saxitoxina en la muestra se realizó de acuerdo con la metodología para cultivo de cianobacterias descrita por Lopes et al., 2018, utilizando un desmembranador, modelo F60 de la marca Fisher Scientific, con una micropunta de 1/8 de pulgada, y una ultracentrífuga, modelo Heraeus™Multiguge™ X1 de la marca ThermoFisher Scientific. El análisis de la concentración de saxitoxina

se determinó mediante el uso del kit ELISA modelo #5191SAXI (limite de detección de 0.005 ng_{STX} mL^{-1}), de la empresa EuroProxima B. V. La prueba tiene un límite de detección de 0.015 ngSTX/mL y la selectividad se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Selectividad del kit ELISA modelo #5191SAXI, para los análogos de toxinas paralizantes. Referencia: kit ELISA modelo #5191SAXI

Análogo	Selectividad (%)
Saxitoxina (STX)	100.0
Decarbamoil saxitoxina (dcSTX)	19.2
Gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3)	5.6
Gonyautoxina-5B (GTX-5B)	26.2
Decarbamoil gonyautoxina 2 y 3 (dcGTX 2 y 3)	0.2
Neosaxitoxina (neoSTX)	1.4
Decarbamoil neosaxitoxina (dcneoSTX)	0.5
Gonyautoxina 1 y 4 (GTX 1 y 4)	<0.1
C ½	0.2

Además del punto de muestreo en sitio, se determinó la temperatura, el pH y la conductividad mediante un multiparamétrico avanzado marca Thermo Scientific, de la serie Orion Star, modelo 5-Star.

Se preservó una muestra puntual para analizar en el laboratorio los nitratos, mediante el método de espectrofotometría ultravioleta; los ortofosfatos, por medio de la variación al método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico, ambas técnicas descritas en el APHA, 1998; y la densidad celular, a través de la cámara de Neubauer (Marienfeld) (Moreno J.R. *et al.*, 2012).

2.3. Identificación morfológica del organismo.

La muestra preservada se fijó con grenetina glicerinada y se observó con microscopio de contraste de fases modelo Eclipse 80i, Modelo Nikon, con los objetivos de 10x, 40x y 100x la presencia de cianobacterias con morfología similar a la descrita para la especie *P. agardhii,* describiendo la morfología según lo descrito en la bibliografía (Cirés y Ballo, 2016; Cirés y Quesada, 2016; Guiry y Guiry, 2016; Komárek y Komárkova, 200; Rajaniemi et al. 2005, Moisander y Paerl, 2000).

2.4. Identificación molecular del organismo.

Se tomaron 50 mL de la muestra viable y se extrajo y purifico el DNA, por medio del kit de purificación de DNA de microbioma InvitrogenTM PureLinkTM Microbiome de la empresa ThermoFisher Scientific Inc. La muestra purificada de DNA se le realizó la secuenciación masiva del genoma, a través del Genoma Analyzer IIx de la compañía Ilumina. Para la detección de genes codificantes de la cianobacteria se utilizó el programa Prokaryotic Dynamic Programming Genefindin Algorithm (PRODIGAL) (Hyatt *et al.* 2012), en el servidor público PRODIGAL. Se utilizó el código de la tabla de traducción para bacterias y arqueas para los genes coordinados, dando la predicción de los genes.

Se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local para nucleótidos (BlastN) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI´sCDD) (Derbysgire et al. 2015), para realizar los estudios de similitud con los siguientes valores mínimos: identidad del 30%, cobertura del 90% y el valor E con significancia de 0.01 basado en un ajuste de secuencia. Se comparó la secuencia resultante con el gen 16S rRNA de *Planktothrix agardhii* NIES-204 lo que nos otorgó género (Suda et al., 2002) y el gen del Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigensa (RuBisCO) de *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA lo que a la vez nos otorgó la especie (Pomati *et al.*, 2000).

3. Resultados y discusión.

La toma de la muestra se realizó en la superficie de la columna de agua debido a que el género *Planktothrix* presenta numerosas vesículas de gas, lo que permite que permanezca en el estrato superior de la columna de agua (Cirés y Quesada, 2016). La caracterización del agua del punto de muestreo resultó en los valores puntuales mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Características del punto de muestreo. Referencia: Elaboración propia.

Referencias geográficas	Latitud: 19°46´34´´Norte Longitud: 99°07´15´´ Oeste Altitud: 2200 msnm
Lugar de la toma de la muestra	Superficie de la zona lentica de la laguna de Zumpango.
Temperatura del agua	25°C
pH	7.08
Conductividad	119 µS cm^{-1}

Nitrato	0.091 mM (5.660 mg L^{-1})
Fosfatos	0.031 mM (2.904 mg L^{-1})
Relación NO_3:PO_4	3:1
Densidad celular de *P. agardhii*	4.61 X 10^6 células mL^{-1}
Saxitoxina	153.0 ng L^{-1}

La concentración de nitrato de 0.091 mM y fosfato 0.031 mM presentes en la muestra de agua, nos indican que la Laguna de Zumpango es un cuerpo de agua en condiciones hipereutróficas, lo que resulta en un crecimiento masivo de fitoplancton (Huerto-Delgadillo *et al.*, 2011).

Además, se observó que la temperatura, el pH y el bajo nivel de oleaje presente en el cuerpo lentico, son las condiciones propicias para el crecimiento del género *Planktothrix* (Microbial Culture Collection, 2016), así como la relación NO_3:PO_4 de 3:1 permite que el fitoplancton predominante sean las cianobacterias sobre la columna de agua (Rosso y Giannuzzi, 2011; Casero *et al.*, 2014), grupo al cual pertenece *P. agardhii*, con una densidad celular en la columna de agua de 4.61 X 10^6 células mL^{-1}, valor que refiere la presencia de un florecimiento de *P. agardhii* en la laguna de Zumpango (Aguilera y Echenique, 2011), indicando que la laguna de Zumpango presentaba un florecimiento de la especie de interés.

Se comprobó la presencia de saxitoxina en el cuerpo de agua de la Laguna de Zumpango, a una concentración de 153.0 ng L^{-1}, estando por debajo de los límites máximos permisibles para agua de consumo humano, de acuerdo con la norma Americana de la Agencia de Protección Ambiental en OHIO (EPA por sus siglas en ingles), de 200 ng L^{-1}.

3.1. Identificación morfológica.

La muestra fija de la laguna de Zumpango, se le realizó la identificación morfológica comparando las características respecto a la especie *P. agardhii* (Cyanocenter UBA, 2017; Gaget *et al.* 2015; Komárek y Komárková, 2005), ver Tabla 1. se muestra la fotografía del organismo caracterizado.

Tabla 1.Comparación entre las características morfológicas de *P. agardhii* y la cianobacteria aislada de la laguna de Zumpango, Estado de México, México.

Característica	*P. agardhii*	Cianobacteria de la laguna de Zumpango
Forma de crecimiento[3]	Filamentos solitarios de libre flotación.	Filamentos solitarios de libre flotación.
Tricoma[1,2,4]	Recto o ligeramente curvados, no ramificado. Sin vaina mucilaginosa o	Recto, no ramificado.

Característica	*P. agardhii*	Cianobacteria de la laguna de Zumpango
	con vaina muy fina incolora, ligero movimiento propio en forma de deslizamiento o temblor, posee numerosas vesículas de gas para libre flotación, distribuidas por todo el volumen celular.	No presenta vaina mucilaginosa. Presenta movimiento en forma de deslizamiento. Posee numerosas vesículas de gas en todo el volumen celular.
Células vegetativas[1,2,4]	Cilíndrica (subsimétrico) o ligeramente en forma de barril de un largo de 2.0 a 8.2 µm y un ancho de 2.3 a 9.8 µm, septos ligeramente constreñidos.	Cilíndricas de un largo de 2.5 µm y un ancho de 3.71 µm. Presenta septos ligeramente constreñidos.
Célula apical[4]	Las células terminales son ligeramente redondeadas o convexas, en ocasiones apuntada y atenuada al final. Frecuentemente presentan una pared engrosada denominada caliptra delgada pero evidente.	Ligeramente convexas, y atenuados al final. Tiene un tamaño de 2.7 µm de largo y un ancho de 3.09 µm. Presenta caliptra evidente.
Acinetos[1,2,4]	Sin presencia.	Sin presencia.
Heterocistos[1,3]	Sin presencia.	Sin presencia.

Fuentes bibliográficas: [1] Komárek y Anagnostidis, 2006; [2] Gaget et al., 2015; [3] Microbial Culture Collection, 2016; [4] Kurmayer et al., 2016.

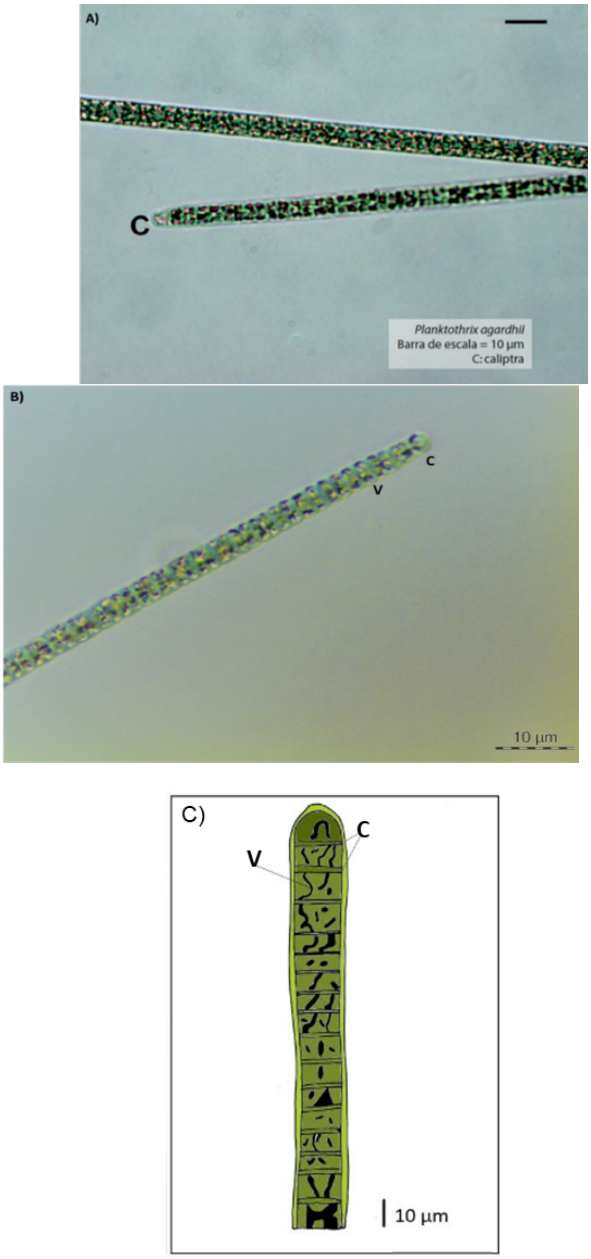


Figura 1. A) Fotografía de *P. agardhii;* B) *P. agardhii* de Zumpango 100x observada por medio de microscopio óptico de contraste de fases; C) Esquema de *P. agardhii*. C=Caliptra V=Célula vegetativa Fuente Bibliográfica: A) Ruza-Rodríguez et. al., 2011; B) Elaboraciòn propia; C) Mendoza y Luna, 2018.

3.2. Identificación molecular.

Los resultados de la secuenciación masiva fueron analizados mediante BlastN, mostrando que el genoma del organismo se componía de 5.4958 Mb, concordando

con el tamaño del genoma de *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 15 presente en el GenBank (Tooming-Klunderud et al., 2013). Al ensamblar la secuencia del gen 16S rRNA y alinearlo con el gen 16S rRNA de *P. agardhii* NIES-204, mostró una similitud con un valor E de 0.01 nucleótidos, con una identidad cercana del 99.99%, respecto a las 1360 pb que conforman al gen (Suda et al., 2002), ver Figura 3, por lo que se puede confirmar que el organismo de estudio pertenece al género *Planktothrix*.

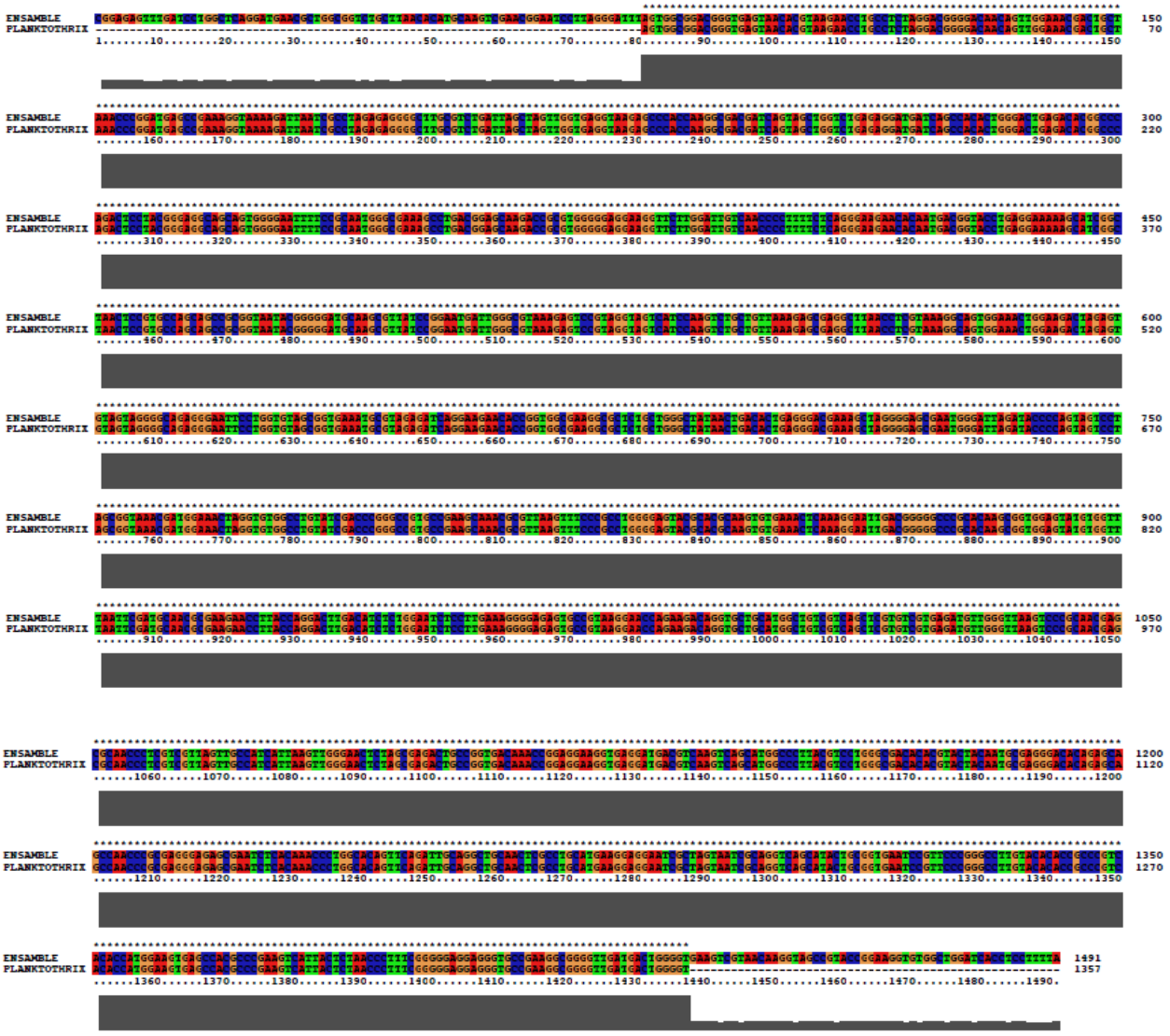


Figura 3. Comparación de la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa silvestre *P. agardhii* de la Laguna de Zumpango y de la cepa NIVA-CYA 15. Referencia: Elaboración propia.

De igual manera, al ensamblar la secuencia del gen RuBisCO del organismo y alinearlo con el gen RuBisCO de *P. agardhii* NIVA-CYA 15, mostró una similitud con un valor E de 0.01 nucleótidos, con una identidad del 99.0 %, respecto a las 1430

pb que conforman al gen (Tooming-Klunderud et al., 2013), lo que indicó que el organismo de estudio pertenece a la especie *P. agardhii*.

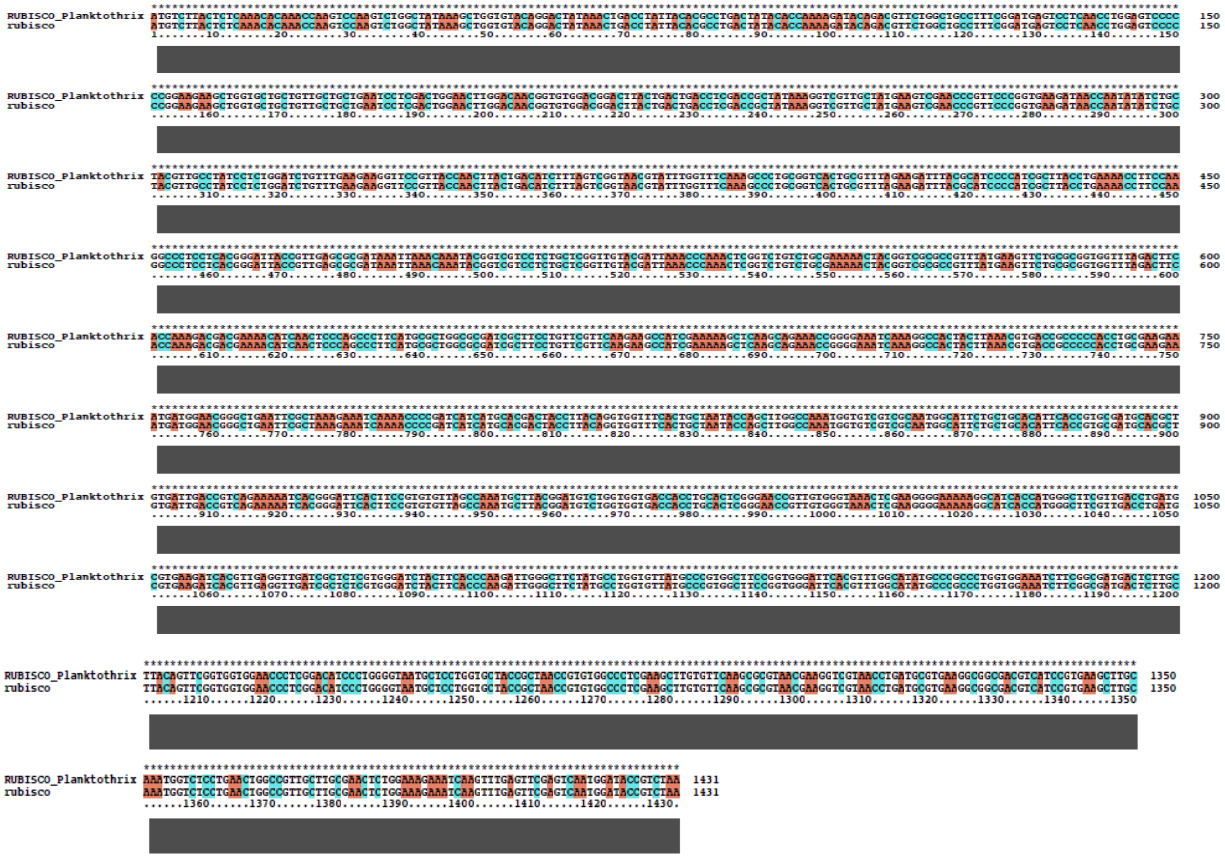


Figura 3. Comparación de la secuencia del gen RuBisCo de la cepa silvestre *P. agardhii* de la Laguna de Zumpango y de la cepa NIVA-CYA 15. Referencia: Elaboración propia.

A partir del análisis generado por la alineación de los genes del 16S rRNA, se generó utilizando el método Neighbour-joining, el árbol filogenético, presente en la Figura 5, observando una escala de la barra E=0.01 nucleótidos.

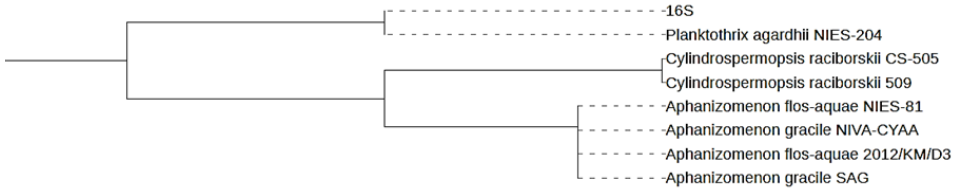


Figura 5. Arbol filogenético construido con la secuencia del gen 16S rRNA del estracto de *Planktothrix*, utilizando el método Neighbour-joining. La escala de la barra E=0.01 nucleótidos. Referencia: Elaboración propia.

Por los resultados arrojados del análisis morfológico y molecular del organismo aislado de la Laguna de Zumpango, podemos intuir que se trata de la especie *Planktothrix agardhii*.

4. Conclusiones y recomendaciones.

En el muestreo que se realizó a la Laguna de Zumpango, dentro del Valle de México, se identificó la presencia de la especie de cianobacteria filamentosa de la especies *Planktothrix agardhii* en la columna de agua, lo que se constató a través de su análisis morfológico y molecular, donde este último tuvo una identidad del 99.00 %, respecto a los genes 16S y RUBISCO de *P. agardhii*, del banco de genes del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

Al evaluar la producción de saxitoxina del cultivo de *P. agardhii* proveniente de la Laguna de Zumpango, se comprobó la presencia de saxitoxina en el cuerpo de agua de la Laguna de Zumpango, a una concentración por debajo de los límites máximos permisibles para agua de consumo humano, de acuerdo con la norma Americana de la Agencia de Protección Ambiental en OHIO (EPA por sus siglas en ingles).

Sin embargo, se debe considerar para futuras evaluaciones de la calidad del agua de la laguna de Zumpango, el análisis de la toxina para evitar un posible riesgo en la salud de la población o daño en el ecosistema.

Agradecimientos.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por la oportunidad de realizar este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiologìa Experimental, de la Facultad de Quìmica de la UNAM.

Se reconoce el apoyo técnido brindado por la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez y al IBT Jorge Gerardo Pichardo Velarde del laboratorio de Toxinas Marinas del Intituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM campus académico Mazatlán, en el correcto uso e implementación de la técnica ELISA para identificación de toxinas paralizantes de moluscos.

Al Dr. Eberto Novelo Maldonado del laboratorio de algas continentales de la Facultad de Ciencias de la UNAM, en la identificación morfológica de la cianobacteria estudiada.

Se reconoce el apoyo técnico brindado, para la realización de este trabajo al Dr. Pedro Alejandro de Jesus Magaña Melgoza y al M. en C. Luciano Hernández Gómez.

5. Referencias.

Adrinolo D. y Sedan D. (2011). *Cianotoxinas. Farmacología y efectos de las principales toxinas presentes en Argentina. Microcystina, Saxitoxinas, Anatoxinas, Cylindrospermopsinas, Lipopolisacáridos. Salud Ambiental*. Cianobacterias como determinantes ambientales de la Salud, Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación de Argentina. 1: 41-58.

Aguilera A. y Echenique R. O. (2011). *Consideraciones generales de Cianobacteria: aspectos ecológicos y taxonómicos.* Cianobacterias como determinantes ambientales de la Salud, Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación de Argentina. 1: 21-40.

American Public Health Association (APHA) (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* APHA 20th Edition.

Apeldoorn M. E. van, Egmond H. P. van, Speijers G. J. A. y Bakker G. J. I. (2007). *Toxins of cyanobacteria*. Mol. Nutr. Food Res. 51: 7-60.

Casero M.C., Ballot A., Agha R., Quesada A., Cirés S. (2014). *Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of sxt genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing Aphanizomenon gracile*. Harmful Algae. 37: 28-37.

Catarina C., Joana A., Vitor V. y Alexandra S. (2017). *Detection of Planktothrix agardii Bloom in Portuguese Marine Coastal Waters.* Toxins. 9,391.

Cirés S. y Quesada A. (2016). *ID-Tax Aphanizomenon gracile*. España: Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente. Disponible en: http://eportal.magrama.gob.es/id_tax/ficha/buscador/2/4670.

Cyanocenter UBA. Toxic cyanobacteria (2017). https://toxische-cyanobakterien.de/en/background-information/toxic-cyanobacteria/

Derbyshire Myra K., Gonzalez Noreen R., Lu Shennan, He Jane, Marchler Gabriele H., Wang Zhouxi y Marchler-Bauer Aron. (2015). *Improving the consistency of domain annotation within the Conserved Domain Database*. Database, 1-8.

Gad S. E. y Gad S. C. (2014). *Saxitoxin*. Elservier Inc. 3: 769-770.

Gaget V., Welker M. y Rippka R. (2015). *A polyphasic approach leading to the revision of the genus Planktothrix (Cyanobacteria) and its type species, P. agardhii, and proposal for integrating the emended valid botanical taxa, as well as three new species, Planktothrix paucivesiculata sp. nov.ICNP, Planktothrix tepida sp. nov.ICNP, and Planktothrix serta sp. nov.ICNP, as genus and species names with nomenclatural standing under the ICNP*. Syst Appl Microbiol. 38(3):141-58.

Huerto Delgadillo, Rubén (ed.) (2011). *Estudio ecosistémico del Lago de Pátzcuaro: aportes en gestión ambiental para el fomento del desarrollo sustentable*. IMTA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Hyatt D, PF Locascio, LJ Hauser y EC Uberbacher (2012). *Gene and translation initiation site prediction in metagenomics sequences.* Bioinformatics 17: 2223-2230.

Komárek J. y Anagnostidis K. (2005). Süsswasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota: 2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales. Vol. 19 pp. 1-759. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.

Kurmayer R., Deng L. y Entfellner E. (2016). *Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria Planktothrix. Harmful Algae, 54, 69–86.*

Lagos-Wilson (2014). Use an Application of a pharmaceutical composition containing a mixture of natural-origin heterocyclical guanidine, for cosmetology, wound heling, focal dystonia and muscular spasm-related clinical pathologies. Patent No. US 8,889,681 B2.

Landsberg, J. (2002). *The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms.*Rev. Fish. Sci. 10: 113-390.

Li X., Dreher T. W., Li R. (2016). *An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming Dolichospermum (Anabaena) species*. Harmful Algae. 54: 54-68.

Lopes K. C., Ferrão-Filho, E. G. N. Santos y Santos C. P. (2018). *First report of neurotoxic effect of the cyanobacterium Cylindrospermopsis raciborskii on the motility of trematode metacercariae*. Journal of Helminthology. 92: 244-249.

Mendoza-Reza C. y Luna-Pabello V. (2018). Guìa para la Determinaciòn de Microalgas y Cianobacterias de Importancia Ambiental. Laboratorio de microbiología Experimental, Facultad de Quìmica.

Microbial Culture Collection. (2016). *Strain Data Planktothrix agardhii*. Japón: Instituto Nacional de Estudios Ambientales..

Pomati F., Sacchi S., Rossetti C., Giovannardi S., Onodera H., Oshima Y. y Neilan B.A. (2000). The freshwater cyanobacterium Planktothrix sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. J. Phycol. 36: 553–562.

Price D., Kizer K., Hansgen K. (1991). California´s paralytic shellfish poisoning prevetion program, 1927-1989. J. Shelfish Res. 10: 119-145

Rosso L. y Giannuzzi L. (2011). *Factores ambientales y antropogénicos que afectan la formación de floraciones de cianobacterias y cianotoxinas.* Cianobacterias como determinantes ambientales de la Salud, Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación de Argentina. 1: 71-86.

Suda S., Watanabe MM, Otsuka S., Mahakahant A., Yongmanitchat W., Nopartnaraporn N., Liu Y., Day JG. (2002). *Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria.* Int J. Syst Evol Microbiol. 52: 1577-1595.

Teegarden G. J y Cembella A. D. (1996). *Grazing of toxic dinoflagellates, Alexandrium spp., by adult copepods of coastal Maine: Implications for the fate of paralytic shellfish toxins in marine food webs*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 196: 145-176.

Tooming-Klunderud A., Sogge H., Rounge TB., Nederbragt AJ., Lagesen K., Glöckner G., Hayes PK, Rohrlack T. y Jakobsen KS. (2013). *From Green to red: horizontal gene transer of the phycoerythrin gene cluster between Planktothrix strains*. Appl Eviron Microbiol. 79(21):6803-6812.

Vasconcelos V., Martins A., Vale M. Antunes A., Azevedo J., Welker M. Lopez O. y Montejano G. (2010). *First reporto n the occurrence of microcystins in plaktonic cyanobacteria from Central Mexico*. Toxicon. 56: 425-431.

Wiese M., D´Agostino P. M., Mihali T. K., M. Michelle C. y Neila B. A. (2010). *Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs*. Journal of Marine Drugs. 8: 2185-2211.

Zhang X., Kuca K. Dohnal V., Dohnalová L., Wu Q. y Wu C. (2014). *Military potential of biological toxins*. Journal of Applied Biomedicine. 12: 63-77.

Capítulo 21

EFECTO REPROTÓXICO Y TRANSGENERACIONAL DEL HERBICIDA DICAMBA EN EL MODELO BIOLÓGICO *Drosophila melanogaster*

Mendoza-Ortiz Eva Daniela [1*]

Ramos-Morales Patricia [1]

[1] Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental-Banco de Moscas. Ciudad Universitaria.

* dmendozaort@ciencias.unam.mx

Resumen

Resumen: Actualmente existe un uso desmedido de plaguicidas en el ambiente y no hay información suficiente de las consecuencias toxicológicas sobre los organismos. Dicamba es un herbicida sistémico, perteneciente a la familia de los ácidos benzoicos y clorofenoxi, que mimetiza las auxinas causando un desajuste en la división celular de la planta e interfiriendo con el transporte de nutrientes y fluidos, lo que deriva en la muerte de la planta. A pesar de que su organismo blanco no son los mamíferos, se han reportado efectos en el sistema nervioso y metabolismo de xenobióticos de éstos. En este trabajo se evaluó el potencial reprotóxico y transgeneracional de dicamba y su mezcla con aceite mineral (adyuvante recomendado) en el modelo biológico *Drosophila melanogaster* a lo largo de tres generaciones, con base en indicadores de sobrevivencia, proporción sexual, fertilidad y progenie promedio. Los resultados muestran que una sola exposición al herbicida y a su adyuvante afectan a la sobrevivencia de las moscas expuestas, tienden a disminuir la proporción de machos en la progenie. Aunque las moscas se expusieron sólo en una ocasión, se confirmaron diferencias significativas en la progenie por familia en las diferentes generaciones analizadas. Es indispensable incluir el análisis del impacto de los genotóxicos en generaciones posteriores a la de los organismos expuestos.

Palabras clave: Plaguicida; Reprotóxico, Transgeneracional; Drosophila; Dicamba.

1. Introducción

Drosophila melanogaster, perteneciente al orden Díptera y la familia Drosophilidae, comenzó su historia en la ciencia desde hace poco más de 100 años a lo largo de los cuales, se ha podido conocer sobre su biología y ha servido para establecer principios biológicos presentes también en el ser humano (Hales, Korey, Larracuente, & Roberts, 2015; Roberts, 2006). *Drosophila* ha sido el modelo experimental de importantes contribuciones dentro del campo científico en Medicina, Genética, Biología Celular, Biología del desarrollo, Entomología y Toxicología, entre otras (Stephenson & Metcalfe, 2013).

Entre las ventajas que han hecho a este modelo "la estrella del laboratorio" resaltan que es un organismo de ciclo de vida corto, y holometábolo lo cual significa que pueden observarse y diferenciarse cada una de sus etapas de su desarrollo hasta adulto; de progenie numerosa, fácil mantenimiento bajo condiciones controladas, costo accesible y genoma compacto, lo que ha facilitado que se pueda manipular genéticamente, además de que el 75% de éste está relacionado con genes ortólogos de enfermedades asociadas a humanos, esto último resaltando la importancia de que no sólo se puede lograr entender cómo los genes inducen estas enfermedades sino también la relación de los genes con éstas (Jennings, 2011; Roberts, 2006; Stephenson & Metcalfe, 2013; Tyler, 2000)

Drosophila es uno de los primeros modelos en ser utilizados en el campo de la mutagénesis y, en particular en la Toxicología Genética, rama de la Toxicología que estudia los cambios químicos, físicos o biológicos inducidos en el material hereditario (ADN) (Williams et al., 2000). Los insectos en general presentan la capacidad de metabolizar xenobióticos, sustancias que interactúan con el organismo y que no son parte de sus componentes naturales, mediante reacciones enzimáticas catalizadoras, que resultan ser análogas a las de los mamíferos (Baars, 1980; Repetto & Repetto, 2009). Particularmente en la mosca de la fruta se ha establecido la presencia del sistema de citocromos P-450, expresados en el tubo digestivo de la larva, aparato reproductor y tubos de Malpighi en los adultos, también presenta actividad de oxidación y actividad de glutatión-S-tranferasa, entre otras (Baars, 1980; Cochrane & LeBlanc, 2002; Hällström, Blanck, & Atuma, 1984; Yang et al., 2007). Lo anterior ha permitido estudiar la bioactivación de compuestos a intermediarios reactivos que pueden causar mutagenicidad, al igual que estudiar la desintoxicación de xenobióticos de manera más cercana (Baars, 1980).

La mosca presenta ventajas adicionales ya que existen similitudes en los procesos moleculares involucrados en el control del envejecimiento, la esperanza de vida, respuesta al estrés y metabolismo de xenobióticos entre ésta, el ser humano y otros organismos, además de las homologías genéticas que ya se encuentran bien

documentadas en la literatura y bases de datos (Abolaji, Kamdem, Farombi, & Rocha, 2013; Rand, Montgomery, Prince & Vorojeikina, 2015).

Ahora bien, los cambios químicos o físicos en el ADN pueden conllevar a eliminar genes, o bien, alterar sus funciones, y si no son letales, entonces derivaran en efectos heredables en la descendencia (Rim, 2017; Williams et al., 2000). Esto último es importante debido a que, aunque los cambios, en un principio no se reflejen ante la primera exposición de los individuos, no asegura que un agente no sea dañino, ya que sus efectos podrían reflejarse en su descendencia o después de varias generaciones, lo que podría derivar en un problema más serio. Actualmente, un tema central en la genética ha sido entender cómo la herencia de caracteres va vinculada con el estilo de vida y la exposición ambiental de los organismos, con el desarrollo de enfermedades y la expresión de ciertos fenotipos. El efecto provocado por agentes químicos, físicos y/o ambientales sobre las funciones de los sistemas reproductores, fertilidad de hembras y machos, así como también las modificaciones en el desarrollo de la progenie se denomina efecto reprotóxico (Gerhard, Jochen, Franz, & Dieter, 2006).

En la literatura se tiene registro de factores que se asocian con cambios que pueden ser transmitidos de generación en generación sin necesidad de una exposición directa o continua a éstos, lo que se conoce como efecto transgeneracional, entre estos factores se incluyen a agentes ambientales, comportamiento de los padres, fisiología materna, xenobióticos y condiciones nutrimentales, entre otros (Nadeau, 2009; Nelson & Nadeau, 2010).

Habría que distinguir entre efecto reprotóxico y efecto transgeneracional. El primero se aplica a todos aquellos cambios en el organismo o en su progenie que pueden ser explicados por la exposición directa del organismo al xenobiótico o, de manera indirecta, la exposición que ocurre en las células precursoras de células germinales contenidas en él. Por otra parte, el efecto es transgeneracional cuando, después exponer al organismo, se aprecian efectos en la descendencia a partir de la segunda o tercera generación, dependiendo del modelo utilizado (desarrollo interno como en mamíferos o externo, como en moscas) (Hanson & Skinner, 2016; Skinner, 2008). Este tipo de efectos se han reportado después del uso de insecticidas como DDT o malatión (Ffrench-Constant, 2013; Robin et al., 2017).

Un plaguicida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizadas con el objetivo de prevenir, destruir o mitigar el impacto de alguna plaga ya sean insectos, roedores, hierbas, bacterias, mamíferos o cualquier organismo que pueda transmitir alguna enfermedad o bien, causar algún tipo de daño en el ambiente o a los seres vivos (Klaassen, 2013; Yadav & Devi, 2017). Se clasifican en cuatro categorías principales (Yadav & Devi, 2017): 1) nivel de toxicidad aguda, 2) forma de entrada al organismo, 3) función y organismo u órgano blanco y 4) composición química. Los herbicidas pertenecen al rubro número tres y se definen

como aquellos químicos que son capaces de dañar o matar a las plantas, donde su principal blanco son las funciones metabólicas y la trasferencia de energía celular de la planta (Klaassen, 2013). Se pueden clasificar en selectivos y no selectivos. Los herbicidas selectivos son aquellos que no dañaran a los cultivos, mientras que los segundos dañarán a toda la vegetación (Dalgaard-Mikkelsen & Poulsen, 1962). De acuerdo con su forma de aplicación se agrupan como: herbicidas de contacto, herbicidas de translocación y herbicidas residuales (Dalgaard-Mikkelsen & Poulsen, 1962; Klaassen, 2013). En otra forma de clasificación, también se considera su estructura química.

Dicamba (3,6-dicloro-2-ácido metoxibenzoico) es un herbicida de acción sistémica perteneciente a la familia de los ácidos benzoico y clorofenoxi (FAO & WHO, 2011). Éste fue introducido durante la década de los 60´s en Estados Unidos como una alternativa al uso de glifosato, es usado para prevenir y controlar malezas de hoja ancha en campos de agricultura y actualmente se le usa también en áreas residenciales para controlar el crecimiento de hierbas venenosas (FAO & WHO, 2011; Hartzler, 2017). Dado que es un herbicida sistémico, éste es absorbido por la raíz u hojas de la planta y después es transportado a todo el organismo.

Su modo de acción es mediante la mimetización de auxinas, fitohormonas responsables del crecimiento de la planta, por un proceso en cascada en el que interfiere con la plasticidad de la pared celular, el metabolismo y los ácidos nucleicos, provocando el rápido crecimiento de nuevas células y al mismo tiempo una sobrepoblación de células viejas, lo que deriva en un desajuste en la tasa de división celular de la planta, turgencia, diferenciación celular y transporte de nutrientes y fluidos, para terminar con la muerte de la planta (Bunch T, Gervais J, Buhl K, & Stone D, 2012; Cox, 1994; FAO & WHO, 2011).

En mamíferos, dicamba se comporta como un neurotóxico por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa lo que provoca que el neurotransmisor acetilcolina se acumule y evite la transmisión de impulsos nerviosos (Cox, 1994), provoca un desajuste en el metabolismo mediante –la aceticoenzima-A-, y finalmente daño en la fosforilación oxidativa de la célula (Bunch T, Gervais J, Buhl K, & Stone D, 2012). De acuerdo con Cox (1994), también inhibe la actividad de enzimas presentes en el hígado, e interfiere con la desintoxicación de xenobióticos. En adición a lo anterior, se ha reportado su actividad como genotóxico, ya que incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica humana e induce la reparación del material genético por síntesis de ADN no programada en estudios *in vitro* (Toxicology Data Network, 2017).

Para incrementar la actividad y la eficacia de un herbicida se recomienda hacer uso de un adjuvante, el cual se define como aquella sustancia que modifica la acción del ingrediente activo principal (Curran, McGlamery, Liebl, & Lingenfelter,

1999); sin embargo, muchas veces éstos presentan un daño potencial a organismos que no son su blanco (Freydier & Lundgren, 2016).

Dicamba es el tercer herbicida más usado a nivel mundial y a pesar de ello no se cuenta con suficiente información sobre su toxicidad. Se han reportado efectos en diversos animales, tanto invertebrados como vertebrados; en mamíferos tiene potencial como neurotóxico y genotóxico. Hasta ahora, no se cuenta con información acerca de la toxicidad de la interacción entre el dicamba y su adyuvante de aceite mineral recomendado para incrementar la eficacia del herbicida contra plantas de hoja ancha en animales. Es impostergable evaluar el potencial tóxico, reprotóxico y transgeneracional del dicamba y su adyuvante en modelos animales.

Hipótesis:

Una sola exposición al herbicida dicamba provocará efectos en la sobrevivencia de los organismos, así como también alteraciones a nivel reproductivo, que podrían ser detectadas en las generaciones siguientes.

El objetivo general de este trabajo es establecer el efecto reprotóxico y transgeneracional del herbicida dicamba, su adyuvante de aceite mineral y la mezcla de éstos en el modelo biológico *Drosophila melanogaster.*

Se evaluó la sobrevivencia de los organismos expuestos y se determinó si existe algún efecto preferencial en alguno de los dos sexos. Posteriormente se recobraron las generaciones F_2 y F_3 para determinar si alguno de los bioindicadores utilizados (fertilidad, progenie promedio y proporción sexual) muestra niveles diferentes a los del testigo concurrente.

2. Material y métodos:

Reactivos y sustancias:

Se utilizó el herbicida dicamba junto con su adyuvante de aceite mineral. (Marvel® Syngenta, presentación líquida.CAS: 1918-00-9 Registro EPA: 7969-136) como compuestos. Se utilizó sacarosa al 20%, agua destilada como disolvente y como testigo negativo.

Cepas:

Se utilizó como modelo biológico a moscas silvestres de *Drosophila melanogaster*, cepa Canton-S.

Sincronización de cepa:

Para que la respuesta de los organismos al compuesto sea lo más homogénea posible, no interfiera la edad y tengan un estado metabólicamente activo, se sincronizaron moscas de un cultivo maduro, durante 8 horas, en medio estándar (agar 0.6%, harina de maíz 6%, sacarosa 7.6%, levadura desamargada 4.1% y agua 81.7%). Este procedimiento consistió en obtener huevos con una diferencia de 4 horas en la edad, después se retiró a las moscas progenitoras y se dejó que los organismos se desarrollaran hasta la etapa larvaria de 72 h (3^{er} estadio).

El día de la exposición las larvas fueron extraídas por el método de Nöthiger (1970), el cual consiste en separar a las larvas del medio utilizando un gradiente de densidad con solución de sacarosa concentrada al 20%. Estas larvas fueron vertidas en un embudo de separación de 3-4mm de diámetro, se retiraron residuos de medio de cultivo, se enjuagaron con agua corriente y posteriormente se recuperaron en una malla de nylon.

Tratamiento:

La exposición fue subcrónica, por alimentación (72 x 48 h). Se prepararon 10 diluciones sucesivas del compuesto y de su adyuvante, en un rango de 5.28 a 1.22E-08 ppm. Se utilizó 1g de medio de cultivo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply), el cual fue hidratado con 4.5 ml de cada concentración de dicamba, aceite mineral o dicamba + aceite mineral, como testigo negativo se utilizó agua destilada. Por cada concentración y testigo se realizaron 2 réplicas para obtener un total de 22 tubos, en cada tubo se colocaron entre 90-100 larvas.

Se esperó a que emergieran los adultos, se contabilizó el número de hembras y machos por tubo para cada concentración y se revisó la morfología externa de las moscas.

Cruzas experimentales:

Para evaluar si el tratamiento afecta la capacidad reproductiva de las moscas expuestas se escogieron aleatoriamente 10 parejas por concentración 1:1 (hembra: macho) para obtener la F_1 y posteriormente se realizaron las cruzas F_1xF_1 (efecto multigeneracional) y F_2xF_2 siguiendo el mismo sistema hasta obtener la F_3 (efecto transgeneracional). Cabe destacar que una vez sembradas las parejas se dejaron 7 días y después se retiraron para evitar el traslape de las generaciones. Se determinó la fertilidad y el promedio de hijos por familia de las moscas expuestas, de las F_1 y las F_2.

Análisis de resultados:

Para determinar la toxicidad del tratamiento se contabilizó el número de moscas recobradas por tubo y se obtuvo el promedio de la sobrevivencia:

$$\text{Sobrevivencia promedio} = \frac{\#\text{moscas/tubo}}{\#\text{tubos}}$$

Para cada tratamiento se comparó el promedio de moscas por concentración mediante un ANOVA de dos vías con $\alpha = 0.05$. En caso de obtener diferencias significativas se calculó la prueba post hoc de Tukey, con $\alpha = 0.05$.

Se obtuvo la frecuencia de hembras y machos en las moscas recobradas del tratamiento, así como en las generaciones analizadas de la siguiente manera:

$$\text{Proporción Sexual hembra o macho} = \frac{\#\text{moscas hembras o machos/tubo}}{\#\text{total de moscas por tubo}}$$

Se comparó la frecuencia de cada sexo mediante un ANOVA de una vía con un $\alpha = 0.05$. En caso de obtener diferencias significativas se calculó la prueba post hoc de Dunnett, con $\alpha = 0.05$.

Para determinar la fertilidad por familia se contabilizó el número de tubos con hijos.

$$\text{Fertilidad} = \frac{\#\text{tubo con progenie}}{\#\text{tubo sembrado}}$$

La frecuencia de tubos fértiles entre las series tratadas y el testigo correspondiente se compararon mediante una Z para proporciones, con $\alpha = 0.05$.

Finalmente, para determinar la progenie por familia se contabilizó el número de moscas recobradas por tubo de cada concentración y se obtuvo el promedio.

$$\text{Progenie promedio} = \frac{\#\text{moscas/tubo}}{\#\text{tubos}}$$

Se comparó el promedio de la progenie mediante un ANOVA de una vía con un $\alpha = 0.05$. En caso de obtener diferencias significativas se calculó la prueba post hoc de Dunnett, con $\alpha = 0.05$.

3. Resultados

De acuerdo con los objetivos planteados, los resultados se dividieron en dos partes: 1) Comparar y evaluar la toxicidad del herbicida, el del aceite mineral por sí solo y el de su mezcla en los organismos expuestos con base en los indicadores de sobrevivencia y proporción sexual. También se evaluó su potencial para alterar la capacidad reproductiva mediante la fertilidad y la progenie promedio por familia de las moscas expuestas y la primera generación (F_1, exposición multigeneracional, efecto reprotóxico). 2) Valorar posibles efectos en la progenie no expuesta de los organismos tratados (F_2 y F_3) (efecto transgeneracional).

Toxicidad y actividad reprotóxica:

Se determinó el efecto el tratamiento en la sobrevivencia y capacidad reproductiva de los organismos tratados directamente (Parentales) y en la primera generación de descendientes (F_1) que fueron expuestos de manera indirecta, ya que las larvas que se sometieron a tratamiento ya tienen a las células precursoras de las células sexuales a partir de las que se origina la siguiente generación.

Los resultados del efecto de dicamba, aceite mineral y dicamba + aceite en la sobrevivencia se presentan en la tabla 1. El tratamiento con dicamba afectó la sobrevivencia a partir de 9.83E-08 ppm, mientras que en el tratamiento con aceite se recobró menor sobrevivencia en 6.29E-06 ppm y de 4.03E-04 ppm en adelante. La interacción dicamba + aceite, sólo disminuyó la sobrevivencia en la concentración más alta probada (2.06E-01 ppm) y en las concentraciones 9.83E-08 y 2.58E-02 ppm, ésta fue mayor que la del testigo. Para valorar el efecto de la concentración y del tratamiento (dicamba, aceite mineral y dicamba + aceite) en la sobrevivencia promedio se realizó un ANOVA de dos vías sin encontrar diferencias significativas ($p>0.05$).

En la figura 1 se muestra la sobrevivencia obtenida en los tres tratamientos. Para una mejor comparación, la sobrevivencia de cada lote se dividió entre su lote testigo correspondiente, de manera que todos los testigos tendrán un valor de 1.

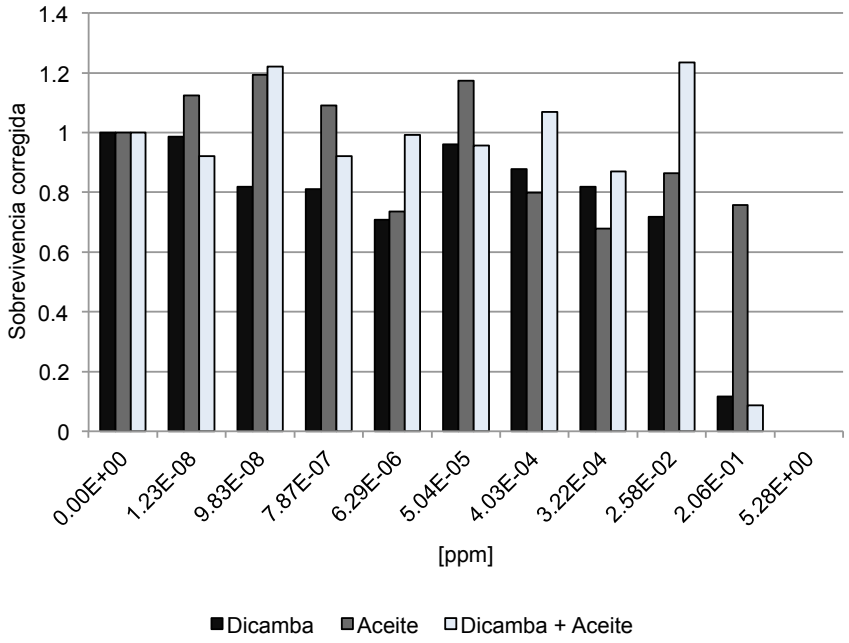


Fig.1. Sobrevivencia corregida de los organismos tratados.

No se obtuvieron diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$ ($F=0.611$ y $p=0.54$).

De elaboración propia.

En términos de organismos recuperados se encontró que la exposición a dicamba tiende a disminuir la sobrevivencia a partir de la primera concentración y hasta 6.29E-06 ppm; sin embargo, en la concentración 5.04E-05 ppm se recupera una cantidad casi igual que en el testigo y a partir de ahí de nuevo se recupera un menor número de moscas, el efecto es más evidente en 2.06E-01 y en 5.28E+00 ppm donde ya no se recuperaron organismos.

La fertilidad de las moscas sobrevivientes no fue afectada por los tratamientos de dicamba, aceite y dicamba + aceite. La capacidad reproductiva se valoró mediante el promedio de progenie por familia. Para cada tratamiento se comparó el promedio de progenie por familia con un ANOVA de una vía y posteriormente una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett contra su testigo. El tratamiento con dicamba afectó negativamente la cantidad de progenie F_1 en las concentraciones 7.87E-07, 5.04E-05, 3.22E-04 y 2.58E-02 ppm.

En el tratamiento con aceite se recuperó una cantidad de moscas similar o ligeramente mayor al testigo, excepto en la concentración 6.29E-06 ppm, en la que se recuperaron menos moscas que en el testigo, no obstante, no se confirmaron diferencias significativas.

En el caso de la interacción del aceite con el herbicida, se encontró que en general, el número de moscas que se recobró fue similar al lote testigo, excepto en 9.8E-08 y en 2.58E-02 ppm en las que se recobraron más y en 2.06E-01 ppm, en la que se recobraron menos moscas, aunque no se confirmaron diferencias significativas.

Efecto transgeneracional:

Para determinar si el tratamiento a los parentales tiene efecto en las siguientes generaciones (no expuestas), se realizaron cruzas entre los organismos F_1, para obtener a la F_2 y finalmente a la F_3. A continuación se muestran los resultados obtenidos, por generación, en cada uno de los tratamientos (tabla 2).

La cantidad de progenie F_2 (que proviene de la cruza entre moscas F_1 X F_1, expuestas de manera indirecta) fue menor que la del testigo (114.05) en las moscas derivadas del tratamiento parental con dicamba + aceite de las concentraciones 1.23E-08 y 6.29E-06 ppm (75.47 y 70.0, respectivamente), sin embargo, no se confirmaron diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$).

En la F_3 (que proviene de la cruza de moscas F_2 X F_2, no expuestas), se recobró menos progenie en las moscas derivadas del tratamiento con dicamba a la concentración 5.04E-05 ppm (69.97); en la progenie derivada del tratamiento de aceite se recuperó mayor cantidad de progenie en 3.22E-04 ppm (129.20), comparado con la cantidad de progenie del testigo (89.10) (ANOVA, $p<0.05$; Dunnett, $p<0.05$); no se encontraron diferencias en las moscas descendientes del tratamiento con dicamba + aceite.

Para evaluar la fertilidad de las moscas expuestas al tratamiento y sus testigos correspondientes en cada generación se realizó una prueba de z para proporciones (tabla 1 y 2). No se presentaron diferencias en la fertilidad de las moscas parentales tratadas con dicamba, aceite o dicamba + aceite ($p>0.05$). a) Solo en la F_1 de las moscas tratadas indirectamente con dicamba la fertilidad fue menor en las concentraciones 1.23E-08 y 7.87E-07 ppm (Z, $p>0.05$). El tratamiento con aceite afectó significativamente la fertilidad de la progenie F_1 en las concentraciones 7.87E-07, 6.29E-06, 3.22E-04, 2.06E-01 ppm (Z, $p<0.05$), mientras que no afectó la fertilidad de la progenie F_2.

En los otros tratamientos y generaciones analizadas no se encontraron efectos en la fertilidad.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la proporción sexual promedio de los parentales expuestos y de cada generación. No se encontraron diferencias en la proporción sexual de las moscas sobrevivientes y de las progenies analizadas (ANOVA de una vía, $p>0.05$).

Tabla 1. Resultados (promedio ± e.e) de los progenitores y F_1 (exposición multigeneracional) respecto a los esquemas del compuesto. De elaboración propia

a) DICAMBA										
	Progenitores					F1				
[ppm]	N	Sobrevivencia. (promedio ± e.e)			Fet	N	Progenie/familia (promedio ± e.e)			FeF_1
0.00E+00	205	51.25	±	8.81	1.00	2246	122.30	±	5.46	1.00
1.23E-08	202	50.50	±	10.84	1.00	2076	103.80	±	6.58	0.85
9.83E-08	168	42.00	±	1.35	0.90	1729	96.06	±	8.71	0.95
7.87E-07	166	41.50	±	4.66	1.00	1793	89.65*	±	9.01	0.85
6.29E-06	145	36.25	±	7.47	1.00	1915	95.75	±	6.78	0.95
5.04E-05	197	49.25	±	5.34	1.00	1755	87.75*	±	8.54	0.95
4.03E-04	180	45.00	±	6.79	1.00	1942	97.10	±	9.62	0.90
3.22E-04	168	42.00	±	2.55	1.00	1738	86.90*	±	7.82	0.90
2.58E-02	147	36.75	±	6.60	1.00	1799	89.95*	±	8.56	0.95
2.06E-01	6	6.00	±	0.00	0.00	0				
b) ACEITE										
0.00E+00	243	60.75	±	12.06	1.00	1976	98.80	±	7.76	0.90
1.23E-08	273	68.25	±	21.82	1.00	1873	93.65	±	9.65	0.85
9.83E-08	290	72.50	±	20.27	1.00	2232	111.60	±	9.66	1.00
7.87E-07	265	66.25	±	16.39	1.00	2190	109.50	±	7.58	0.80*
6.29E-06	179	44.75	±	10.66	1.00	1858	92.90	±	8.82	0.80*
5.04E-05	285	71.25	±	23.48	1.00	1966	98.30	±	10.43	0.85
4.03E-04	194	48.50	±	11.93	0.90	1740	96.67	±	10.17	0.85
3.22E-04	165	41.25	±	13.48	1.00	2051	102.55	±	10.16	0.70*
2.58E-02	210	52.50	±	9.14	1.00	2063	103.15	±	9.77	0.85
2.06E-01	128	42.67	±	7.01	0.95	1733	91.21	±	6.74	0.80*
c) DICAMBA + ACEITE										
0.00E+00	231	57.75	±	5.11	0.95	1799	94.68	±	9.93	1.00
1.23E-08	213	53.25	±	12.22	1.00	1910	95.50	±	10.16	0.95
9.83E-08	282	70.50	±	12.60	1.00	2032	101.60	±	9.00	0.85
7.87E-07	213	53.25	±	12.30	0.95	2057	108.26	±	10.38	0.90
6.29E-06	229	57.25	±	12.82	1.00	1815	90.75	±	9.14	0.80*
5.04E-05	221	55.25	±	13.64	0.95	1488	78.32	±	10.39	0.90
4.03E-04	247	61.75	±	14.37	0.95	1970	103.68	±	13.36	0.95
3.22E-04	201	50.25	±	15.19	1.00	1653	82.65	±	11.83	0.85
2.58E-02	285	71.25	±	19.76	0.95	1742	91.68	±	8.03	0.95
2.06E-01	5	5.00*	±	0.00	0,00	0				

N. Número total de moscas; Ft. Fertilidad de moscas tratadas; FeF_1. Fertilidad moscas F_1.

Los * indican diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$ ($p<0.05$) contra su testigo.

Tabla 2. Resultados (promedio ± e.e) de las generaciones F_2 y F_3 (efecto transgeneracional) respecto a los esquemas del compuesto. De elaboración propia.

a) DICAMBA									
	F2					F3			
[ppm]	N	Progenie/familia (promedio ± e.e)			FeF_2	N	Progenie/familia (promedio ± e.e)		
0.00E+00	2084	104.20	±	12.43	0.95	2145	112.89	±	9.51
1.23E-08	1731	101.82	±	10.04	0.95	2000	105.26	±	9.72
9.83E-08	1989	104.68	±	13.28	1.00	2349	117.45	±	10.65
7.87E-07	1439	84.65	±	10.87	1.00	1865	93.25	±	10.69
6.29E-06	1619	85.21	±	10.05	0.95	1976	104.00	±	11.16
5.04E-05	1205	63.42	±	11.07	0.90	1254	69.67*	±	9.35
4.03E-04	1604	89.11	±	14.99	0.95	2099	110.47	±	6.32
3.22E-04	1615	89.72	±	11.97	0.90	2043	113.50	±	11.07
2.58E-02	1854	97.58	±	11.62	1.00	1974	98.70	±	13.70
2.06E-01	0					0			
b) ACEITE									
0.00E+00	1634	90.78	±	10.69	1.00	1782	89.10	±	7.24
1.23E-08	1241	73.00	±	10.16	0.90	1741	96.72	±	7.93
9.83E-08	1028	51.40	±	6.52	1.00	1570	78.50	±	7.64
7.87E-07	887	55.44	±	10.00	0.90	1694	94.11	±	11.34
6.29E-06	1087	67.94	±	12.49	0.95	1738	91.47	±	7.81
5.04E-05	790	46.47	±	10.01	0.95	1831	96.37	±	10.72
4.03E-04	1518	89.29	±	9.77	0.95	1970	103.68	±	9.93
3.22E-04	1530	109.29	±	18.63	1.00	2584	129.20*	±	7.33
2.58E-02	1250	73.53	±	11.50	1.00	2016	100.80	±	10.70
2.06E-01	1209	75.56	±	11.25	0.90	1816	100.89	±	8.80
c) DICAMBA + ACEITE									
0.00E+00	2281	114.05	±	9.66	0.95	2355	123.94	±	10.68
1.23E-08	1434	75.47	±	11.88	1.00	2467	123.35	±	10.62
9.83E-08	1332	78.35	±	11.11	0.90	1920	106.66	±	11.90
7.87E-07	1449	80.50	±	10.09	0.95	2096	110.31	±	9.67
6.29E-06	1120	70.00	±	11.47	0.90	1888	104.88	±	10.84
5.04E-05	1387	77.06	±	9.10	1.00	1839	91.95	±	9.40
4.03E-04	1676	88.21	±	10.64	0.90	1777	98.72	±	13.03
3.22E-04	1297	76.29	±	9.17	0.95	1894	99.68	±	11.16
2.58E-02	1525	80.26	±	7.88	0.95	1865	98.15	±	11.92
2.06E-01	0					0			

N, Número total de moscas; FeF_2 Fertilidad moscas F_2

Los * indican diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$ ($p<0.05$) contra su testigo.

Tabla 3. Resultados proporción sexual (promedio ± e.e) de cada generación respecto a los esquemas del compuesto. De elaboración propia.

[ppm]	Progenitores Proporción sexual (promedio ± e.e)						F1 Proporción sexual (promedio ± e.e)						F2 Proporción sexual (promedio ± e.e)						F3 Proporción sexual (promedio ± e.e)					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos			Hembras			Machos			Hembras			Machos		
a) Dicamba																								
0.00E+00	0.52	±	0.05	0.47	±	0.05	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02	0.54	±	0.01	0.47	±	0.01
1.23E-08	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01	0.50	±	0.01	0.49	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
9.83E-08	0.49	±	0.03	0.50	±	0.03	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01	0.53	±	0.03	0.46	±	0.03	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
7.87E-07	0.58	±	0.04	0.41	±	0.04	0.53	±	0.01	0.47	±	0.01	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02	0.50	±	0.01	0.49	±	0.01
6.29E-06	0.55	±	0.02	0.44	±	0.02	0.56	±	0.01	0.43	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.04	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01
5.04E-05	0.54	±	0.02	0.45	±	0.02	0.57	±	0.01	0.43	±	0.01	0.54	±	0.02	0.45	±	0.04	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
4.03E-04	0.52	±	0.04	0.47	±	0.04	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01	0.55	±	0.03	0.44	±	0.03	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01
3.22E-04	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01	0.52	±	0.02	0.50	±	0.03	0.54	±	0.02	0.45	±	0.02	0.53	±	0.02	0.46	±	0.02
2.58E-02	0.49	±	0.01	0.50	±	0.01	0.55	±	0.01	0.44	±	0.06	0.51	±	0.02	0.48	±	0.02	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02
2.06E-01	0.66	±	0.00	0.33	±	0.00	0			0			0			0			0			0		
b) Aceite																								
0.00E+00	0.56	±	0.02	0.43	±	0.02	0.52	±	0.01	0.48	±	0.01	0.56	±	0.02	0.46	±	0.01	0.55	±	0.02	0.44	±	0.02
1.23E-08	0.54	±	0.03	0.45	±	0.03	0.56	±	0.02	0.40	±	0.02	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
9.83E-08	0.52	±	0.03	0.47	±	0.03	0.53	±	0.01	0.47	±	0.01	0.57	±	0.02	0.42	±	0.02	0.50	±	0.02	0.52	±	0.03
7.87E-07	0.48	±	0.04	0.51	±	0.04	0.49	±	0.01	0.50	±	0.01	0.54	±	0.03	0.45	±	0.03	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01
6.29E-06	0.47	±	0.03	0.52	±	0.03	0.55	±	0.02	0.44	±	0.02	0.56	±	0.03	0.46	±	0.02	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02
5.04E-05	0.49	±	0.03	0.50	±	0.03	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01	0.58	±	0.03	0.41	±	0.03	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01
4.03E-04	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.55	±	0.02	0.44	±	0.02	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01
3.22E-04	0.53	±	0.02	0.46	±	0.02	0.53	±	0.02	0.46	±	0.02	0.50	±	0.01	0.49	±	0.01	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01
2.58E-02	0.50	±	0.04	0.49	±	0.04	0.55	±	0.03	0.44	±	0.03	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01	0.54	±	0.008	0.45	±	0.008
2.06E-01	0.49	±	0.07	0.51	±	0.07	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01	0.56	±	0.03	0.46	±	0.01	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01
c) Dicamba +Aceite																								
0.00E+00	0.50	±	0.004	0.49	±	0.004	0.54	±	0.02	0.45	±	0.02	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.51	±	0.01	0.48	±	0.01
1.23E-08	0. 53	±	0.02	0.46	±	0.02	0.57	±	0.01	0.42	±	0.01	0.50	±	0.02	0.49	±	0.02	0.53	±	0.02	0.46	±	0.02
9.83E-08	0.49	±	0.02	0.5	±	0.02	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
7.87E-07	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01	0.54	±	0.02	0.45	±	0.02	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02	0.57	±	0.01	0.42	±	0.01
6.29E-06	0.45	±	0.03	0.54	±	0.03	0.53	±	0.03	0.46	±	0.03	0.51	±	0.01	0.48	±	0.01	0.53	±	0.01	0.47	±	0.01
5.04E-05	0.49	±	0.04	0.50	±	0.04	0.52	±	0.01	0.47	±	0.01	0.46	±	0.02	0.53	±	0.02	0.50	±	0.01	0.49	±	0.03
4.03E-04	0.51	±	0.05	0.48	±	0.05	0.53	±	0.01	0.48	±	0.03	0.56	±	0.03	0.46	±	0.02	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01
3.22E-04	0.51	±	0.02	0.48	±	0.02	0.54	±	0.01	0.45	±	0.01	0.52	±	0.02	0.47	±	0.02	0.58	±	0.03	0.48	±	0.01
2.58E-02	0.48	±	0.01	0.51	±	0.01	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01	0.53	±	0.01	0.46	±	0.01	0.55	±	0.01	0.44	±	0.01
2.06E-01	0.60	±	0.00	0.40	±	0.00	0			0			0			0			0			0		

No se obtuvieron diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$ ($p<0.05$) contra su testigo.

Las figuras 2, 3 y 4 muestran la sobrevivencia corregida y la progenie por familia corregida por cada generación, con la finalidad de compararlas y comprobar la existencia de algún patrón en el efecto, con respecto al tratamiento administrado a las moscas progenitoras.

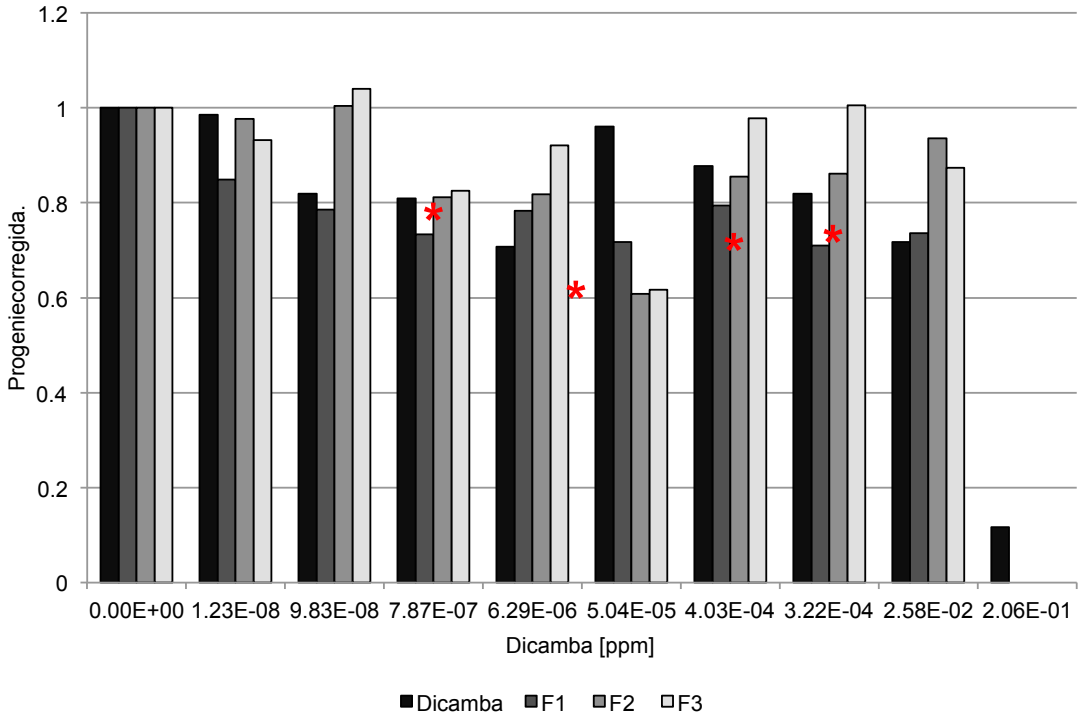
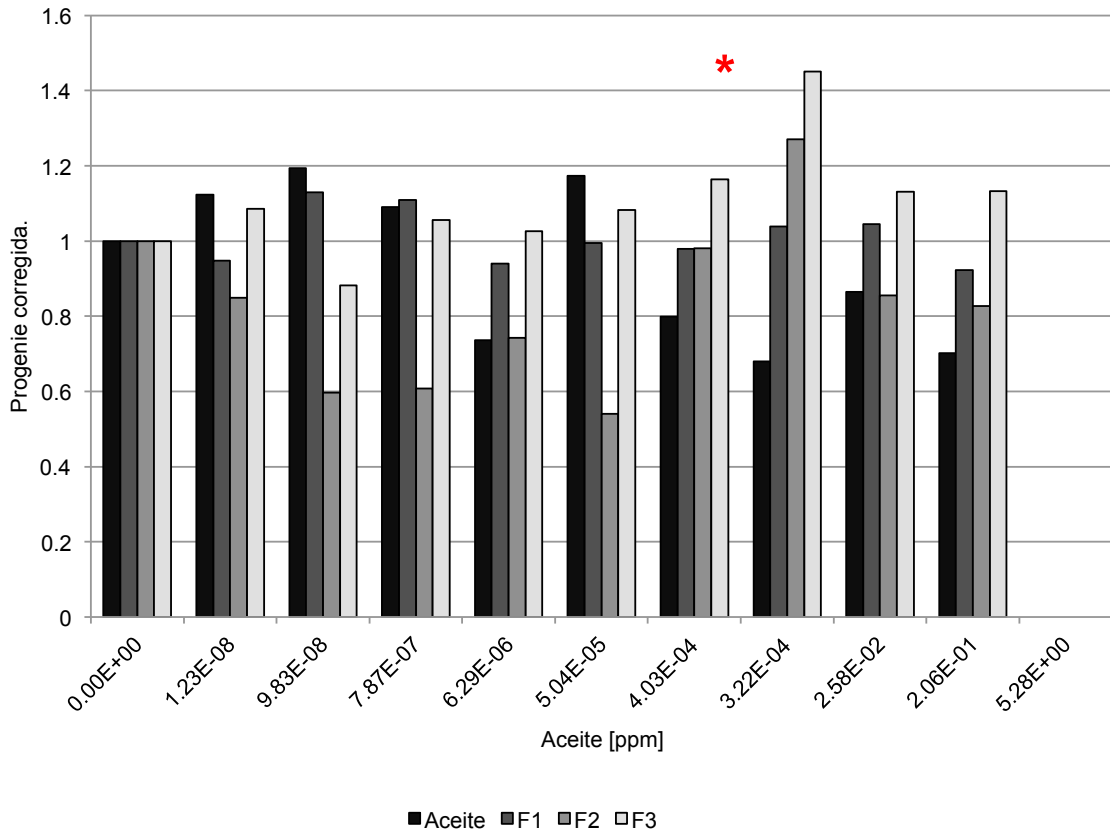


Fig 2. Sobrevivencia de moscas tratadas con dicamba y progenie por familia (corregidas) en las generaciones F_1, F_2 y F_3. El * indica diferencias significativas con un α= 0.05 (Parentales F= 0.70 p= 0.68, F_1 F=1.93 p= 0.05, F_2 F= 1.22 p=0.29 y F_3 F=1.87 p=0.06) contra su testigo. De elaboración propia.

En la figura 2 se muestra la progenie corregida de moscas tratadas con dicamba, la progenie por familia en las tres generaciones siguientes y se señalan las diferencias significativas obtenidas en las generaciones analizadas, como se indicó previamente. En resumen, sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la F_1 en 7.87E-07, 5.04E-05, 3.22E-04 y 2.58E-02 ppm, así como también en la F_3 en 5.04E-05 ppm.



.Fig. 3. Sobrevivencia de moscas tratadas con aceite y progenie por familia (corregidas) en las generaciones F_1, F_2 y F_3. El * indica diferencias significativas con un α= 0.05 (Parentales F= 0.58 p= 0.79, F_1 F=0.56 p= 0.82, F_2 F= 2.73 p=0.005 y F_3 F=2.91 p=0.02, contra su testigo. De elaboración propia

En la figura 3 se compara la sobrevivencia de moscas tratadas con aceite y la progenie por familia recuperada en las siguientes generaciones, ambas corregidas para que los testigos sean 1. Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía ($p<0.05$) y después con una prueba de comparaciones múltiples Dunnett, comparando cada concentración contra su respectivo testigo en cada generación, a pesar de que en la F_2 el valor del ANOVA fue significativo ($p<0.05$), no se lograron confirmar las diferencias en las comparaciones posteriores; sin embargo, sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la F_3 en una de las concentraciones más altas (3.22E-04 ppm). Llama la atención que en las concentraciones 4.03E-04 y 3.22E-04 ppm se aprecia recuperación en el número

de moscas por familia que se registran, siendo los promedios de hijos por familia en la F_3, mayores que los de su testigo.

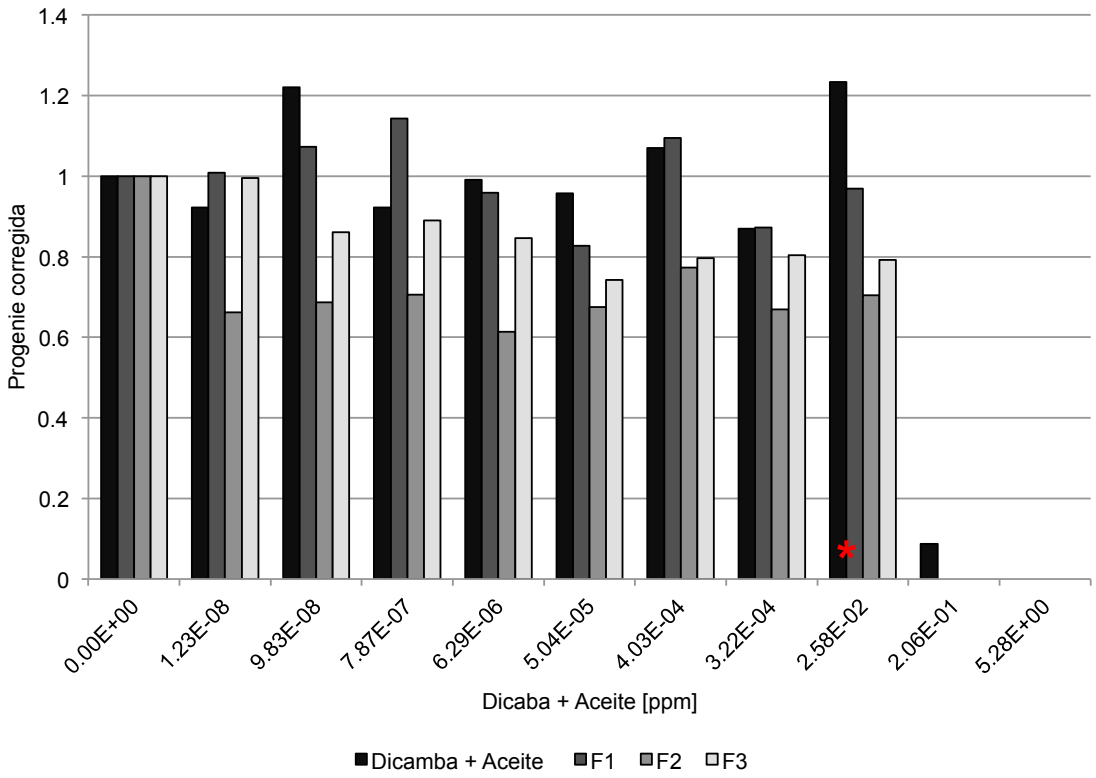


Fig. 4. Sobrevivencia de moscas tratadas con dicamba + aceite y progenie por familia (corregidas) en las generaciones F_1, F_2 y F_3. No se obtuvieron diferencias significativas con un α= 0.05 (Parentales F= 0.41 p= 0.90, F_1 F=0.86 p= 0.54, F_2 F= 1.71 p=0.10 y F_3 F=1.05 p=0.40) contra su testigo. De elaboración propia.

La figura 4 muestra la sobrevivencia de las moscas tratadas con la interacción de dicamba + aceite y la progenie corregida de generaciones siguientes. Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía comparando cada concentración contra su respectivo testigo por generación. El tratamiento con dicamba + aceite sólo resulta tóxico a partir de 2.06E-01 ppm en las moscas expuestas en el estadio larvario ($p<0.05$). En la F_1 se encontraron menores promedios de progenie por familia en 5.04E-05 y 3.22E-04 ppm; sin embargo, no se confirmaron las diferencias. A pesar de que sólo las moscas parentales estuvieron expuestas a dicamba + aceite, se encontró que en la F_2 de todas las

series experimentales el promedio de progenie por familia fue menor al del testigo, pero tampoco se pudieron confirmar las diferencias. En la $F_{3,}$ este efecto se mantiene a partir de 9.83E-08 ppm, aunque menos severo.

4. Discusión.

Dicamba es considerado el tercer herbicida más usado a nivel mundial, y a pesar de ello todavía no se cuenta con suficiente información sobre su toxicidad (Ruiz de Arcaute, Larramendy, & Soloneski, 2018). A lo largo de los años se han realizado estudios acerca de los efectos de la exposición, tanto aguda como crónica; algunos pocos arrojando resultados positivos, evaluando su toxicidad reproductiva, genotoxicidad, citotoxicidad, efectos teratogénicos y efectos neurotóxicos en modelos biológicos de ratas, hámster y peces, entre otros (Bunch T et al., 2012; González, Soloneski, & Larramendy, 2007; Ruiz de Arcaute et al., 2018; Ullrich, 1999). Sin embargo, hasta ahora no se han hecho estudios para documentar los efectos de la interacción con el adyuvante aceite mineral, recomendado para incrementar la eficacia del compuesto y su absorción en las plantas de hoja ancha.

En este trabajo se determinó la toxicidad del dicamba, el aceite adyuvante y la interacción del dicamba con el aceite. Se analizaron diferentes bioindicadores para: toxicidad (sobrevivencia), la interferencia en la actividad reproductiva (fertilidad y cantidad de progenie) con los que se evaluó el impacto de la exposición directa o indirecta (la que ocurre en las células primordiales de las células germinales de los organismos expuestos) y en una segunda parte, se dio seguimiento a dos generaciones más en las que ya no ocurre ni exposición directa ni indirecta a los tratamientos, esto con la finalidad de documentar si existen evidencias de un efecto a largo plazo de la exposición inicial.

Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticas en varios de los contrastes, cualitativamente se aprecia que el tratamiento con dicamba afectó negativamente la sobrevivencia en la mayoría de las concentraciones, la respuesta no fue proporcional con las concentraciones y se obtienen dos rangos de concentraciones en los que la sobrevivencia disminuye gradualmente, el primero va de 1.23E-08 a 6.29E-06 ppm y el segundo a partir de 5.04E-05 ppm a las concentraciones mayores, donde nuevamente la sobrevivencia disminuye gradualmente, en 2.06E-01 ppm se recuperan muy pocas moscas y la concentración 5.28E+00 ppm resulta letal (Fig. 1). Este patrón de respuesta

sugiere la presencia de un efecto umbral que se ubicaría entre las concentraciones 6.29E-06 ppm y 5.04E-05 ppm. Así, la concentración y 5.04E-05 resulta menos tóxica que la anterior (6.29E-06 ppm), esto podría explicarse por el fenómeno de hormesis que se refiere a cuando la relación dosis-respuesta de un agente se caracteriza por una estimulación a bajas dosis y un efecto que parece benéfico a dosis altas en respuesta al estrés en el ambiente (Alaraby, Annangi, Marcos, & Hernández, 2016; López et al., 2013; Mattson, 2008).

Por otra parte, en el tratamiento sólo con aceite se encontró un efecto contrario, es decir que en las concentraciones más bajas (1.23E-08 - 7.87E-07 ppm) la cantidad de organismos recuperados es mayor o igual que el testigo a diferencia de la concentración 6.29E-06 y de 4.03E-04 ppm en adelante donde se recupera una cantidad menor que éstos; sin embargo, en la concentración 2.06E-02 ppm los organismos recuperados hacen una diferencia significativa dado que, si se compara con los otros dos tratamientos, en ellos esta concentración resultó altamente tóxica. Para la interacción de dicamba + aceite (tabla 1c progenitores) el tratamiento resultó menos tóxico que el dicamba solo, excepto en la última generación en la que se recuperan moscas (2.06E-01 ppm) donde resultó el tratamiento más tóxico.

Ahora bien, es importante evaluar si el compuesto tuvo algún efecto sobre los sistemas reproductores, dado que tener numerosos organismos no asegura que no hayan sido afectados funcionalmente. En la figura 2 se integran los resultados de las progenies recobradas a lo largo de tres generaciones. Para el esquema de dicamba, en la F_1 disminuye la progenie promedio por familia en comparación con los parentales tratados e incluso en la última concentración ya no se recupera progenie, indicando que existe un efecto a nivel reproductor, mientras que en la F_2 y F_3 el promedio de la progenie aumenta significativamente; sin embargo en la concentración de 5.4E-05 ppm existe una disminución significativa para las 3 generaciones, lo cual indica que en esa concentración existe un efecto más marcado. Con base en la toxicidad del tratamiento, se sugiere que alrededor de esta concentración existe un umbral que modifica la respuesta de las moscas tratadas (Meshrif & Elkholy, 2015).

En la figura 3 se muestran los resultados del tratamiento con aceite en los que el promedio de progenie por familia de la F_1 es similar al del testigo, mientras que en la F_2, aunque se confirmaron diferencias significativas, se recuperó menos progenie en el rango de concentraciones 1.23E-08 a 5.04E-05 y en el resto la cantidad es similar al del testigo; finalmente, en la F_3 el promedio de la progenie es similar al del testigo, excepto en 3.22E-04 ppm, en que hay un incremento significativo.

En los resultados de la interacción de dicamba + aceite (Fig. 4, tabla 1c), la sobrevivencia recobrada en las concentraciones y el testigo en los parentales expuestos fue similar, de la misma manera que en la F_1 (con excepción de 3.22E-04 ppm, en la que sobrevivieron menos moscas que en el testigo y el promedio de hijos por familia, también fue menor). Estas dos generaciones corresponden a la exposición directa e indirecta o exposición multigeneracional (Hanson & Skinner, 2016). En la interacción dicamba + aceite la toxicidad es aparente menor, por lo que la expectativa sería que las progenies F_2 y F_3 presentarán valores similares a los de sus testigos correspondientes, sin embargo, en ambas generaciones de organismos que ya no estuvieron expuestos en ninguna forma, el antecedente de la exposición se hace manifiesto ya que el promedio de la progenie es menor al testigo en prácticamente todas las concentraciones.

El que se encuentren evidencias de que los organismos muestran valores diferentes con respecto a sus testigos de referencia representa un punto importante de alarma, ya que, tanto con este herbicida como con muchos otros se carece de información al respecto.

También es necesario ahondar más en el espectro genotóxico de este herbicida pues en estudios previos se han encontrado algunas evidencias de que el dicamba puede ser un disruptor hormonal potencial, tanto en hembras como machos (Goldner *et al.*, 2013).

Se requieren más estudios acerca de la genotoxicidad a largo plazo de compuestos como los herbicidas que son vertidos al ambiente de manera regular y cuyo impacto puede ir más allá de la exposición directa de los organismos, además, el uso repetido de estos compuestos en el ambiente agrava el riesgo potencial que representa su uso.

5. Conclusión.

A pesar de que dicamba es un herbicida comúnmente usado a nivel mundial, aún no se tiene suficiente información sobre sus efectos toxicológicos, lo cual resulta preocupante. Para la mayoría de los herbicidas se recomienda usar un adyuvante, por lo que en este trabajo se evaluaron los efectos del compuesto, del adyuvante y de la mezcla de éstos.

Una sola exposición al herbicida dicamba así como a su mezcla con aceite, produce efectos sobre la sobrevivencia a partir de la concentración 2.58E-02 ppm.

En el caso del aceite tiende a haber un efecto en cual los organismos responden al estrés ambiental. En cuanto a la proporción sexual, hay tendencia a una disminución en machos en los tres esquemas (dicamba, aceite y dicamba + aceite), lo cual podría indicar que existe un efecto mayor en ellos.

Finalmente, los efectos a nivel reproductor y sobre la descendencia a lo largo de las tres generaciones, particularmente en las moscas no expuestas de la F_2, son cuantificables tanto en dicamba como en aceite y sobre todo en la mezcla de éstos, por lo que es importante establecer el verdadero impacto del herbicida y su adyuvante sobre el ambiente y los organismos.

Agradecimientos:

Banco de Moscas, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dra. Adriana Muñoz Hernández

Biól. Estefanía Arroyo Jilote.

6. Referencias

Abolaji, A. O., Kamdem, J. P., Farombi, E. O., & Rocha, J. B. T. (2013). Drosophila melanogaster as a Promising Model Organism in Toxicological Studies. *Archives of Basic & Applied Medicine*, *1*, 37–44.

Alaraby, M., Annangi, B., Marcos, R., & Hernández, A. (2016). Drosophila melanogaster as a suitable in vivo model to determine potential side effects of nanomaterials: A review. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, *19*(2), 65–104. https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1166466

Baars, A. J. (1980). Biotransformation of xenobiotics in drosophila melanogaster and its relevance for mutagenicity testing. *Drug Metabolism Reviews*, *11*(2), 191–221. https://doi.org/10.3109/03602538008994025

Bunch T, Gervais J, Buhl K, & Stone D. (2012). Dicamba Technical Fact Sheet. [en línea] http://npic.orst.edu/factsheets/archive/dicamba_tech.html

Cochrane, B. J., & LeBlanc, G. A. (2002). Genetics of xenobiotic metabolism in drosophila. *Biochemical Pharmacology*, *35*(10), 1679–1684. https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90323-0

Cox, C. (1994). Dicamba. *Journal of Pesticide Reform*, *14*(1), 30–35.

Curran, W. S., McGlamery, D., Liebl, A., & Lingenfelter, D. (1999). Adjuvants for enhancing herbicide performance. *Agronomy Facts Pennsylvania State University Extension*, *37*(1), 1–6.

Dalgaard-Mikkelsen, S., & Poulsen, E. (1962). Toxicology of herbicides. *Pharmacological Reviews*, *14*(2), 225–250.

FAO, & WHO. (2011). *Pesticide residues in food —Toxicological evaluations*. Food and Agriculture of the United Nations and World Health Organization.

Ffrench-Constant, R. H. (2013). The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*, *194*(4), 807–815. https://doi.org/10.1534/genetics.112.141895

Freydier, L., & Lundgren, J. G. (2016). Unintended effects of the herbicides 2,4-D and dicamba on lady beetles. *Ecotoxicology*, *25*(6), 1270–1277. https://doi.org/10.1007/s10646-016-1680-4

Gerhard, V., Jochen, M., Franz, H., & Dieter, M. (2006). *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* (Segunda edición). Nueva York, Estados Unidos de América: Springer Reference. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2

Goldner, W. S., Sandler, D. P., Yu, F., Shostrom, V., Hoppin, J. A., Kamel, F., & Levan, T. D. (2013). Hypothyroidism and Pesticide Use among Male Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *55*(10), 1171–1178. https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e31829b290b

González, N. V., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2007). The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel® induce genotoxicity and cytotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *634*(1–2), 60–68. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.06.001

Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system. *Genetics*, *201*(3), 815–842. https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392

Hällström, I., Blanck, A., & Atuma, S. (1984). Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in Drosophila melanogaster. *Biochemical Pharmacology*, *33*(1), 13–20. https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90364-2

Hanson, M. A., & Skinner, M. K. (2016). Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental Epigenetics*, *2*(1). https://doi.org/10.1093/eep/dvw002

Hartzler B. (2017). A historical perspective on dicamba | Integrated Crop Management. [en línea] https://crops.extension.iastate.edu/blog/bob-hartzler/historical-perspective-dicamba

Jennings, B. H. (2011). Drosophila – a versatile model in biology & medicine The fruit fly Drosophila melanogaster is a versatile model organism. *Materials Today*, *14*(5), 190–195. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4

Klaassen, C. (2013). *Casarett and Doull´s Toxicology The Basic Science of Poisons* (Octava edición). Estados Unidos de América: Mc Graw Hill Education.

López, N., González, V., Hernández, R., Alarcón, A., Luna, A., & Konigsberg, M. (2013). Hormesis: lo que no mata, fortalece. Artículo de revisión. *Gaceta Médica de México*, *149149*, 438–447. http://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n4/GMM_149_2013_4_438-447.pdf

Matthew, R., Sara, M., Lisa, P., & Daria, V. (2014). Developmental Toxicity Assays Using the Drosophila Model. *Current Protocols in Toxicology*, *59*(1), 1–27. https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0112s59.Developmental

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, *7*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007

Meshrif, W., & Elkholy, S. (2015). Genotype and environment shape the fitness of Drosophila melanogaster. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, *68*, 1–19. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.01.003

Nadeau, J. (2009). Transgenerational genetic effects on phenotypic variation and disease risk. *Human Molecular Genetics*, *18*(2), 202–210. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp366

Nelson, V., & Nadeau, J. (2010). Transgenerational genetic effects. *Epigenomics*, *2*(6), 797–806. https://doi.org/10.2217/epi.10.57.Transgenerational

Nöthiger, R. (1970). Sucrose density separation a method for colecting large numbers of Drsophila larvae. *Drosophila Information Service*, *45*, 177.

Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental* (Cuarta Edición). España: Ediciones Díaz de Santos.

Rim, K. (2017). Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers ' Health : A Literature Review. *Safety and Health at Work*, *8*(2), 143–150. https://doi.org/10.1016/j.shaw.2017.04.003

Roberts, D. B. (2006). Drosophila melanogaster: The model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *121*(2), 93–103. https://doi.org/10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x

Robin, C., Good, R. T., Fournier-Level, A., Battlay, P., Lumb, C., Schmidt, J. M., & Gledhill-Smith, R. S. (2017). Insights into DDT Resistance from the Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel . *Genetics*, *207*(3), 1181–1193. https://doi.org/10.1534/genetics.117.300310

Ruiz de Arcaute, C., Larramendy, M. L., & Soloneski, S. (2018). Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on Cnesterodon decemmaculatus (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Pollution*, *243*, 670–678. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.040

Skinner, M. K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype?. F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, *25*(1), 2–6. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001

Stephenson, R., & Metcalfe, N. H. (2013). Drosophila melanogaster: a fly through its history and current use. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, *43*(1), 70–75. https://doi.org/10.4997/JRCPE.2013.116

Toxicology Data Network. (2017). Dicamba. [en línea] https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+311

Tyler, M. (2000). Development of the Fruit Fly. In *Developmental Biology* (Segunda edición). Massachutes, Estados Unidos de América: Sinauer Associates, Inc.

Ullrich, D. A. (1999). Dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid); Pesticide Tolerance. *Federal Register Environmental Protection Agency*, *64*(3), 759–769. https://doi.org/10.1021/j100299a032

Williams, P. L., James, R. C., Roberts, S. M., Director, P., Chichester, N. Y., Brisbane, W., & Toronto, S. (2000). *PRINCIPLES OF TOXICOLOGY Environmental and Industrial Applications* (Segunda edición). Estados Unidos de América: John Wiley & Sons, Inc.

Yadav, I., & Devi, N. (2017). Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Environmental Science and Engineering*, *6*, 140–158. https://www.researchgate.net/profile/Ishwar_Yadav2/publication/313445102_Pesticides_Classification_and_Its_Impact_on_Human_and_Environment/links/589b09a04585158bf6fb8080/Pesticides-Classification-and-Its-Impact-on-Human-and-Environment.pdf

Yang, J., McCart, C., Woods, D. J., Terhzaz, S., Greenwood, K. G., Ffrench-Constant, R. H., & Dow, J. A. T. (2007). A Drosophila systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiological Genomics*, *30*(3), 223–231. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00018.2007

Zhang, B., Chen, L., Bao, Q., & Zheng, X. (2016). Upregulation of fibronectin, vitronectin and claudin-7 in cervical cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(7), 14247–14253. https://doi.org/10.1002/tox

Capítulo 22

Drosophila, ORGANISMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE DAÑO REPROTOXICO Y TRANSGENERACIONAL

Evangelista-Casimiro Rubi[1*]

Ramos-Morales Patricia[1]

[1] Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental-Banco de Moscas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México.

* ecr13@ciencias.unam.mx

Resumen

En el ambiente existen sustancias que pueden provocar efectos adversos en los seres vivos, de los cuales, uno de los menos estudiados es el daño a la capacidad reproductiva. Nuestro grupo ha calibrado diversos bioindicadores (fertilidad, cantidad de progenie y proporción sexual) enfocados a evaluar daño reprotóxico *in vivo* utilizando dos especies del género *Drosophila*: *D. melanogaster* (mosca del vinagre) y *D. mulleri* (mosca con testículos pigmentados). Como parte del proceso de valoración de la eficiencia de un modelo experimental, los organismos son expuestos a sustancias pertenecientes a diferentes familias químicas para establecer su sensibilidad y especificidad. El objetivo fue determinar si *D. melanogaster* y *D. mülleri* son sensibles al daño reprotoxico y transgeneracional causado por el promutágeno, alquilante N-nitrosodimetilamina en su forma activa (NDMA) y determinar si logran discriminar entre el compuesto químicamente activo y uno decaído (NDMAd). Larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* y *D. mulleri* se alimentaron con NDMA [7.63E-05-0.235mM] y agua destilada. Se registró la sobrevivencia y se revisó el aspecto de las gónadas tres días después de emerger. Por cada concentración, treinta machos tratados, se cruzaron con hembras no tratadas (NT) para obtener la progenie F_1. Posteriormente se formaron 30 familias que se siguieron por dos generaciones más (F_2 y F_3). En cada generación se contó y revisó morfológicamente a las moscas y se calculó su fertilidad y fecundidad. *D. mülleri* y *D. melanogaster* presentaron diferencias significativas con relación a su testigo y pérdida de fertilidad en concentraciones similares. Ambas líneas mostraron daño reprotoxico y transgeneracional, además de que sí discriminaron entre la forma activa y decaída de la NDMA, por lo que *D. melanogaster* y *D. mülleri* son modelos confiables para la evaluación de este tipo de daño.

Palabras clave: Drosophila mulleri, *Drosophila melanogaster*, Bioindicadores, Daño reprotóxico.

1. Introducción

La toxicología genética identifica y examina la acción de los agentes tóxicos que tienen la capacidad de interactuar con el material genético, y a los que se conoce como genotóxicos. Su objetivo fundamental es comprender las propiedades de los agentes químicos, físicos y biológicos que inducen cambios en el ADN y que pueden afectar a las células somáticas de los organismos expuestos, lo que se ha asociado con procesos cancerosos; pero si los cambios ocurren en sus células sexuales, puden llegar a ser hereditarios y aún afectar a otras generaciones (Brusick, 1987; Silbergeld, 2000; Vega García, 2015).

El daño genético, causado por una sustancia, depende de diferentes variables, entre ellas el nivel de exposición, la distribución de ésta en el organismo, la retención o excreción de la sustancia y la eficacia del metabolismo. La capacidad que tienen las células para expresar o reparar una alteración causada por un genotóxico influye en que el daño génico se herede o no (Silbergeld, no date; Ramos-Morales and Vega García, 2008).

Los genotóxicos pueden provocar diferentes tipos de cambios en el ADN, por ejemplo, cambiar una base por otra, eliminar o agregar a una o más bases lo que provoca el corrimiento del marco de lectura durante la traducción y puede generar proteínas alteradas. Los intercalantes son moléculas de tamaño pequeño y forma aplanada que se intercala entre las hebras del ADN, lo que lleva a rompimientos en el esqueleto de azúcar fosfato, pero también puede producir corrimiento del marco de lectura. Los alquilantes son un grupo de compuestos que agrega grupos alquilo a las bases del ADN lo que puede cambiar las propiedades de apareamiento entre las bases del ADN y provocar ruptura de la hebra, entre otros efectos (Choy, 2001; Lodola and Stadler, 2011).

El diagnóstico del potencial genotóxico de una sustancia se basa básicamente en los efectos provocados en los organismos expuestos, sin embargo, poco se ha explorado si pueden interferir en su capacidad reproductiva. En las poblaciones humanas se ha incrementado la presencia de daño a nivel reproductivo en la forma de infertilidad, problema que se ve incrementado en grandes ciudades (Hammoud *et al.*, 2010). De acuerdo con CONAPO (2019), la Tasa Global de Fecundidad en México ha descendido de 6.74 en 1968 a 2.1 en 2018 (figura 1), siendo la de la Ciudad de México, una de las más bajas (1.49) (González Cervera, 2006). Esto ha llevado también al incremento en el uso de técnicas para la reproducción asistida.

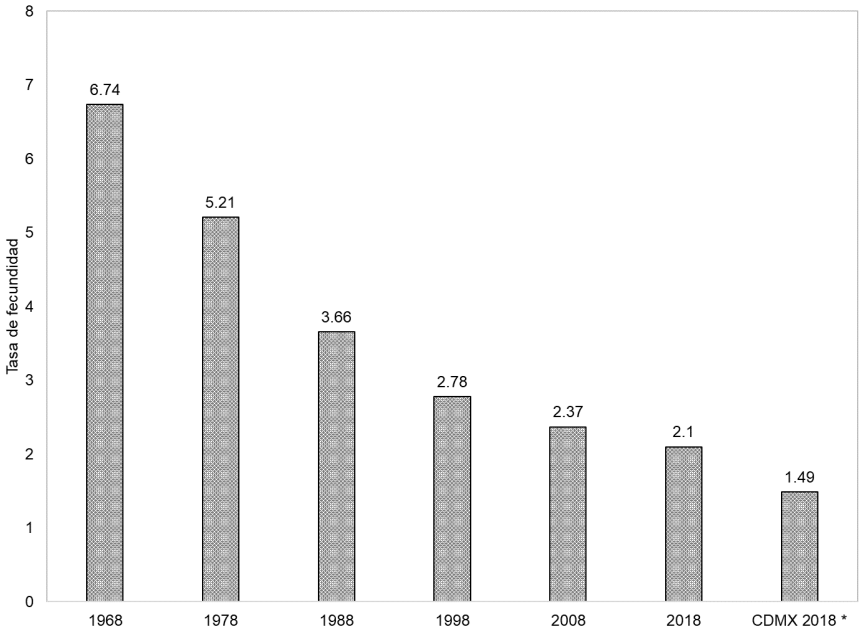


Figura 1 Tasa Global de Fecundidad en México

Algunos modelos biológicos se enfocan en el impacto de los genotóxicos tanto en las células somáticas como en las sexuales del organismo expuesto, sin embargo, pocos de éstos analizan su posible efecto en la descendencia inmediata y en generaciones posteriores. Entre las características de los modelos biológicos que favorecen su uso para el estudio de la actividad reproductiva se encuentran la producción de progenie numerosa que facilite el análisis estadístico, ciclos de vida cortos que aporten información de varias generaciones en períodos de tiempo razonables y un costo de mantenimiento moderado. Los insectos reúnen estas características, y en particular los pertenecientes al género *Drosophila* (Brusick, 1987; Adams *et al.*, 2000; Markow and O'Grady, 2007; Avanesian, Semnani and Jafari, 2009).

1.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila, es un organismo holometábolo, pionero en estudios genéticos, modelo en biología del desarrollo, presenta una cantidad de descendientes numerosa, requiere poco espacio de almacenamiento y su costo de mantenimiento es moderado (Ramos Morales *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2000;

Markow and O'Grady, 2007). Esta mosca se encuentra presente en todo el mundo, presenta dimorfismo sexual (Fig. 2), el cual favorece a la hembra, su ciclo de vida tiene una duración de 10 a 15 días, a partir de la fertilización del huevo (Adams *et al.*, 2000; Markow and O'Grady, 2007; Guerrero and Lorenzana-Jiménez, 2009). Es un modelo sensible al efecto de los xenobióticos y la respuesta que se genera puede observarse en la morfología del organismo o en su fisiología (Markow and O'Grady, 2007).

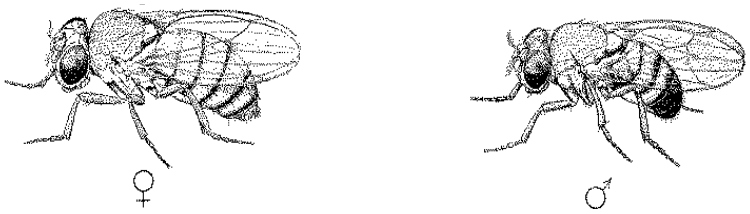


Fig 2 Morfología externa de *Drosophila melanogaster*. Modificado de (Dang, Dutt and Forsdyke, 1998).

A diferencia de otros modelos, *Drosophila* no requiere ser adicionada con fracciones enzimáticas derivadas de mamíferos. Se ha mostrado que esta mosca tiene la capacidad de transformar y desintoxicar sustancias de manera similar a los mamíferos, esto debido a que tiene sistemas enzimáticos dependientes de citocromos con actividad equivalente a la fracción S9 del hígado de rata (Baars *et al.*, 1980; Clark, 1982; Hällström, 1985; Giraudo *et al.*, 2011). Se ha documentado que la mosca puede distinguir entre mutágenos y promutágenos, es decir, compuestos que son activos después de ser transformados por el metabolismo de los organismos, además de discriminar entre diferentes especies químicas (Hällström and Blanck, 1985; Yang *et al.*, 2007).

Drosophila resulta un buen modelo para el estudio de daño reprotóxico ya que los genes reguladores de la reproducción se encuentran conservados en gran medida y comparte similitudes en la espermatogénesis con el humano (King, Aggarwal and Aggarwal, 1968). El análisis de su genoma ha mostrado que alrededor del 70 % de sus genes son compartidos con los del hombre y de éstos, un porcentaje similar se asocia con enfermedades humanas. Por lo anterior, el uso de *Drosophila* como modelo para el estudio de genotóxicos ha sido fructífero por más de 100 años (Adams *et al.*, 2000; Botas, 2007).

Sin embargo, una limitante de este modelo es que sus gónadas son hialinas, por lo que el estudio del efecto de genotóxicos en la morfología de las

estructuras reproductoras hace necesaria la inspección visual posterior a la disección, lo que se convierte en una desventaja ya que esto implica más tiempo y entrenamiento, además de ser un procedimiento invasivo. Este aspecto podría superarse si la inspección visual directa (sin necesidad de disectar al organismo) pudiera informar de la morfología de las gónadas, además de que esto haría posible mantener al organismo vivo para cruces posteriores.

1.2. Drosophila mülleri

El género *Drosophila* es estudiado en todas las áreas del conocimiento por sus múltiples cualidades, por ejemplo, el grupo Repleta incluye a algunas especies de moscas con pigmentación en los testículos, como *Drosophila mülleri* (Fig. 3) esta especie presenta pigmentación que pasa de amarillo a rojo con la edad (Fig. 4), lo que facilita la visualización directa de las gónadas, sin necesidad de disectar al organismo (Hasson, Naveira and Fontdevila, 1992; Ianella, Azeredo-Oliveira and Itoyama, 2008; Hammoud *et al.*, 2010).



Fig 3 Morfología externa de *Drosophila mülleri.* Modificado de (J. T. Patterson, 1943)



Fig 4 Coloración de testículos de *Drosophila mülleri* conforme aumenta la edad de la mosca.Modificado de (Ramirez Flores, 2015)

El ciclo de desarrollo de *D. mulleri*, tiene una duración de dieciocho días a partir de la fertilización del huevo y se encuentra asociada a ambientes xerófilos, por lo que se alimenta de cactus en descomposición, metabolizando productos de la fermentación (Rajpurohit *et al.*, 2013). Aunque existen algunas diferencias en la actividad metabólica de las moscas, por su adaptación a distintos ambientes, se ha mostrado que muchos de los genes responsables de la activación de compuestos se han conservado en las moscas y muchos son comunes al humano (Fischer and Maniatis, 1985; Adams *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2007).

La introducción de un modelo alternativo para valorar daño genético implica un proceso de validación para documentar su respuesta al cambio en el ambiente a través de una o varias variables de respuesta (viabilidad, metabolismo, fertilidad, daño genético, etc), para lo cual se recurre al uso de sustancias de referencia que han mostrado inducir la respuesta de interés, por ejemplo, rompimiento del ADN, mutación puntual, toxicidad reproductiva, entre otras (Butterworth, Gunatilaka and Gonsebatt, 2001).

1.3. N-Nitrosodimetilamina

Para calibrar un modelo es necesario conocer su respuesta ante compuestos con actividad conocida sobre otros modelos similares. Una sustancia utilizada regularmente por su actividad genotóxica es la N-nitrosodimetilamina (NDMA). Este compuesto es un promutágeno, es decir, se transforma en un compuesto mutagénico al ser modificado por la actividad metabólica del organismo (ATSDR, 1999; EPA, 2014). Es un agente alquilante monofuncional que se caracteriza por agregar grupos alquilo al ADN, lo que modifica las características fisicoquímicas de las bases involucradas, cambia sus propiedades de apareamiento y también promueve la ruptura de la molécula. En la actualidad solo se usa para investigación debido a su efecto como promutágeno, carcinógeno y teratógeno (Gichner, Velemínský and Underbrink, 1980; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005; California Environmental Protection Agency, 2006).

Esta nitrosamina es producida por síntesis química con fines de investigación, pero su formación también se asocia a bacterias nitrificantes. Además, puede generarse en procesos biológicos o químicos o por fuentes antropogénicas, en el procesamiento prolongado de alimentos, o en el tratamiento de aguas negras. La exposición a la NDMA puede ser laboral o al acudir a lugares donde se dé la formación. Una vez absorbida, sus metabolitos comienzan a distribuirse (ATSDR, 1999; EPA, 2014).

En mamíferos, la conversión metabólica de la NDMA depende del complejo enzimático P450-CYP2E1 y la función del sistema oxidasa y en *Drosophila* alcanza su actividad genotóxica al metabolizarse por una isoforma del citocromo CYP2E1 (Williams, Mori and McQueen, 1989; Anderson *et al.*, 1992; ATSDR, 1999; Le Goff *et al.*, 2006; Ianella, Azeredo-Oliveira and Itoyama, 2008; EPA, 2014). En *D. melanogaster*, la NDMA en metabolizada y altera la diferenciación de las gónadas macho e induce esterilidad en los organismos expuestos durante la fase larvaria (Ramos-Morales and Vega García, 2008).

El efecto de los tóxicos en la actividad reproductiva es de suma importancia en la sobrevivencia de las especies, sin embargo, poco se ha documentado acerca del alcance de la exposición de los organismos a factores de riesgo. Con frecuencia se establece la toxicidad de las sustancias como la dosis o la concentración de éstas que provoca la letalidad en una proporción de la población tratada, así, la LD_{50} es la dosis de una sustancia que provoca la muerte del 50 % de los organismos expuestos (Streffer *et al.*, 2004). No obstante, surgen preguntas como: ¿qué pasa con los organismos que no murieron a consecuencia de la exposición?, ¿presentan cambios en su morfología, fisiología, conducta, su capacidad reproductiva? y, si son capaces de reproducirse, ¿producen progenie regular?, ¿cuál es el alcance del efecto de los tóxicos?

Es importante distinguir efecto multigeneracional y transgeneracional. En el primero, los organismos son expuestos a una sustancia potencialmente peligrosa. Dependiendo de la forma, tiempo de exposición y el organismo involucrado, esta exposición tiene varios niveles de impacto: en el organismo expuesto, en las células precursoras de células germinales (que darán origen a la siguiente generación de descendientes o la F_1 y que, de esta manera, reciben una exposición indirecta). Por otra parte, el efecto transgeneracional implica modificaciones en alguno o varios de los biomarcadores analizados en la descendencia no expuesta (ni indirectamente) de organismos tratados en generaciones anteriores (Hanson and Skinner, 2016).

2. **Objetivo**

Determinar si las moscas *Drosophila melanogaster y D. mülleri* son sensibles al efecto reprotóxico de la N-nitrosodimetilamina (NDMA).

2.1. Objetivos particulares:

a. Establecer si *Drosophila melanogaster y D. mülleri* son sensibles al daño reprotóxico de la NDMA.

b. Establecer si la NDMA tiene efecto transgeneracional en *Drosophila melanogaster y D. mülleri*.

c. Probar la sensibilidad química de *D. melanogaster* y *D. mülleri* con la exposición subcrónica, por alimentación, a diferentes concentraciones de N-Nitrosodimetilamina activa y decaída químicamente.

3. **Hipótesis**

La N-nitrosodimetilamina es un promutágeno que interfiere con la fertilidad de los organismos por lo que la exposición a diferentes concentraciones afectará la función reproductiva de las moscas del género *Drosophila* expuestas a la NDMA y de sus descendientes.

4. **Material y métodos**

4.1. Líneas

Los cultivos se mantuvieron a 25°C y 60% de humedad relativa.

- *Drosophila melanogaster* silvestre, cepa Canton S. Los cultivos se mantuvieron en un medio de cultivo estándar a base de: agar (0.6%), harina de maíz (6%), sacarosa (7.6%), levadura desamargada (4.1%) y agua (81.7%).
- *Drosophila mülleri* silvestre. Los cultivos se crecieron en un medio de cultivo Banana/opuntia a base de: agar (0.7%), levadura desamargada (2.8%), malta (3.1%), polvo de opuntia (0.2%), plátano (14.2%), miel de maíz (4.8%) y agua (74.2%).

4.2. Obtención de larvas de tercer estadio

Un cultivo maduro de cada cepa se transfirió a medio fresco para que las hembras ovipositaran, para *D. melanogaster* se dejó un período de 8 h, mientras

que para *D. mülleri*, las moscas permanecieron durante 24 h. Se dejó que las larvas se desarrollaran hasta el tercer estadio larvario.

4.3. Compuestos

a. Se utilizó el compuesto N-Nitrosodimetilamina (NDMA) (SIGMA-ALDRICH, Bellefonte, PA USA.) (62-75-9)

b. Además del compuesto activo se utilizó una forma químicamente decaída de N-Nitrosodimetilamina (NDMAd) (SIGMA, USA) (62-75-9) que en experimentos previos mostró actividad genotóxica diferente (datos no mostrados).

4.4. Soluciones

Para preparar las concentraciones se partió de una solución inicial de NDMA a 0.235 mM, la cual se ha mostrado que interfiere con la fertilidad de las moscas expuestas (Ramirez Flores, 2015). A partir de esta solución se realizaron diluciones sucesivas, utilizando como disolvente y testigo negativo agua destilada, se realizaron un total de 8 diluciones, siendo la más alta la solución stock y la más baja 7.63E-05 mM.

4.5. Tratamiento

En tubos de vidrio de 2 cm de diámetro por 9.5 cm de alto que contenían 1 g de medio instantáneo para *Drosophila* (Carolina Biological Supply, Formula 4-24) se agregaron 4.5 ml de la solución a probar o de agua destilada. Cuando las larvas alcanzaron el tercer estadio de desarrollo (72 h para *D. melanogaster* y 96 h para *D. mülleri*) se extrajeron mediante una solución de sacarosa al 20 o 30 % para *D. melanogaster* y *D. mülleri*, respectivamente (Nöthiger, 1970). La solución de sacarosa se vierte en los tubos que contienen las larvas, las cuales flotan, por diferencia de densidad.

Las larvas se vierten en un embudo de separación, se retiran los restos de medio de cultivo y se enjuagan con solución de sacarosa. Una vez sin residuos, las larvas se enjuagan con agua corriente y se reciben en una malla de nylon. Con ayuda de una espátula pequeña se tomaron aproximadamente 100 larvas que se vertieron en los tubos que contienen medio de cultivo para mosca enriquecido con la solución a probar y se coloca un tapón de hule espuma para evitar que las larvas escapen. A partir de este momento las larvas se alimentaron del medio hidratado con las diferentes concentraciones, se mantuvieron a 25°C y 60% de

humedad relativa. Para cada especie se hicieron dos réplicas por experimento y el experimento completo se repitió en dos ocasiones.

4.6. Determinación de toxicidad

Diez días posteriores al tratamiento se cuantificó y registró el número de moscas adultas hembras y machos recobradas en el lote testigo y en los lotes experimentales. Además, se revisó la morfología externa de las moscas, poniendo especial atención a la placa genital y a la presencia de testículos pigmentados en el caso de *D. mülleri.*

4.7. Cruzas para evaluar el efecto en la fertilidad y la cantidad de la progenie de organismos tratados y generaciones posteriores. Efecto reprotóxico y transgeneracional.

Se realizaron treinta cruzas individuales con una hembra no tratada y un macho tratado (parentales expuestos directamente) con NDMA o con agua destilada, en proporción 1:1 en tubos homeopáticos con medio de cultivo fresco. Se retiró a los progenitores cinco días después y se cuantificó la progenie (F_1) doce días después de realizar la cruza, registrando la cantidad de hembras y machos recobrados. Para cada concentración se sembraron nuevamente treinta parejas de cada concentración (F_1 x F_1). Se considera que en las moscas F_1, ocurrió una exposición indirecta al tratamiento ya que en los organismos expuestos ya estaban presentes las células precursoras de las células germinales.

Las moscas F_1 se retiraron al encontrar larvas en los tubos (5 o 7 días para *D. melanogaster* y para *D. mülleri*, respectivamente). Una vez que emergió la siguiente generación, se registró la cantidad de hembras y machos recobrados en la F_2 y se revisó su morfología y la coloración de los testículos en el caso de *D. mülleri*, de acuerdo con Ramos et al (1993) y Markow y O'Grady (2005).

El proceso se repitió nuevamente para sembrar treinta parejas (F_2 x F_2) de cada concentración, retirando y analizando cada pareja al encontrar larvas en los tubos, al emerger los adultos se cuantificó y revisó la morfología de la progenie F_3. Se considera que las moscas de la F_2 ya no tienen ningún tipo de exposición, ni directa ni indirecta, por lo que, si se presentan diferencias en los biomarcadores evaluados entre las moscas descendientes de moscas expuestas originalmente a la NDMA, con respecto a las moscas descendientes del lote testigo, se tendrá un efecto transgeneracional.

4.8 Sensibilidad química

Para la segunda parte del proyecto, larvas de tercer estadio de *D. melanogaster y D. mülleri* se expusieron como se indicó en el punto 4.5 pero ahora se utilizó una solución de NDMA que de manera accidental se mantuvo a temperatura mayor a 4°C por 3 días, con lo que sus propiedades cambiaron (NDMAd) (Fournier *et al.*, 2006) y en pruebas realizadas en el laboratorio se comprobó que es más tóxica.

Las moscas recobradas se contabilizaron por sexos y se revisó su morfología de acuerdo con Ramos et al (1993) y Markow y O'Grady (2005). Se sembraron 10 parejas en tubos individuales por concentración con una hembra no tratada y un macho tratado o un macho testigo. Se cuantificó la progenie de cada pareja, registrando la cantidad de organismos obtenidos y su morfología.

4.8. Análisis de resultados

Para ambos experimentos y líneas expuestas, se calculó la sobrevivencia

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{n} moscas\ del\ lote\ esperimental}{\sum_{i=1}^{n} moscas\ del\ lote\ control}$$

Se calculó la fertilidad y la cantidad de progenie por tubo como:

$$F = \frac{Tubos\ con\ progenie}{Tubos\ sembrados}$$

$$PP = \frac{\sum_{i=1}^{n} progenie\ por\ tubo}{Número\ de\ tubos\ con\ progenie}$$

Los promedios de la sobrevivencia de las moscas tratadas y de la cantidad de progenie por tubo de las moscas tratadas se comparó con los valores promedio de las moscas testigo mediante un ANOVA de una vía (α= 0.05) en GraphPad Prism 6. Para comparar la fertilidad de las moscas tratadas y su testigo correspondiente se utilizó la prueba de z para proporciones (α= 0.05) (Moore, 2005).

5. **Resultados**

Según los objetivos planteados los resultados se dividieron en dos partes:

1. Establecer las similitudes y diferencias que tiene *D. mülleri* con respecto a *D. melanogaster* en la evaluación de daño reprótoxico y transgeneracional en presencia de NDMA.
2. Evaluación de la sensibilidad química de *D. melanogaster* y *D. mülleri* ante un compuesto activo y uno decaído.

5.1. Daño reprotóxico y transgeneracional

5.1.1 Efecto tóxico y reprotóxico

En la Tabla 1 se muestra la sobrevivencia (promedio ± error estándar) de las moscas tratadas con la NDMA activa. Para *D. melanogaster*, la sobrevivencia en las series experimentales fue similar al testigo, solo en la concentración 7.8E-02 la sobrevivencia fue menor, pero no se confirmaron diferencias significativas (ANOVA, $p>0.05$). La fertilidad de las moscas tratadas fue menor en las concentraciones 7.63E-05 y de 7.81E-02 a 2.35E-01 (Z, $p<0.05$).

D. mülleri, es en general, una cepa menos prolífica comparada con *D. melanogaster*, sin embargo, el efecto del tratamiento fue más evidente ya que en todas las series experimentales la sobrevivencia promedio fue menor a la su testigo correspondiente, siendo significativamente menor a partir de 1.56E-01 (ANOVA, $p<0.05$; Dunnett, $p<0.05$). La fertilidad de las moscas experimentales fue significativamente menor en las concentraciones 7.81E-02 y 2.35E-01 (Z, $p < 0.05$).

Tabla 1 Sobrevivencia y Fertilidad de moscas tratadas con NDMA. De elaboración propia

	Drosophila melanogaster			*Drosophila mülleri*		
Concentración	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ± ee)	Fertilidad	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ±	Fertilidad
dH_2O	436	54.50 ± 8.91	0.93	138	17.25 ± 5.05	0.63
7.63E-05	306	43.71 ± 9.80	0.53 [b]	100	12.50 ± 4.32	0.70
2.44E-03	395	49.38 ± 9.17	0.89	55	6.88 ± 1.56	0.46
4.88E-03	389	48.63 ± 8.33	0.83	58	7.25 ± 2.04	0.64
9.77E-03	317	39.63 ± 7.06	0.87	75	9.38 ± 2.08	0.43
3.91E-02	327	40.88 ± 6.43	0.67	52	6.50 ± 2.90	0.50
7.81E-02	294	36.75 ± 8.06	0.33 [b]	40	5.00 ± 3.05	0.30 [b]
1.56E-01	441	55.13 ± 6.81	0.03 [b]	23	2.88 ± 1.08 [a]	0.50
2.35E-01	355	44.38 ± 6.83	0.00 [b]	18	2.25 ± 1.45 [a]	0.17 [b]

ee; error estandar

Diferencias significativas en progenie promedio con respecto a su testigo; [a]ANOVA,$p<0.05$; *Dunnett,$p<0.05$*

Diferencias significativas en fertilidad con respecto a su testigo; [b] Z, $p<0.05$

La figura 5 compara la sobrevivencia encontrada con ambas cepas. Como son cepas con diferente prolificidad, se dividió la sobrevivencia promedio de cada lote entre la del testigo correspondiente, de manera que el testigo tendrá un valor de 1 en ambas cepas. La sensibilidad de *D. mülleri* al tratamiento fue mayor que la de *D. melanogaster* ya que en todos los casos, la sobrevivencia recobrada es menor a la de su testigo, es importante recordar que las diluciones con las que se hidrató el medio de cultivo fueron las mismas.

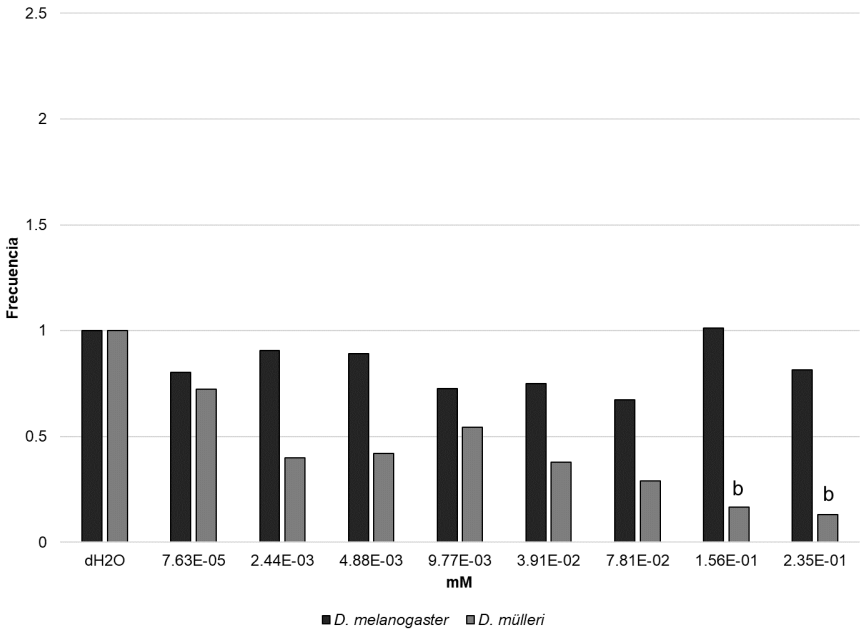


Fig. 5 Progenies F_1 a F_3 descendientes de moscas *D. melanogaster* y *D. mülleri* expuestas a NDMA. Diferencias significativas entre las moscas experimentales y su testigo correspondiente (ANOVA, $p<0.05$; Dunnett, $p<0.05$), [b], *D. mülleri*. De elaboración propia

5.1.2. Organismos no tratados (F_1, F_2 y F_3):

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos a través de tres generaciones sucesivas. Para *D. melanogaster*, en la F_1 (exposición indirecta), la progenie por tubo fue menor a partir de 7.81E-02 (ANOVA, $p<0.05$; Dunnet, $p<0.05$) y la fertilidad también se vio afectada a partir de 3.91E-02 (Z, $p<0.05$). En la generación F_2 (moscas no expuestas), la progenie promedio por tubo fue mayor en las concentraciones 2.44E-03 y 4.88E-03, pero la fertilidad de las moscas descendientes de abuelos expuestos no fue afectada en ninguna concentración. En la cruza de moscas F_2 x F_2 (moscas no expuestas), que da origen a la F_3, se recobró un promedio mayor de moscas en la concentración más alta probada, 1.56E-01 (ANOVA, $p<0.05$, Dunnett, $p<0.05$).

En la cepa *D. mulleri*, el número de organismos recobrados en la F_1 (exposición indirecta) es significativamente menor al testigo, pero sólo se confirmaron diferencias significativas en la concentración 1.56E-01 (ANOVA $p<0.05$; Dunnett $p<0.05$) y se indujo esterilidad en las descendientes de moscas tratadas con 7.63E-05 a 4.88E-03 (Z, $p<0.05$). En la progenie F_2 (moscas no

expuestas), no se recuperó progenie en la concentración 2.44E-03 y la fertilidad fue estadísticamente menor en todas las concentraciones (Z, $p<0.05$). En la progenie F_3 (moscas no expuestas), no se recuperó progenie en la concentración 3.91E-02.

En la figura 6 se muestran ejemplos de algunas alteraciones en la placa genital asociadas al tratamiento con NDMA, tanto en *D. melanogaster* como en *D. mülleri*.

Tabla 2 Progenies F_1 a F_3 (promedio ±ee) derivadas de moscas *D. melanogaster* y *D. mülleri* tratadas con NDMA. De elaboración propia

	F1			F2			F3	
Concentración	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ± ee)	Fertilidad	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ± ee)	Fertilidad	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ± ee)
Drosophila melanogaster								
dH_2O	2504	89.43 ± 8.40	0.90	946	35.04 ± 5.01	0.83	2073	82.92 ± 7.09
7.63E-05	1738	108.63 ± 9.90	0.93	1114	39.79 ± 4.77	0.87	2350	90.38 ± 8.72
2.44E-03	2459	98.36 ± 8.29	0.77	1236	53.74 ± 3.67 [a]	0.90	1506	57.92 ± 9.05
4.88E-03	2374	94.96 ± 7.38	0.80	1316	54.83 ± 6.25 [a]	0.90	1371	50.78 ± 9.78
9.77E-03	2083	80.12 ± 5.36	0.80	961	40.04 ± 3.66	0.73	1240	56.36 ± 9.71
3.91E-02	1464	73.20 ± 7.00	0.57 [b]	460	27.06 ± 4.45	0.89	1292	58.73 ± 9.25
7.81E-02	351	43.88 ± 13.70 [a]	0.38 [b]	308	34.22 ± 6.47	0.73	1178	73.63 ± 12.28
1.56E-01	19	19.00 ± 0.00 [a]	0.56 [b]	138	34.50 ± 4.44	0.90	1194	132.67 ± 12.06 [a]
2.35E-01	0							
Drosophila mülleri								
dH_2O	486	32.40 ± 7.24	0.58	598	39.87 ± 5.59	0.97	380	47.50 ± 10.09
7.63E-05	404	33.67 ± 6.06	0.26 [b]	188	37.60 ± 9.12	0.63 [b]	381	47.63 ± 8.77
2.44E-03	121	24.20 ± 12.32	0.00 [b]	0				
4.88E-03	212	30.29 ± 4.81	0.43 [b]	156	52.00 ± 13.32	0.50 [b]	119	39.67 ± 11.46
9.77E-03	317	35.22 ± 10.24	0.24	135	27.00 ± 3.62	0.48 [b]	343	26.38 ± 5.48
3.91E-02	249	49.80 ± 4.45	0.30	17	8.50 ± 4.50	0.33 [b]	0	
7.81E-02	51	17.00 ± 6.08	0.50	94	18.80 ± 6.34	0.40 [b]	52	13.00 ± 3.81
1.56E-01	4	4.00 ± 0.00 [a]	0.00	0				
2.35E-01	0							

ee; error estandar

Diferencias significativas en progenie promedio con respecto a su testigo; [a]ANOVA,$p<0.05$; *Dunnett,p<0.05*

Diferencias significativas en fertilidad con respecto a su testigo; [b] Z, $p<0.05$

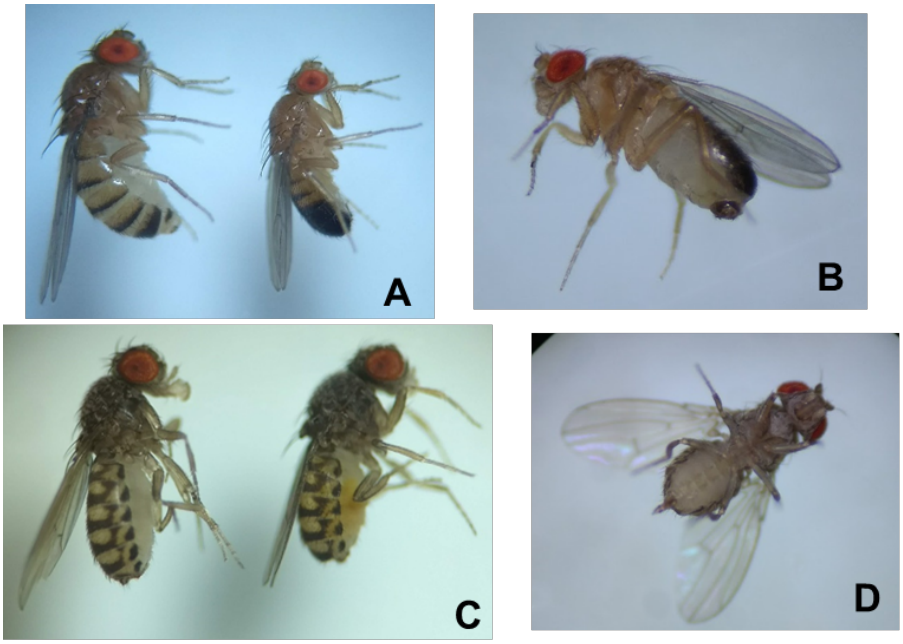


Fig 6 A. Vista dorsal de *D. melanogaster* hembra (izquierda) y macho (derecha) no tratadas y sin daños*; B.* Macho de *D. melanogaster* con la placa evertida; C. Vista dorsal de *D. mülleri* hembra (izquierda) y macho (derecha) no tratadas y sin daños; D. Hembra de *D. mülleri* con la placa evertida. De elaboración propia

La figura 7 compara la fertilidad de: moscas tratadas, F_1 y F_2. El tratamiento de los progenitores afecta su fertilidad y la de los organismos F_1, que resultan de la exposición indirecta a través de las células precursoras de células germinales presentes en las larvas parentales al momento de la exposición. Sin embargo, para la F_2, solo en las moscas descendientes de moscas expuestas a 7.81E-02 se presenta menor fertilidad, pero no se confirmaron diferencias significativas. En el caso de *D. mülleri* (Fig. 8) se encuentran diferencias significativas en las tres generaciones, las moscas progenitoras expuestas directamente, la F_1 (exposición indirecta) y las F_2 (no expuestas).

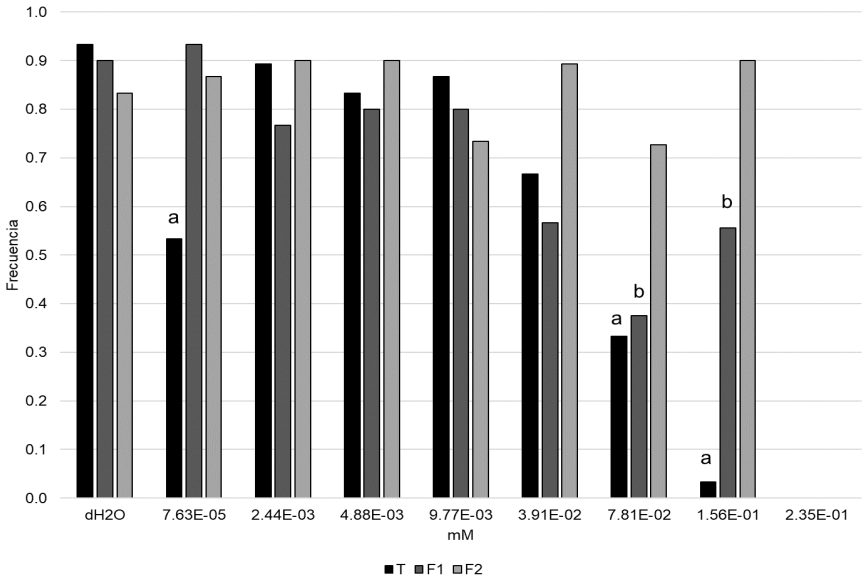


Fig. 7 Fertilidad de moscas *D. melanogaster* tratadas y de las progenies F_1 y F_2. Diferencias significativas entre las moscas parentales experimentales y su testigo correspondiente (Z, $p<0.05$), [a], moscas tratadas; [b], moscas F_1 (exposición indirecta). De elaboración propia

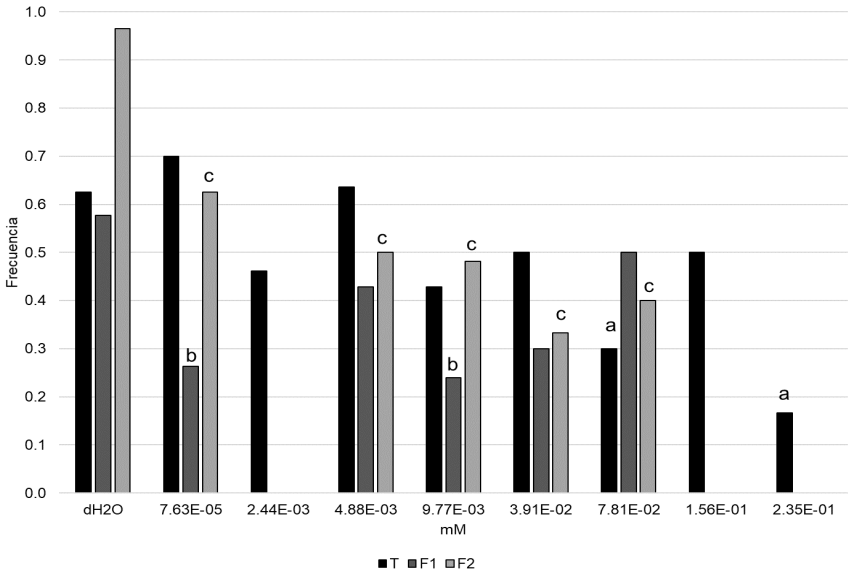


Fig. 8 Fertilidad de moscas *D. mülleri* tratadas y de las progenies F_1 y F_2. Diferencias significativas entre las moscas parentales experimentales y su testigo correspondiente (Z, $p<0.05$); [a], moscas tratadas: [b], moscas F_1 (exposición indirecta); [c], moscas F_2 (no expuestas). De elaboración propia

La figura 9 presenta la sobrevivencia promedio (corregida) de las moscas *D. melanogaster* tratadas y la progenie promedio (corregida) de las generaciones descendientes F_1, F_2 y F_3. El término corregida se refiere a que los valores de los promedios correspondientes se dividieron entre sus testigos para obtener un valor de 1 y poder comparar visualmente a las generaciones. A diferencia de la fertilidad, en la progenie producida sí se presentan diferencias significativas entre las series experimentales y sus testigos correspondientes, aún en la tercera generación.

En el caso de *Drosophila mülleri* que mostró efecto en la fertilidad en todas las concentraciones analizadas, se replica la respuesta en la sobrevivencia y la progenie promedio obtenida en las generaciones analizadas (Fig. 10), en la F_3 ya no se recobró progenie en las concentraciones 2.44E-03.91E-02, 1.56E-01 y 2.35E-01.

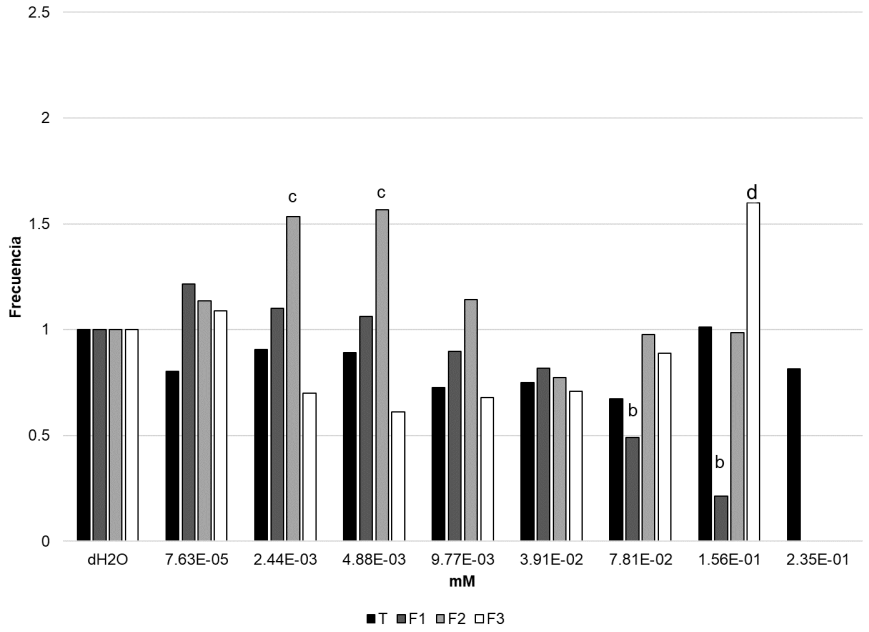


Fig. 9 Progenie promedio de *D. melanogaster* tratadas con NDMA. Diferencias significativas entre las moscas parentales experimentales y su testigo correspondiente (ANOVA, $p<0.05$; Dunnett, $p<0.05$); [a], moscas parentales: [b], moscas F_1 (exposición indirecta); [c], moscas F_2 (no expuestas);[d], moscas F_3 (no expuestas). De elaboración propia

En la Figura 10 se compara la sobrevivencia y la cantidad de progenie de las generaciones analizadas de *D. mülleri*, en donde solo se observan diferencias significativas para los organismos tratados en las concentraciones 1.56E-01 y 2.35E-01, aunque en todas las concentraciones se recuperan menos organismos que en el testigo, para la concentración 3.91E-02 se observan diferencias en la F_1 sobrepasando al testigo por más de la mitad de los organismos.

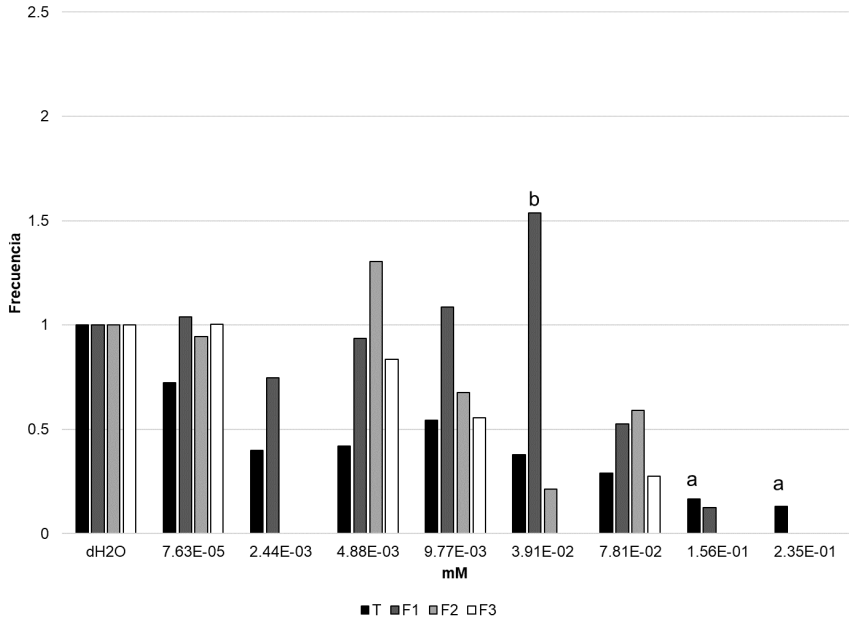


Fig. 10 Progenie promedio de *D. mülleri* tratadas con NDMA. Diferencias significativas entre las moscas parentales experimentales y su testigo correspondiente (ANOVA, $p<0.05$; Dunnett, $p<0.05$); [a], moscas parentales: [b], moscas F_1 (exposición indirecta). De elaboración propia

Los organismos no tratados presentaron alteraciones morfológicas a nivel de placa genital y alteraciones en los testículos, algunos ejemplos se pueden observar en la figura 11, lo que confirma que el efecto de la NDMA continua a lo largo de las generaciones dañando la placa genital de los organismos, aun cuando no fueron tratados directamente.

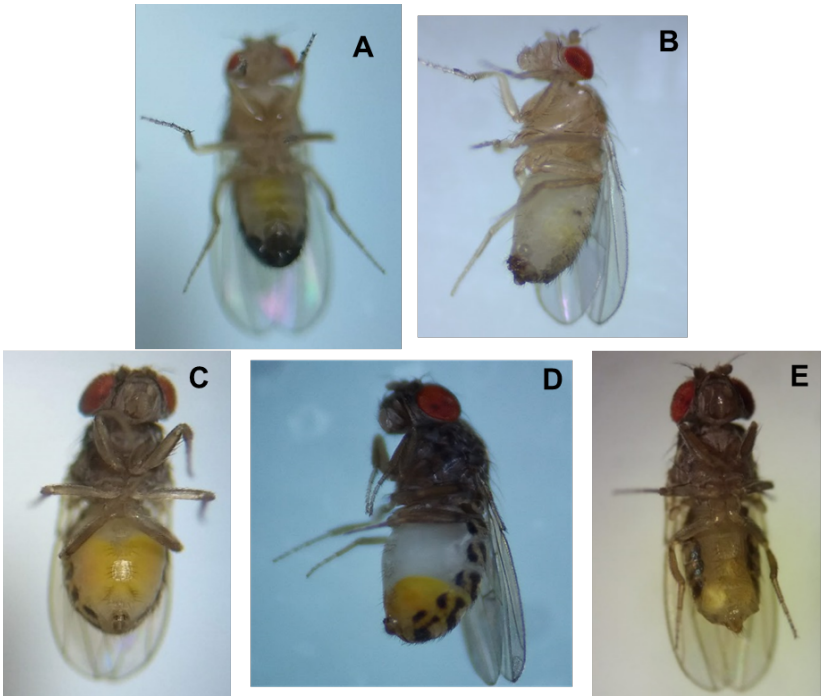


Fig. 11 Moscas de F_2 con daño morfológico; A. Vista ventral de *D. melanogaster* macho; B. *D. melanogaster* macho *con* la placa genital evertida; C. Vista ventral de *D. mülleri*; C. *D. mülleri* macho con los testículos en posición distinta a la habitual; E. *D. mülleri* macho con presencia de un solo testículo. De elaboración propia

5.2. Sensibilidad química

En la Tabla 3 se presenta la sobrevivencia (promedio ± error estándar) de las moscas *D. melanogaster* y *D. mülleri* tratadas con NDMAd. Para *D. melanogaster* no se confirmaron diferencias en la sobrevivencia de las moscas tratadas, pero sí en su fertilidad que resultó afectada en las concentraciones 7.63E-05 y de 7.81E-02 en adelante (Z, $p<0.05$). En el caso de *D. mülleri*, tampoco se confirmaron diferencias en la sobrevivencia promedio, probablemente por el bajo tamaño de muestra recobrado; con respecto a su fertilidad, fue menor o fue nula a 3.91E-02, 1.56E-01 y 2.35E-01 (Z, $p<0.05$).

Tabla 3 Sobrevivencia y fertilidad de moscas *D. melanogaster* y *D. mülleri* tratadas con NDMAd. De elaboración propia

Concentración	Total de moscas	Progenie/Tubo (Promedio ± ee)	Fertilidad	
Drosophila melanogaster				
dH_2O	190	95.00 ± 6.00	0.90	
7.63E-05	157	78.50 ± 22.50	0.50	b
2.44E-03	148	74.00 ± 19.00	1.00	
4.88E-03	111	55.50 ± 0.00	0.90	
9.77E-03	165	82.50 ± 3.50	1.00	
3.91E-02	161	80.50 ± 4.50	0.60	
7.81E-02	136	68.00 ± 13.00	0.00	b
1.56E-01	165	82.50 ± 4.50	0.00	b
2.35E-01	115	57.50 ± 31.50	0.00	b
Drosophila mülleri				
dH_2O	39	19.50 ± 1.50	0.90	
7.63E-05	93	46.50 ± 0.50	0.80	
2.44E-03	74	37.00 ± 11.00	0.60	
4.88E-03	55	55.00 ± 0.00	0.50	
9.77E-03	46	46.00 ± 0.00	0.60	
3.91E-02	82	41.00 ± 5.00	0.30	b
7.81E-02	76	38.00 ± 27.00	0.60	
1.56E-01	84	42.00 ± 26.00	0.00	b
2.35E-01	4	2.00 ± 1.00	0.00	b

ee; error estandar

Diferencias significativas en fertilidad con respecto a su testigo; [b] Z, $p<0.05$

En las figuras 12 y 13 se compara la fertilidad que presentan las cepas de moscas después de ser tratadas con NDMA o con NDMAd. *D. melanogaster* presenta diferencias significativas en las concentraciones 7.63E-05, 7.81E-02 y 1.56E-01 y esterilidad en la concentración 2.35E-01 con la NDMA a diferencia de la NDMAd donde presentan esterilidad desde la concentración 7.81E-02. *D. mülleri* presenta diferencias significativas en 7.81E-02 y 2.35E-01 para NDMA y para la NDMAd en 3.91E-02 y esterilidad tanto en 1.56E-01 como en 2.35E-01.

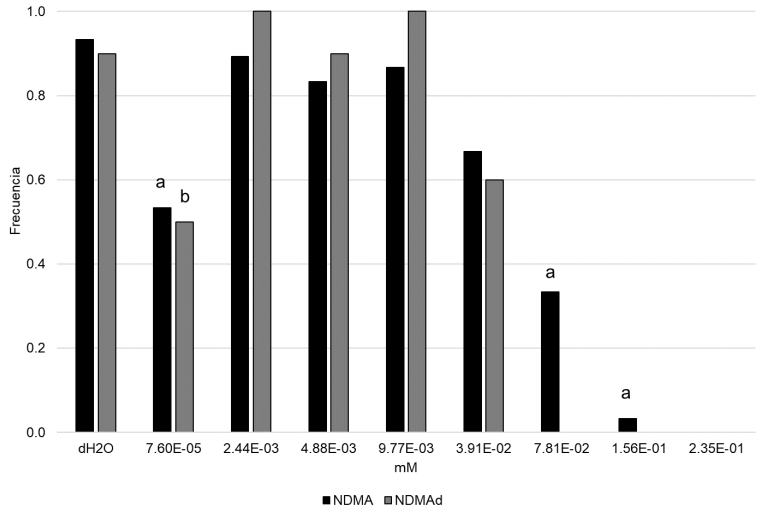


Fig 12 Fertilidad de moscas *D. melanogaster* tratadas con NDMA y NDMAd. Diferencias significativas entre las series tratadas con respecto a sus testigos correspondientes (Z, $p<0.05$), [a]. NDMA; [b]. NDMAd. De elaboración propia

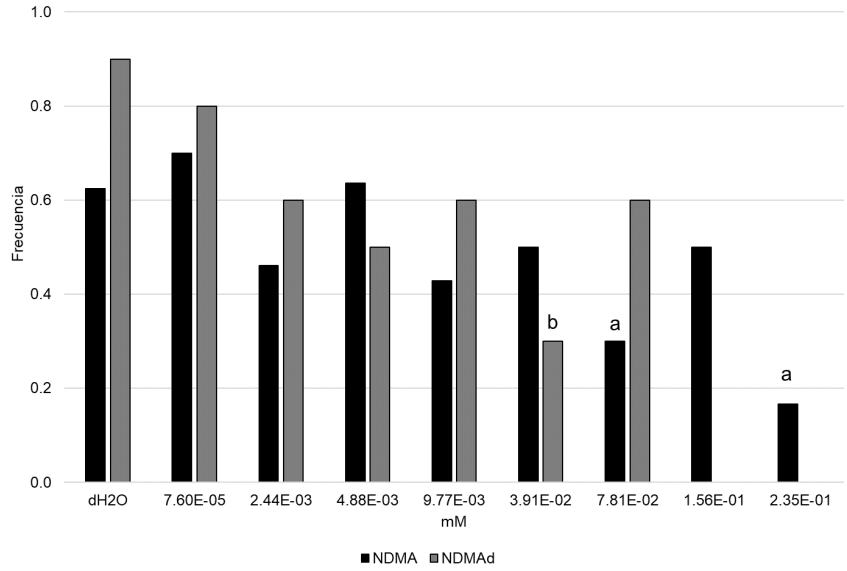


Fig 13 Fertilidad de moscas *D. mülleri* tratadas con NDMA y NDMAd.Diferencias significativas entre las series tratadas con respecto a sus testigos correspondientes (Z, $p<0.05$), [a]. NDMA; [b]. NDMAd De elaboración propia

Ambas cepas de moscas, *D. mülleri* y *D. melanogaster*, mostraron pérdida de fertilidad con la NDMA y la NDMAd, por lo que resultan ser sensibles a la diferencia química de los compuestos.

En la figura 14 se compara la sobrevivencia de los organismos expuestos a NDMA y NDMAd de ambas especies y se observa una respuesta diferente entre el compuesto químicamente decaído y el activo. Además, al ser graficas con valores corregidos se pueden comparar dos parámetros, en este caso sobrevivencia y fertilidad, el efecto más contundente se observa en *D. mülleri* ya que la sobrevivencia de los organismos sobrepasa al testigo en casi todas las concentraciones, aunque la fertilidad es menor respecto al testigo en todas las concentraciones.

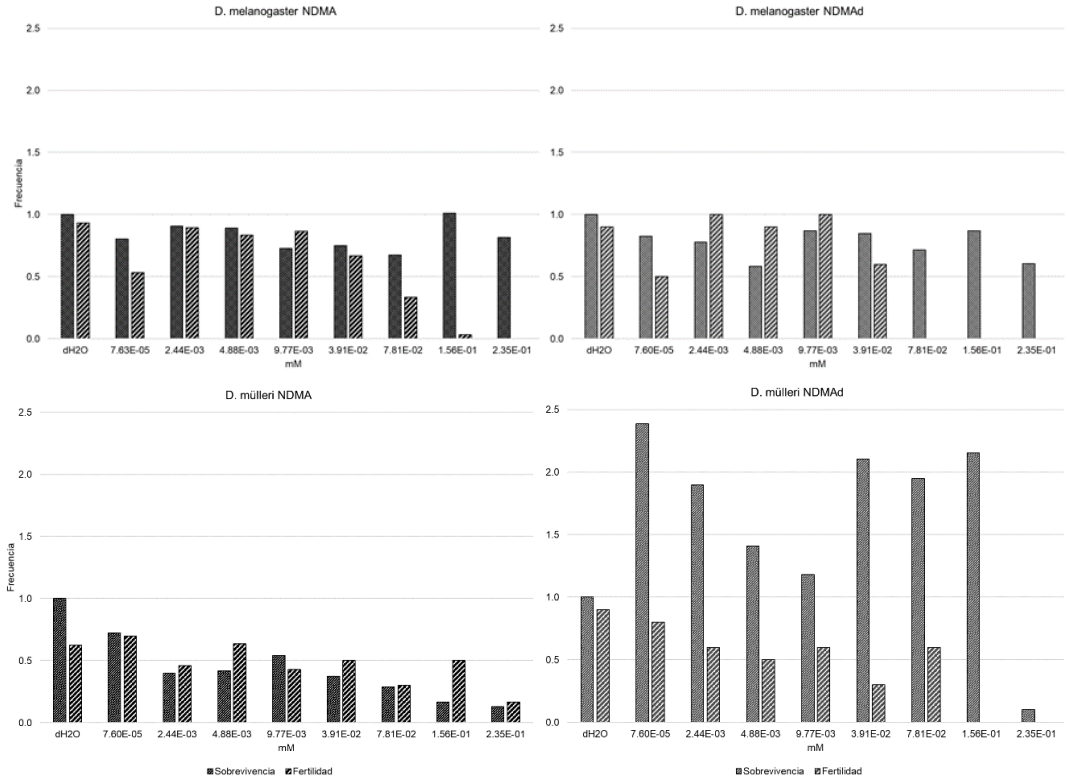


Fig 14 Sobrevivencia de los organismos tratados y su fertilidad comparando el compuesto activo y decaído. De elaboración propia.

6. **Discusión**

Los organismos son sometidos a tratamiento en el tercer estadio larvario, este estadio representa una etapa importante porque en éste la actividad enzimática es parecida a la actividad que expresa la mosca adulta, además en esta etapa las células, tejidos y órganos alcanzan su diferenciación, por lo que es el estadio adecuado para observar la actividad de un compuesto a nivel de desarrollo. En este trabajo se usaron concentraciones analizadas en otros proyectos de nuestro grupo de trabajo (Ramos-Morales and Vega García, 2008; Ramirez Flores, 2015), donde se describió la respuesta de *D. melanogaster* y *D. mülleri* para el primero y *D. melanogaster* y *D. mojavensis* para el segundo, donde además se describió la dosis letal al compuesto.

Con respecto al daño reprotóxico, los factores que modifican la respuesta tóxica de un compuesto pueden recaer tanto en el agente químico como en el modelo biológico (Repetto Jiménez and Repetto Kuhn, 2009). En este trabajo las dos especies de *Drosophila* reúnen a moscas con diferencias en cuanto a la viabilidad y número de progenie, pero la respuesta de genotoxicidad que se obtiene es similar. Ambas especies fueron sensibles a la NDMA químicamente activa con respuestas positivas y negativas, la respuesta se encuentra en concentraciones bajas lo cual deja ver que la exposición a una cantidad mínima de compuesto sigue causando efectos adversos (Lovell, 2000). No se encuentra una respuesta lineal en la respuesta, más bien esta es muy variable, lo que es característico de las dosis bajas (Calabrese, 2003).

La NDMA es un promutágeno que alcanza su actividad genotóxica al metabolizarse por una isoforma del citocromo CYP2E1 en *Drosophila* (Williams, Mori and McQueen, 1989; Anderson *et al.*, 1992; Le Goff *et al.*, 2006). Dado que las dos especies presentan variaciones en su metabolismo esto podría explicar en parte que *D. mülleri* mantiene fertilidad en concentraciones mayores que *D. melanogaster*, dado que podría ser menos eficiente en transformar el compuesto por lo que los metabolitos causantes del daño se encuentren en menor cantidad. Sin embargo, un aspecto importante es que para ambas cepas de moscas la concentración más alta utilizada, 2.3E-01 fue tóxica ya sea para el organismo expuesto o en la capacidad reproductiva de las moscas sobrevivientes.

El efecto en la fertilidad es uno de los bioindicadores más importantes para comparar la actividad de la NDMA. En estudios previos, se mostró que la exposición de larvas de *Drosophila* a este compuesto afecta la fertilidad de las moscas sobrevivientes porque interfiere con la formación de los testículos en las

moscas expuestas y en la progenie F_1 (Ramos-Morales and Vega García, 2008; Ramirez Flores, 2015). No obstante, no se exploró la capacidad reproductiva de las moscas F_1. En este trabajo se busca documentar el alcance de la exposición a la NDMA.

Tanto en *D. melanogaster* como en *D. mülleri*, se confirmó el efecto tóxico y reprotóxico de la NDMA, el cual se ubicó principalmente en las moscas expuestas cuando larvas (exposición directa) y en la progenie F_1 (que recibió una exposición indirecta porque en las larvas expuestas ya se encuentran las células precursoras de las células germinales que les darán origen) Ramos et al (1993) y Markow y O'Grady (2005).

Para que ocurra un efecto transgeneracional no debe haber ningún tipo de contacto entre el agente causal y el efecto analizado, que en este estudio implica a las generaciones F_2 y F_3. En ambas cepas utilizadas se encontraron diferencias significativas en la fertilidad y en la progenie promedio por tubo (pareja) en algunas concentraciones, lo que indica que una sola exposición a la NDMA genera efectos transgeneracionales (Hanson and Skinner, 2016). Es importante considerar que la NDMA es un agente alquilante que dona grupos alquilo a las bases del DNA, lo que podría sugerir un cambio en el patrón de metilación que puede perdurar por más de una generación, implicando la participación de mecanismos epigenéticos (Skinner, 2008).

Con respecto al compuesto activo y el químicamente decaído (NDMAd), tanto *D. melanogaster* como *D. mülleri* mostraron ser organismos sensibles a la diferencia química entre éstos. Se ha mostrado que las moscas del género *Drosophila* comparten gran parte de los genes involucrados en el metabolismo, si bien hay algunas diferencias en la expresión de las proteínas involucradas en la respuesta genotóxica, asociadas con la adaptación de las especies a los ambientes en los que habitan (Yang *et al*., 2007), la sensibilidad de las cepas utilizadas fue similar y en ambos casos el patrón de respuesta evaluado a través de la sobrevivencia de las moscas al tratamiento y su fertilidad mostraron que el tratamiento con NDMA y NDMAd tuvo un impacto diferente en la sobrevivencia de las moscas expuestas y en su fertilidad como se muestra en la figura 14.

Es importante que, en la evaluación de la actividad genotóxica de los contaminantes se incluya el efecto reprotóxico en los organismos expuestos y que se amplíe el estudio hacia las siguientes generaciones. El uso de *D. mülleri* es una ayuda importante porque con su característica de testículos pigmentados, es posible valorar el daño morfológico en una primera aproximación, lo que permite obtener cruces adicionales para el seguimiento de la progenie. Es necesario

continuar con la validación del modelo de *D. mülleri* para probar su sensibilidad ante sustancias pertenecientes a otros grupos químicos y también para establecer la correlación entre el diagnóstico de alteraciones en las gónadas masculinas por inspección visual y por disección directa.

Es de gran importancia estudiar la capacidad reproductiva en ambientes naturales perturbados por químicos o actividades antropogénicas, pues esto puede afectar no solo la reproducción sino la calidad y cantidad de descendencia, lo que es fundamental para establecer poblaciones exitosas (Marshall and Uller, 2007), por esto es significativo encontrar organismos que contribuyan al estudio de estos efectos.

7. **Conclusiones**

Drosophila mülleri y *Drosophila melanogaster* son moscas con diferencias en fertilidad y viabilidad, sin embargo, ambas especies son sensibles al promutágeno N-nitrosodimetilamina en su forma química activa y decaída.

La NDMA presenta efectos que en la fertilidad y fecundidad de ambas cepas (daño reprotóxico) y de las generaciones posteriores que no fueron expuestas (daño transgeneracional).

Ambas cepas son sensibles a los cambios químicos que puedan sufrir los compuestos por lo que resultan ser buenos biomonitores para el estudio de ambientes diversos.

Aunque *Drosophila mülleri* muestra ser un modelo confiable, aún tiene que seguir siendo calibrado y comparar su respuesta con relación a otras especies químicas y constrastar su sensibilidad con la de *Drosophila melanogaster*.

Agradecimientos

A la Biol. Hernández B. Blanca por su apoyo en la revisión y disección de organismos tratados, a la Dra. Adriana Muñoz por su asesoramiento y apoyo técnico en el uso de compuestos químicos, a la Biol. Arroyo J. Estefania por el asesoramiento con datos estadísticos, a la al Banco de moscas UNAM por el material brindado. Taller de Introducción a la toxicología genética y ambiental, Licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. Proyecto PAPIIT (IN229719), DGAPA UNAM.

8. **Referencias**

Adams, M. D. *et al.* (2000) 'The genome sequence of Drosophila melanogaster', *Science*, pp. 2185–2195. doi: 10.1126/science.287.5461.2185.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2005) *ATSDR - Public Health Statement: Lead*, *Toxic Substances Portal*.

Anderson, L. M. *et al.* (1992) 'Reduced Blood Clearance and Increased Urinary Excretion of AT-Nitrosodimethylamine in Patas Monkeys Exposed to Ethanol or Isopropyl Alcohol1', *Cancer Research*, 52(6), pp. 1463–1468.

ATSDR (1999) 'ToxFAQs™: n-Nitrosodimetilamina'.

Avanesian, A., Semnani, S. and Jafari, M. (2009) 'Can Drosophila melanogaster represent a model system for the detection of reproductive adverse drug reactions?', *Drug Discovery Today*, pp. 761–766. doi: 10.1016/j.drudis.2009.05.010.

Baars, A. J. *et al.* (1980) 'PRELIMINARY STUDIES ON THE ABILITY OF DROSOPHILA MICROSOMAL PREPARATIONS TO ACTIVATE MUTEGENS AND CARCINOGENS', 72, pp. 257–264.

Botas, J. (2007) 'Drosophila researchers fous on human disease', 39(5), pp. 1–3. Available at: papers://7099978e-8acd-471e-91cc-40e05c1777dc/Paper/p114.

Brusick, D. J. (1987) 'Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation', *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/0165-1218(87)90026-7.

Butterworth, F. M., Gunatilaka, A. and Gonsebatt, M. E. (2001) *Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*.

Calabrese, E. J. (2003) 'The maturing of hormesis as a credible dose-response model'.

California Environmental Protection Agency (2006) 'Public Health Goal for chemicals in Drinking Water : N-Nitrosodimethyamine', (December).

CONAPO **2019,** http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/Mapa_Ind_Dem18/index.html

Choy, W. N. (2001) *Genetic toxicology and cancer risk assessment*, *Hardcover Publisher*.

Clark, A. M. (1982) 'The use of larval stages of Drosophila in screening for some naturally occurring mutagens', 2, pp. 89–97.

Dang, K. D., Dutt, P. B. and Forsdyke, D. R. (1998) *Chargaff difference analysis of the bithorax complex of Drosophila melanogaster.*, *Biochemistry and Cell Biology*.

EPA (2014) 'ATSDR Technical Fact Sheet – N-Nitroso-dimethylamine (NDMA)', (January), pp. 1–6. Available at: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_contaminant_ndma_january2014_final.pdf.

Fischer, J. A. and Maniatis, T. (1985) 'Structure and transcription of the Drosophila mulleri alcohol dehydrogenase genes', *Nucleic Acids Research*, 13(19), pp. 6899–6917. doi: 10.1093/nar/13.19.6899.

Fournier, D. *et al.* (2006) 'Biotransformation of N -Nitrosodimethylamine by Pseudomonas mendocina KR1 ', 72(10), pp. 6693–6698. doi: 10.1128/AEM.01535-06.

Gichner, T., Velemínský, J. and Underbrink, A. G. (1980) 'Induction of somatic mutations by the promutagen dimethylnitrosoamine in hairs of tradescantia stamen', *Mutation Research - Genetic Toxicology*, 78(4), pp. 381–384. doi: 10.1016/0165-1218(80)90045-2.

Giraudo, M. *et al.* (2011) 'Regulation of cytocrome P450 expression in Drosophila: Genomic insights', 97(2), pp. 115–122. doi: 10.1016/j.pestbp.2009.06.009.Regulation.

Le Goff, G. *et al.* (2006) 'Xenobiotic response in Drosophila melanogaster: Sex dependence of P450 and GST gene induction', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8), pp. 674–682. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.05.009.

González Cervera, A. S. (2006) 'Subfecundidad e infertilidad en mujeres mexicanas.', pp. 1–9.

Guerrero, G. and Lorenzana-Jiménez, M. (2009) 'Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos', *Rev Fac Med UNAM*, 3(April), p. 108. doi: 10.3389/fmicb.2012.00108.

Hällström, I. (1985) 'Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in Drosophla melanogaster. II. Localization of some genes regulating cytochrome P-450 activity.', 56, pp. 173–184.

Hällström, I. and Blanck, A. (1985) 'Genetic variation in cytochrome -p450 in xenobiotic metabolism in Drosophila melanogaster', 56, pp. 157–171.

Hammoud, A. *et al.* (2010) 'Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City', *Fertility and Sterility*, 93(6), pp. 1875–1879. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.089.

Hanson, M. A. and Skinner, M. K. (2016) 'Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance', (November 2015), pp. 1–9. doi: 10.1093/eep/dvw002.

Hasson, E., Naveira, H. and Fontdevila, A. (1992) 'The Breeding Sites of Argentinean Cactophilic Species of the Drosophila-Mulleri Complex (Subgenus Drosophila-Repleta Group)', *Revista Chilena De Historia Natural*, 65(3), pp. 319–326.

Ianella, P., Azeredo-Oliveira, M. T. V. and Itoyama, M. M. (2008) 'Programmed cell death in salivary glands of Drosophila arizonae and Drosophila mulleri', *Genetics and Molecular Research*, 7(2), pp. 476–486. doi: 10.4238/vol7-2gmr412.

J. T. Patterson (1943) *FlyBase Archive server: last updated november 2004*, *STUDIES IN THE GENETICS OF DROSOPHILA III. THE DROSOPHILIDAE OF THE SOUTHWEST*.

King, R. C., Aggarwal, S. K. and Aggarwal, U. (1968) 'The development of the female Drosophila reproductive system', *Journal of Morphology*, 124(2), pp. 143–165. doi: 10.1002/jmor.1051240203.

Lodola, A. and Stadler, J. (2011) *Pharmaceutical Toxicology in Practice: A Guide for Non-Clinical Development*, *Pharmaceutical Toxicology in Practice: A Guide for Non-Clinical Development*. doi: 10.1002/9780470909911.

Lovell, D. P. (2000) 'Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: Statistical models and study design', *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1), pp. 87–95. doi: 10.1016/S1383-5718(99)00169-2.

Markow, T. A. and O'Grady, P. M. (2007) 'Drosophila biology in the genomic age', *Genetics*, pp. 1269–1276. doi: 10.1534/genetics.107.074112.

Marshall, D. J. and Uller, T. (2007) 'When is a maternal effect adaptive?', *Oikos*, 116(12), pp. 1957–1963. doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x.

Moore, D. S. (2005) *Estadística aplicada básica*. Antoni Bos.

Nöthiger, R. (1970) 'Sucrose density separation - a method for collecting large nombers of Drosophila larvae.', (February), p. 1970.

Rajpurohit, S. *et al.* (2013) 'Functional genomic and phenotypic responses to desiccation in natural populations of a desert drosophilid', *Molecular Ecology*, 22(10), pp. 2698–2715. doi: 10.1111/mec.12289.

Ramirez Flores, M. F. (2015) 'Uso de Drosophila mojavensis para evaluar daño reprotoxico y transgeneracional.pdf'.

Ramos-Morales, P. and Vega García, C. C. (2008) 'DMN disturbs sex differentiation and induces transgenerational damage from affected males', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49.

Ramos Morales, P. *et al.* (1993) 'Manual de Laboratorio de Genética de Drosophila melanogaster'. McGraw-Hill, ISBN: 970-10-0222-9, México, D.F., p. 131.

Repetto Jiménez, M. and Repetto Kuhn, G. (2009) *Toxicología Fundamental*. 4a edn. Edited by D. de Santos.

Silbergeld, E. (2000) 'Toxicologia, principios generales de la toxicología', *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, pp. 1–84.

Silbergeld, E. (no date) 'Toxicología Herramientas y Enfoques: Definiciones y Conceptos', *Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo*, p. 82. Available at: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf.

Skinner, M. K. (2008) 'What is an epigenetic transgenerational phenotype ? F3 or F2', 25, pp. 2–6. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.09.001.

Streffer, C. *et al.* (2004) *Low Dose Exposures in the Environment. Dose-Effect Relations and Risk Evaluation*.

Williams, G. M., Mori, H. and McQueen, C. A. (1989) 'Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals', *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 221(3), pp. 263–286. doi: 10.1016/0165-1110(89)90039-0.

Yang, J. *et al.* (2007) 'Comparative Genomics A Drosophila systems approach to xenobiotic metabolism', (26), pp. 223–231. doi: 10.1152/physiolgenomics.00018.2007.

Capítulo 23

MORFOLOGÍA Y ALTERACIONES EN CÉLULAS SANGUÍNEAS EN PECES DE TECOLUTLA, VER., MANANTLÁN, JAL. Y VALLE DE BRAVO, EDO DE MÉX.

Brian Real-Huescas [1]

José Roberto Jerónimo-Juárez [1]

Misael Hernández-Díaz [1]

Irma Hernández-Calderas[1]

Fernando M. Matadamas-Guzmán[1]

Patricia Ramírez-Romero[1]

Xochitl Guzmán-García[1*]

[1] Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco. No. 186. Colonia Vicentina. Alcaldía de Iztapalapa. C.P. 09340. Ciudad de México.

* xgg@xanum.uam.mx

Resumen

Los contaminantes, derivados en su mayoría de actividades antropogénicas llegan a los ecosistemas y pueden provocar alteraciones en los organismos. Los peces son ampliamente utilizados en estudios ecotoxicológicos, sin embargo, no existen parámetros hematológicos para el diagnóstico de su salud. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología y alteraciones hematológicas en peces recolectados en Tecolutla, Ver., Manantlán, Jal., y Valle de Bravo, Edo. De Mex., para determinar su estado de salud y generar información útil en los programas de conservación. Se recolectaron cinco bagres (*Ariopsis felis*) en el municipio de Tecolutla, Veracruz, mientras que se recolectaron cinco carpas tanto en Manantlán, Jalisco como en Valle de Bravo, Edo. de México. Los organismos fueron anestesiados con benzocaína 1g/15L de agua y se registraron sus parámetros morfométricos. Se obtuvo sangre y se realizaron 45 frotis que fueron teñidos con Giemsa y analizados al microscopio óptico. Este análisis caracterizó las células de la serie roja y blanca, e identificó alteraciones en la morfología de las mismas. Las alteraciones observadas fueron poiquilocitosis, equinocitos, anisocitosis, alteraciones asociadas al contenido de hemoglobina, cuerpos de Heinz, eritrocitos lisados, eritroblastos, basofilia y células blásticas. Los grupos celulares fueron análogos en las especies analizadas, sin embargo, se observó una alta prevalencia de alteraciones patológicas en el pez bagre con respecto a la carpa. El análisis de las alteraciones observadas, indicó que la salud de los peces se encuentra comprometida en las localidades de Tecolutla y Manantlán, mientras que, en Valle de Bravo, la incidencia de alteraciones es menor.

Palabras clave: hematología, peces, alteraciones, contaminación acuática, bagre, carpa.

1. Introducción

Los cuerpos acuáticos se consideran uno de los ambientes más vulnerables ante el efecto de los contaminantes (Vázquez-Botello, Villanueva-Fragoso, Gutiérrez, & Rojas-Galaviz, 2010). Los contaminantes, derivados en su mayoría de actividades antropogénicas, llegan a los ecosistemas y pueden provocar alteraciones fisiológicas en los organismos que ahí se desarrollan (Galeano, Prat, Guagliardo, Schwerdt, & Tanzola, 2010).

Los peces son un grupo biológico utilizado como indicador en estudios ecotoxicológicos, también llamados bioindicadores. Los peces, son buenos indicadores debido la gama de métodos analíticos que se les puede aplicar, y también por el amplio conocimiento que se tiene sobre ellos, como son: la capacidad migratoria, la variedad de ambientes que habitan, el tamaño, la longevidad, la participación en cadenas tróficas como consumidores primarios y secundarios, así como, el número de especies conocidas (Chovanec, Hofer, & Schiemer, 2003). Además los peces son considerados excelentes organismos bioindicadores porque son capaces de indicar el nivel de degradación y de definir el éxito de restauración de los ecosistemas acuáticos a partir del monitoreo ambiental y evaluación de diversos parámetros (Parmar, Rawtani, & Agrawal, 2016). De igual forma, representan un vector de comunicación útil, que ayuda a sensibilizar a la población y autoridades de un sitio en particular sobre la necesidad de preservar la calidad de ríos y lagos.

La carpa (*Cyprinus carpio*) tiene un volumen de producción de 54,964 toneladas, lo que representa el 4.4 % de la producción pesquera nacional, mientras que el bagre (*Ariopsis felis*) presenta un volumen de producción pesquera de 8,274 toneladas, lo que representa el 0.38 % de la producción pesquera total del país (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), 2017). El bagre y la carpa se distribuyen ampliamente, tiene hábitos bentónicos y sensibilidad ante el estrés ambiental (J. S. Azevedo, Sarkis, Hortellani, & Ladle, 2012; de Pedro *et al.*, 2004). La descripción morfológica de las células sanguíneas ha demostrado semejanzas en diferentes especies de peces teleósteos, como el bagre y la carpa (Ellis, 1976). Las células sanguíneas de estos peces se semejan en tipo, morfología, tinción y tamaño (Galeano *et al.*, 2010; Tavares-Dias, Affonso, Oliveira, Marcon, & Egami, 2008).

En la evaluación de la contaminación acuática, se recomiendan estudios ecotoxicológicos para conocer los efectos sobre las especies, a través del uso de biomarcadores (Castaño *et al.*, 2003; Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Un biomarcador es una señal identificable evaluada por cambios en fluidos corporales, células o

tejidos, que proporciona advertencias tempranas del daño provocado por agentes tóxicos o contaminantes (Centeno *et al.*, 2007; Newton & Gregory Cope, 2006). El biomarcador histopatológico genera información relacionada con el impacto de los contaminantes, por lo que su uso ha sido ampliamente en estudios ecotoxicológicos en la evaluación de riesgo y monitoreo ambiental (Rašković *et al.*, 2013; Toro-Restrepo, 2011; Yancheva, Velcheva, Stoyanova, & Georgieva, 2016).

Actualmente, dentro de los protocolos para el monitoreo de la contaminación, existe un consenso en el uso del índice de condición histopatológica. Este índice, toma en cuenta alteraciones en la circulación como hemorragia, hiperemia, edema, telangiectasia y aneurismas (Costa, 2018). En el biomonitoreo de la contaminación, es relevante la estandarización, cuantificación y categorización de las alteraciones para estimar índices que permitan inferir el impacto del estrés ambiental. Se requiere el desarrollo de métodos y normas alternativas para la evaluación del efecto de la contaminación en organismos acuáticos, incluyendo los peces. El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, por sus siglas en Ingles) ha señalado la importancia de promover métodos alternativos importantes para la biociencia, que incluyan técnicas no letales y la utilización de células, para reducir, refinar y remplazar el uso de animales de laboratorio (Castaño *et al.*, 2003).

Dentro de los estudios tisulares, la sangre resulta una herramienta clave para determinar las alteraciones y el grado de daño que presentan los organismos en un ambiente determinado (Valenzuela, Oyarzún, & Silva, 2003). En la sangre se llevan a cabo procesos fisiológicos fundamentales como el transporte de oxígeno y nutrientes, la eliminación de sustancias tóxicas y los procesos de biotransformación y de excreción de los contaminantes. El análisis de sangre se puede realizar mediante pruebas químicas y morfométricas, tal es el caso de la citometría hemática (Valenzuela *et al.*, 2003). La citometría hemática (citos = células; metros = medida; haematikos = relativo a la sangre), permite obtener y analizar diversos parámetros, como son la morfología celular y sus alteraciones. El análisis comprende el estudio de la serie blanca, la serie roja y la serie plaquetaria, los cuales son los componentes principales de la sangre. La serie blanca está conformada por neutrófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos y basófilos, mientras que, la serie roja está conformada de eritrocitos, y la serie plaquetaria de trombocitos (Alaye-Rahy & Morales-Palacios, 2013).

Los peces, que han sido expuestos crónicamente a diferentes contaminantes, presentan alteraciones en el número de células y su morfología. Las alteraciones están asociadas a patologías como anemias, hemólisis,

hemorragias, infiltración, neoplasia, entre otros (Guzmán Paredes, Matadamas Guzmán, Maldonado, & Guzmán-Garcia, 2014). Otra serie de trabajos, han determinado alteraciones como poiquilocitosis, anisocitosis, anisocromia y su importancia patológica (Tabla 1).

La sangre en los peces, constituye un tejido que se puede muestrear de manera no letal, ofrece una alternativa analítica para determinar el estatus de salud, sin embargo la evaluación de hemogramas y la falta de valores de referencia hematológicos y bioquímicos representan una limitación (Duman, Saticioglu, Suzer, & Altun, 2019; Kumar, 2016; Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Los valores de referencia derivados de la evaluación de de los parámetros hematológicos y químico, incluyen una lista de variables potencialmente útiles tan amplia como el número de componentes sanguíneos, de ahí que es de suma importancia seleccionar los marcadores sanguíneos (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). La caracterización morfológica y sus alteraciones, como marcador sanguíneo, pueden proporcionar información de referencia hematológica, así como reflejar alteraciones derivadas de la exposición a contaminantes, reducir el costo de análisis y es un método que permite un tiempo de espera, desde la toma de la muestra hasta su análisis en el laboratorio.

En los programas y proyectos de monitoreo ambiental en México, se han realizado estudios tisulares en sistemas acuáticos, sin embargo, no existe un protocolo para utilizar las características de las células de la sangre en peces y sus alteraciones, como biomarcador. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología y las alteraciones de las células sanguíneas en peces recolectados en Tecolutla, Ver., Manantlán, Jal. y Valle de Bravo, Edo. Méx., con el fin de establecer cuadros patológicos de referencia y determinar el estado de salud de los peces, generando información que puede ser utilizada en los programas de uso y conservación de los sistemas acuáticos.

Tabla 1. Alteraciones en las células sanguíneas de los peces y su significancia patológica. De elaboración propia

Alteración	**Asociación**
Serie roja	
Poiquilocitosis	Daño a la membrana celular, dificultando así el transporte de oxígeno y nutrientes. También se infieren asociaciones a anemias por deficiencia de hierro y vitaminas (T. M. P. Azevedo, Albinati, Guerra-Santos, Lira, & Ayres, 2014).

Anisocitosis	Anemias que generan deficiencias en la producción uniforme de hematíes. Generada por la deficiencia en el transporte de oxígeno (M. L. Martins, Tavares-Dias, Fujimoto, Onaka, & Nomura, 2004).
Anisocromia	Directamente relacionado con anemia por deficiencia de hierro. Dificultad para formar los grupos hemo en la síntesis de hemoglobina. Retención total o parcial del oxígeno (M. L. Martins *et al.*, 2004). Enfermedades inflamatorias, renales o esplénicas, trastornos nutricionales, toxinas, traumatismos, ulceraciones cutáneas, parasitismos, septicemia bacteriana o viral (Hahn-von-Hessberg, Quiroz-Bucheli, & Grajales-Quintero, 2014).
Eritroblastos	Asociados a patologías y anemias severas. Alteración o daño en órganos hematopoyéticos. La presencia de eritroblastos ortocromáticos detiene el proceso de mitosis (Villa *et al.*, 2008).
Serie blanca	
Células inmaduras de serie mieloide	Patologías severas, asociadas a neoplasias(Tavares-Dias *et al.*, 2008).
Abundantes Basófilos	La prevalencia de estas células puede indicar procesos inflamatorios, infecciosos y alérgicos. En la mayoría de los casos ligados a presencia de parásitos (M. Martins *et al.*, 2004; Odaka, Suetake, Maeda, & Miyadai, 2018).
Abundantes Eosinófilos	Procesos infecciosos y alérgicos (T. M. P. Azevedo *et al.*, 2014; M. Martins *et al.*, 2004).

1.1 Área de estudio

En México existen diferentes sitios acuáticos de interés para monitorear el estado de salud de los organismos y los efectos de los contaminantes. El sistema acuático de Tecolutla, Veracruz, ha sido monitoreado desde 2010 como parte del proyecto de investigación "Indicadores de integridad ecológica y salud ambiental" (Guzmán-García, Ramirez-Romero, & Barrera-Escorcia, 2018).

Al mismo tiempo, en el año 2010 y 2011, fueron reconocidos como sitios prioritarios para el monitoreo de la contaminación por el Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental "PRONAME" la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Manantlán, ubicada en Jalisco, y el Área de Protección de Recursos Naturales de Valle de Bravo, ubicado en el Estado de México (Figura 1) (Ramírez-Romero *et al.*, 2011).

Tecolutla es una zona turística importante (la playa más cercana al Ciudad de México), con riqueza de flora y fauna, pero existen escasos estudios en cuanto

a la calidad del sistema y el estado de salud de sus recursos (López-Portillo, Gómez-Aguilar, & Vázquez, 2009). En Tecolutla, Veracruz se ha detectado la presencia de metales y plaguicidas, así como bacterias coliformes totales y fecales. Así mismo, se ha determinado que la calidad sanitaria del río se encuentra en una escala "regular" de salud (de acuerdo con el rango de Brown 51-70), debido a que los desechos urbanos se depositan en el río (Arriaga-Gaona *et al.*, 2009).

La Reserva de la Biosfera de la Sierra de Manantlán se encuentra en el municipio de Jalisco. Es un área protegida en México desde 1987 reconocida por su riqueza natural, extensión territorial y servicios ambientales que ofrece. Se ha reportado la presencia de hasta 16 órdenes de peces de 8 familias diferentes, entre otros organismos. En la Reserva se encuentran las cuencas de los ríos Ayuquila-Armería, Marabasco y Purificación, cuya aportación de agua abastece a 430 mil habitantes de la región (SEMARNAT, 2018). En este sitio, se ha documentado la presencia en suelos de algunos metales (mercurio) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), tales como el Naftaleno, Pireno y Benzo(a) pireno, entre otros, mientras que en los cuerpos acuáticos sólo se ha detectado la presencia de Naftaleno (Ramírez-Romero *et al.*, 2011).

El Área de Protección de Recursos Naturales de Valle de Bravo fue declarada área natural protegida desde 1941. En esta área se tienen registradas 80 especies de flora y fauna, entre ellas algunas especies acuáticas exóticas. Debido a las practicas acuícolas de la región, se han introducido especies externas que han restringido el acceso al alimento a las especies endémicas (SIMEC, 2019). Por otra parte, en muestras de agua de río de Valle de Bravo, se han detectado bacterias coliformes fecales y 11 compuestos orgánicos volátiles (COSVS), entre los que destacan el Pireno y el Fluoranteno (Ramírez-Romero *et*

al., 2011).

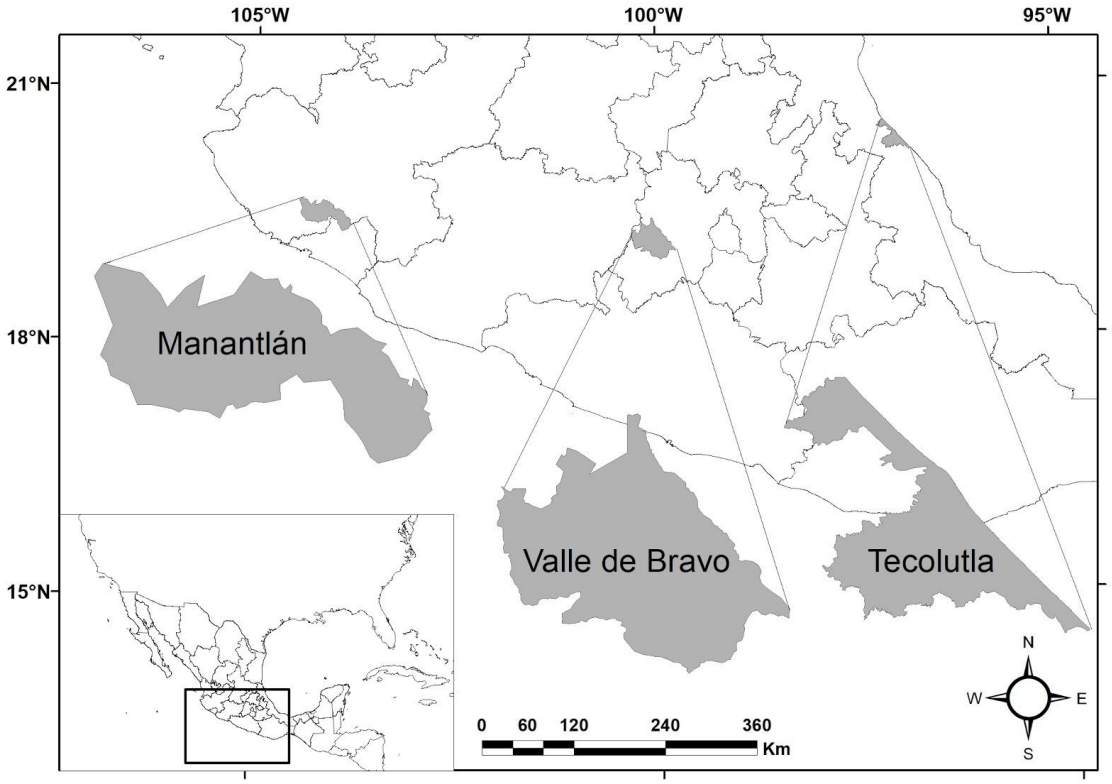


Figura 1. Ubicación geográfica del área de estudio. En orden de aparición, izquierda Manantlán, Jalisco; centro Valle de Bravo, Estado de México; derecha Tecolutla, Veracruz. De elaboración propia.

2. Materiales y métodos

En Tecolutla, Veracruz, cinco bagres (*Aripsis felis*) fueron recolectados. Mientras que, tanto en Manantlán, Jalisco como en Valle de Bravo, Edo. de México, cinco carpas (*Ciprinus carpio*) fueron recolectadas. Los peces fueron capturados con red de nylon tipo sedal y anestesiados con benzocaína 1g/15 L de agua, según las técnicas de sedación recomendadas para bagre y carpa (Neiffer & Stamper, 2009; Readman, Owen, Knowles, & Murrell, 2017; Trushenski, Johnson, & Bowker, 2018). Posteriormente, los datos morfométricos de referencia, como longitud (cm), alto (cm), ancho (cm) y peso (g), se registraron utilizando un ictiómetro y una balanza marca OHAUS modelo CT600-S.

De cada uno de los organismos, 1 ml de sangre fue extraída con jeringas de 3 ml previamente heparinizadas. La sangre se obtuvo de la línea lateral en la zona caudal del pez (Figura 2). Por cada mililitro de sangre se realizaron 3 frotis que implican el extendido de sangre sobre un portaobjetos. Los frotis fueron fijados y teñidos con Giemsa (Barcia, 2007), y después se analizaron 10,000 células por frotis en un microscopio óptico marca CARL ZEISS® Primo Star con objetivo de inmersión 100x, acoplado a una cámara marca CANON® modelo Power Shot G10. Los frotis fueron analizados de manera sistemática con el patrón en serpentina o "almena", que minimiza los errores de distribución y siguiendo criterios morfológicos de referencia (Rodak & Carr, 2010).

El análisis citomorfológico comprendió la caracterización y determinación de la morfología de la serie roja y blanca, considerando referencias bibliográficas (AL-Dulaimi, Banks, Chandran, Tomeo-Reyes, & Nguyen Thanh, 2018; M. L. Martins *et al.*, 2004). Los tipos celulares considerados para la serie roja fueron eritrocitos, eritroblastos ortocromáticos y policromatófilos. Mientras que, para la serie blanca fueron leucocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y blastos cuyas características han sido ampliamente descritas (Evans, 2009).

Para la identificación de alteraciones celulares, fueron considerados los cambios en el núcleo, citoplasma y/o membrana celular (Guzmán Paredes *et al.*, 2014). El registro de las alteraciones en la serie roja incluyo poiquilocitosis, equinocitosis, anisocitosis, hipocromía, hipercromía, policromasia, cuerpos de Heinz, lisis de eritrocitos, y células inmaduras (eritroblastos ortocromáticos y policromaticos). En la serie blanca se consideró la basofília y presencia de células blásticas (Clauss, Dove, & Arnold, 2008; M. Martins *et al.*, 2004; Witeska, 2013; Zeitz & Sens, 2012).

Se analizó el porcentaje de las alteraciones utilizando una escala semicuantitativa que consistió en estimar el porcentaje de células por campo óptico analizado (Rodriguez Padilla, 2010). Más tarde, se procedió a realizar un cuadro patológico para cada zona de estudio. Por último, se llevó a cabo la fotodocumentación de las alteraciones con ayuda del software CANON® Utilities Remote Capture DC versión 3.1.0.5 (2008). Las microfotografías obtenidas se editaron mediante el software CARL ZEISS® AxiVs 40V versión 4.8.0.0 (2006-2009). Los resultados fueron almacenados en la Base de datos ET-MIRA del laboratorio de Ecotoxicología (Guzmán, Muñoz, & Matadamas, 2012).

3. Resultados

Los bagres y las carpas fueron identificados de acuerdo a sus características morfológicas (Figura 2). Los bagres, se caracterizan por tener un cuerpo sin escamas y presencia de barbillas o bigotes sensoriales alrededor de la región bucal y coloración oscura (Rush Miller, 2009). Por otro lado, las carpas, tienen un cuerpo alargado y comprimido, con labios gruesos y dos pares de barbillas (Rush Miller, 2009). Las medidas registradas (longitud, ancho, alto y peso) (Tabla 2), se encontraron dentro del promedio de tallas comunes para estos peces (Rush Miller, 2009).

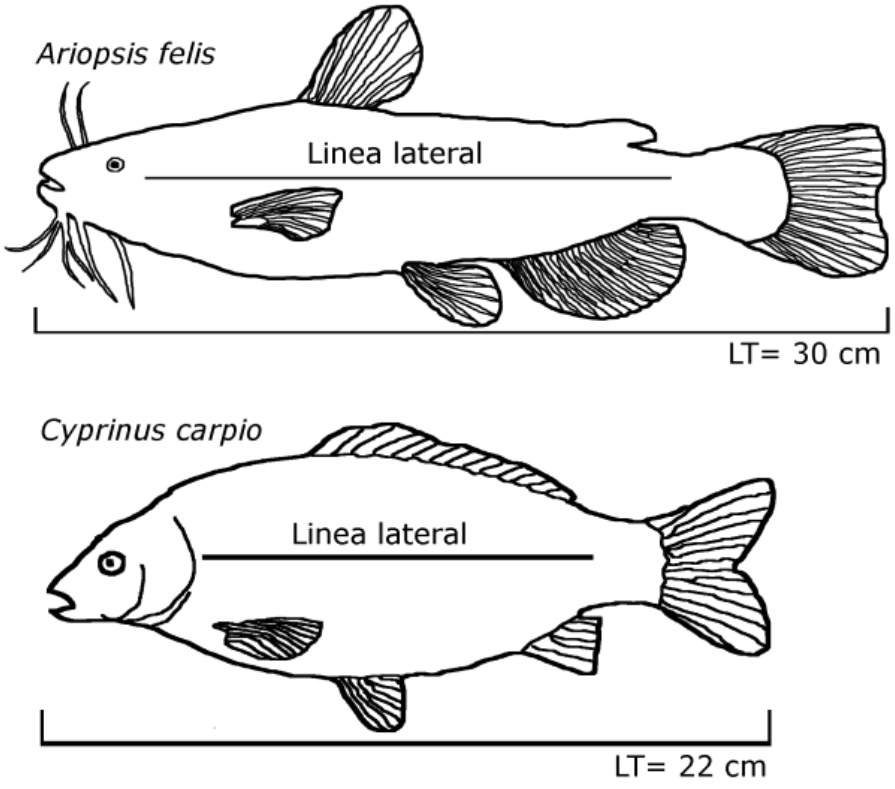


Figura 2. Representación del bagre (*Ariopsis felis)* y la carpa (*Cyprinus carpio)*. Se indica la localización de la línea lateral de donde fue obtenida la sangre. LT: longitud total. De elaboración propia

Tabla 2. Parámetros morfométricos (promedio ± D.E.) de los bagres y las carpas recolectadas en Tecolutla, Ver.; Manantlán, Jal., y Valle de Bravo, Edo. de Mex. De elaboración propia

Organismo	Largo(cm)	Ancho (cm)	Alto (cm)	Peso (g)
Bagre	30 ± 4.8	4 ± 1.0	6 ± 1.2	260 ± 176.5
Carpa	22.5 ± 1.3	3 ± 0	5 ± 0.8	136.6 ± 33.6

3.1. Morfología de las células sanguíneas del bagre y de la carpa.

Para identificar las alteraciones de los peces, las células sanguíneas de la serie roja y de la serie blanca fueron caracterizadas morfológicamente estimando un intervalo del su tamaño (existen técnicas serológicas que estiman el tamaño, que no fueron utilizadas en este trabajo, por lo que solo se da una estimación). Las células sanguíneas del bagre y de la carpa tienen morfología similar (datos no mostrados), por lo que la descripción de la las células de la serie roja y la serie blanca son resumidos a continuación.

3.1.1. Morfología de la serie roja

En la serie roja, la forma típica de los eritrocitos presento un tamaño entre 11 a 17 µm. Los eritrocitos tuvieron una forma elíptica alargada, y presentaron un citoplasma homogéneo con coloración de rosa a salmón (Figura 3A). Su núcleo central fue redondo con tonalidades variantes dependiendo del nivel de condensación de la cromatina. Lo anterior corresponde a lo esperado según observaciones previas en células sanguíneas de otros peces (Guzmán Paredes *et al.*, 2014).

3.1.2. Morfología de la serie blanca

En la serie blanca, la forma celular predominante fue redonda. En términos generales el citoplasma presentó tonalidad parda y hialina derivada de la presencia o ausencia de gránulos. Mientras que el núcleo presentó tonalidad de azul a morada. Diferentes tipos celulares fueron reconocidos, ya que, presentaron diferencias de tamaño en la relación núcleo-citoplasma, el tipo de granulación y la variación en la coloración de las células (que pudieron presentar tonalidad de gris a lila, de lila a morado, o de naranja a rojo).

Se observaron linfocitos, monocitos, basófilos, eosinófilos y células blásticas, correspondientes a la serie blanca. Los linfocitos se caracterizaron por tener una forma ovalada bien definida. El citoplasma de los linfocitos presentó coloración de gris a lila. Además, su núcleo tenía aspecto redondo de color morado y ocupaba el 90% del área total de la célula (Figura 3A). Los linfocitos fueron las células más pequeñas (diámetro entre 3 a 7 µm) de toda la serie blanca.

En comparación, los monocitos tenían una forma circular con bordes irregulares. El citoplasma de los monocitos presentó coloración de azul a lila. El núcleo tuvo forma arriñonada y ocupaba del 60% al 70% del tamaño total de la célula, con coloraciones de lila a morado (Figura 3B). Los monocitos fueron de mayor tamaño (10-16 µm de diámetro) con respecto a los linfocitos. Otro tipo celular reconocido, fueron los basófilos (20 µm de diámetro) con forma circular y bordes irregulares. El citoplasma presentó coloración azul intensa (basófila) y estaba granulado, por lo que núcleo fue poco perceptible (Figura 3C). En cambio, los eosinófilos (6-12 µm de diámetro) se observaron con forma redonda, su citoplasma presentó coloración con tonalidades de rojo a naranja y granulaciones moderadas. El núcleo fue bilobulado y de color morado (Figura 3D).

La presencia de los tipos celulares fue análoga entre bagres y carpas (Fig. 3B-C). En general, los linfocitos fueron observados con un porcentaje del 65%, los monocitos y basófilos del 15%, los blastos 4% y los eosinófilos 1%. En la Tabla 3, se muestran los tipos celulares observados de la serie roja y blanca.

Tabla 3. Características celulares observadas en las células de la serie roja y la blanca tanto en *Ariopsis felis* como en *Cyprinus carpio*. De elaboración propia

	Serie roja	**Serie blanca**
Morfología	Ovoides	Redondas
Núcleo	Central y ovoide de tonalidad morada	Variable dependiendo del tipo celular
Citoplásma	Rosa pálido a rojo	Escaso, lila-grisáceo o en ocasiones con gránulos
Tipo celular	Eritrocitos	Linfocito, monocitos, basófilo, y eosinófilos

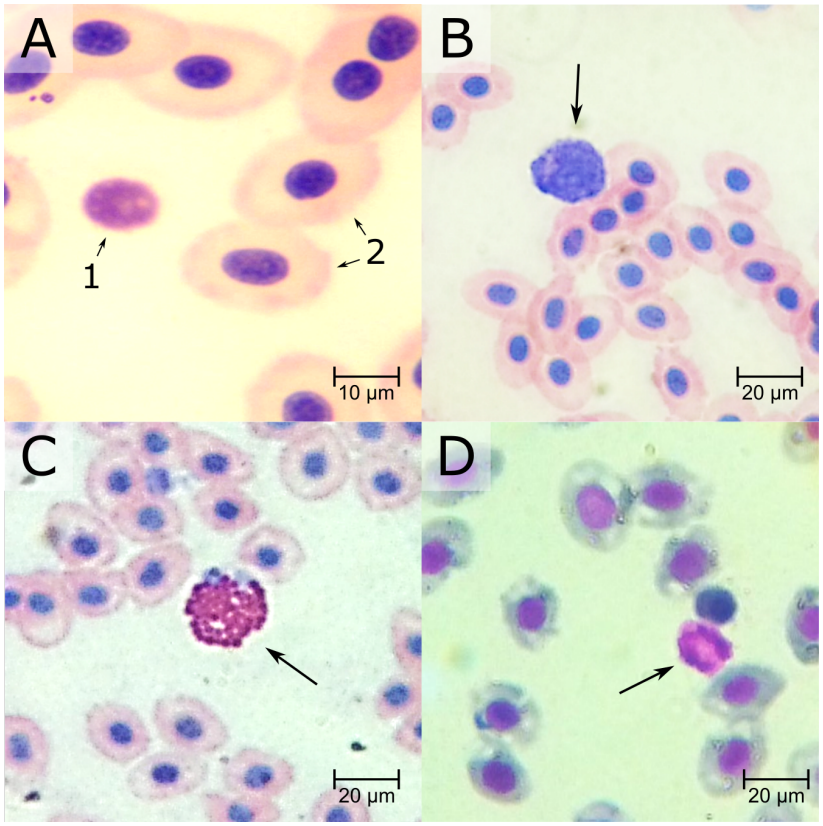


Figura 3. Caracterización morfológica de elementos de serie roja y blanca en la sangre de peces. A) Linfocitos con forma circular (1), y eritrocitos con forma ovoide y núcleo en tonalidad azul (2). B) Monocito (flecha) con citoplasma vacuolado y núcleo irregular. C) Basófilo (flecha) con citoplasma granular. D) Eosinófilo (flecha) con núcleo bilobulado y excéntrico. Tinción Giemsa. De elaboración propia.

3.2. Identificación y análisis de alteraciones

La forma típica de los eritrocitos y linfocitos permitió evidenciar los cambios morfológicos (Figura 4). En los eritrocitos fue evidente la alteración de la forma elíptica característica (poiquilocitosis), los eritrocitos tuvieron formas de estrella o radios (equinocitosis; Figura 4A), redondas, y/o en espícula con tamaños variables (anisocitosis).

También fueron observados, eritrocitos con tinción pálida y espacios huecos notorios en el citoplasma (hipocromía) así como eritrocitos en tonalidad rojo intenso y con aspecto compacto del citoplasma (hipercromía) esta apariencia puede estar relacionada con baja o alta concentración de la hemoglobina. Ambos aspectos (hipo e hipercromía, denominada policromasia) también fueron observados en los campos de revisión ópticos (Figura 4 A y C).

Algunos eritrocitos presentaron alteraciones muy notables como la presencia de inclusiones citoplasmáticas (cuerpos de Heinz) asociadas a la degradación de partículas de hemoglobina. En este trabajo se reconocieron las células inmaduras o blasticas (Figura 4D), por su forma redonda y por presentar núcleo pequeño excéntrico con apariencia condensada de la cromatina, tinción oscura y un citoplasma con coloración naranja a roja (eritroblastos ortocromáticos). De manera análoga se observaron células (eritroblastos denominados policromatófilos) con núcleo central basófilo (con tonalidades azul o lila), semicondensado (cromatina semicondensada) y tonalidades de lila a morada en el citoplasma. En el extremo de las alteraciones, se observó la lisis de la membrana de los eritrocitos.

En la serie blanca se observaron células que presentan granulación excesiva de tono azul a morado (basófilos) que impiden visualizar el nucleó de la célula.

Las alteraciones observadas, en orden de importancia patológica (de acuerdo a las referencias bibliográficas), fueron: poiquilocitosis, equinocitosis, anisocitosis, hipocromía, hipercromía y policromasia consideradas alteraciones reversibles. Mientras que, los cuerpos de Heinz, la presencia de células inmaduras (blastos) y la lisis de eritrocitos fueron consideradas lesiones irreversibles (Clauss *et al.*, 2008; Witeska, 2013; Zeitz & Sens, 2012).

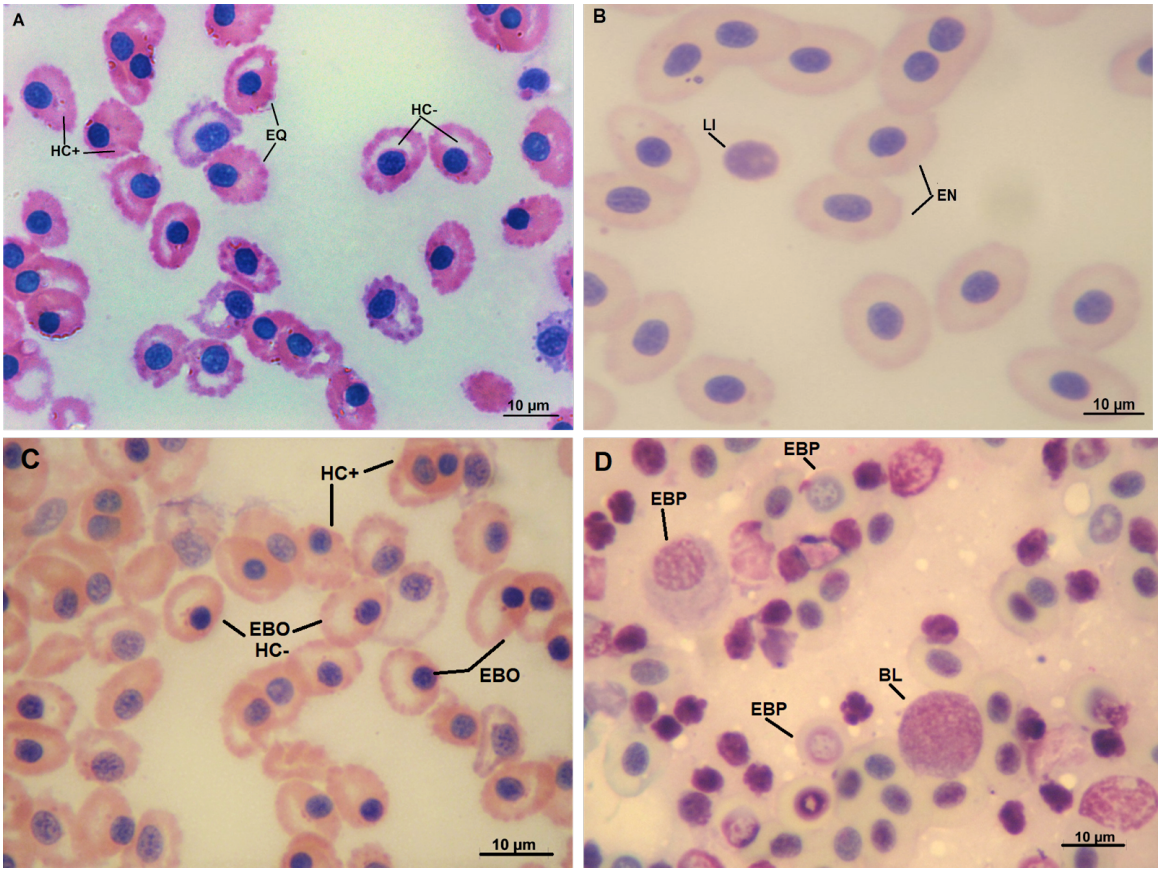


Figura 4. Alteraciones morfológicas en el núcleo y el citoplasma de las células de la serie roja y blanca. A) Policromasia en eritrocitos, Hipercromia (HC+), Hipocromia (HC-) y poiquilocitosis (equinocitos; EQ). B). Eritrocitos típico "normal" (EN) y linfocitos (LI). C) Policromasia y eritroblastos ortocromáticos (EBO), células inmaduras de serie roja. D) Eritroblastos policromatófilos (EBP) con células blásticas (Bl). Tinción Giemsa. De elaboración propia.

Las alteraciones observadas relacionadas con el sitio de recolecta indicaron que, en la sangre de los peces provenientes de Tecolutla, Ver., se presentaron once (11) tipos de alteraciones descritas mientras que en la sangre de los peces recolectados en Manantlán siete (7) y en los peces de Valle de Bravo presentaron ocho (8) (Tabla 4). El análisis semicuantitativo dio evidencia de la incidencia de alteraciones en Tecolutla con respecto a Manantlán y Valle de Bravo (Tabla 5), fue evidente que las lesiones de tipo irreversible se presentan en células de peces recolectados en Tecolutla con mayor frecuencia que en Manantlán, mientras que en los peces de Valle de Bravo no se detectaron lesiones de alto impacto o irreversibles.

Tabla 4. Incidencia de alteraciones registradas en cada área de estudio. De elaboración propia.

Alteraciones	**Tecolutla, Ver.**	**Manantlán, Jal.**	**Valle de Bravo, Edo. Mex.**
Poiquilocitosis	ü	ü	ü
Equinocitosis	ü	ü	ü
Anisocitosis	ü	ü	ü
Hipocromía	ü	ü	ü
Hipercromía	ü	ü	ü
Policromasia	ü	ND	ND
Cuerpos de Heinz	ü	ND	ND
Eritrocistos lisados			
Eritroblastos	ü	ü	ü
Basofilía	ü	ü	ü
Células blásticas	ü	ND	ü

Tabla 5. Estimación (%) de la incidencia de las alteraciones registradas en la sangre de peces de Tecolutla, Manantlán y Vale de Bravo. De elaboración propia

	Alteración	Tecolutla	Manantlán	Valle de Bravo
Serie roja	Poiquilocitosis	+++	++	++
	Equinocitosis	+++	+	+
	Anisocitosis	++	+	+
	Hipocromía	+++	++	+
	Hipercromía	++	+	+
	Policromasia	++	0	0

	Cuerpos de Heinz	+	0	0
	Eritrocitos lisados	++	+	0
	Eritroblastos	++	+	+
Serie blanca	Basofilia	++	+	+
	Células blásticas	++	+	0

++++=100%, +++=75%, ++=50%, +=25%

4. Discusión

Existen factores extrínsecos e intrínsecos que pueden afectar o alterar alguno de los parámetros de la sangre, lo cual se puede expresar en la fisiología de los organismos (Galeano *et al.*, 2010). Los estudios ictiohematológicos son utilizados debido a que son biomarcadores fisiológicos relativamente sencillos e implican mecanismos no letales; estos estudios se han llevado a cabo en plantas experimentales y de producción acuícola con fines comerciales, mas, los estudios en organismos silvestres son escasos (Alaye-Rahy & Morales-Palacios, 2013).

El tamaño de eritrocitos en peces teleósteos varía entre 8.8 y 17.1 µm de acuerdo a la especie analizada (Witeska, 2013). En el presente estudio, se observaron eritrocitos de bagre que miden de 10 a 12 µm, similares a los reportados por otros autores en bagres y carpas (Becerra Amezcua, Hernández Díaz, López Vite, Hernández Calderas, & Guzmán García, 2018; Kumar, 2016).

Las células analizadas de las series roja y serie blanca corresponden a las reportadas para los peces Bagre y Carpa común, la morfología es coincidente entre especies (Galeano *et al.*, 2010; Tavares-Dias *et al.*, 2008). La morfología encontrada en la serie roja, corresponde a la típica de un eritrocito (Prieto *et al.*, 2008). Los eritrocitos de peces son células de formas ovoides con núcleo central y sin presencia de gránulos en el citoplasma (Centeno *et al.*, 2007; de Pedro *et al.*, 2004). La serie blanca, evidenció cinco tipo celulares, los cuales coinciden con otros estudios en donde se han reportado linfocitos, monocitos, basófilos, células blásticas, eosinófilos y neutrófilos (Centeno *et al.*, 2007; Galeano *et al.*, 2010). En este trabajo, no fueron observados neutrófilos los cuales están asociados a procesos inflamatorios de defensa primaria ante agentes extraños en el organismo (Galeano *et al.*, 2010). La predominancia de los tipos celulares en la serie blanca en los peces recolectados indican que el sistema de defensa está activo debido posiblemente al estrés ambiental (Odaka *et al.*, 2018; Tavares-Dias *et al.*, 2008).

El análisis ictiohematológico indicó alteraciones principalmente en la serie roja (eritrocitos) donde se observaron cambios de tipo morfológico (poiquilocitosis) presentando diversas formas entre las que destacan equinocitos (forma de estrella). Se ha reportado que los cambios en la forma elíptica de los eritrocitos está asociada al déficit de hierro, vitaminas y minerales, generando problemas de nutrición y anemia (M. Martins *et al.*, 2004). Otras alteraciones están asociadas con la condensación o degradación de la hemoglobina (anisocromia), y han sido reportadas y coinciden con las características celulares observadas en este trabajo (Alaye-Rahy & Morales-Palacios, 2013; Centeno *et al.*, 2007; de Pedro *et al.*, 2004). Los problemas asociados a la presencia y prevalencia de las alteraciones en la serie roja pueden inducir dificultad en el transporte de oxígeno ocasionando problemas de locomoción, lenta respuesta ante depredadores, fatiga y cansancio al realizar actividades básicas como el alimentarse, así como problemas fisiológicos en la síntesis de hemoglobina, todo ello debido a que no es posible la formación de grupos hemo ante la deficiencia de hierro (Centeno *et al.*, 2007; de Pedro *et al.*, 2004).

En la serie blanca (leucocitos), predominaron los linfocitos en un 65 % dato que actualmente puede considerarse basal ya que estas células tienen actividad inmunitaria y de acuerdo a trabajos anteriores, los linfocitos predominan en peces teleósteos (Valenzuela *et al.*, 2003). Los monocitos con un 15 % de frecuencia observada, pueden asociarse a infecciones bacterianas multivariadas, debido a que participan activamente como macrófagos eliminando microorganismos extraños y células muertas. Estas células son fácilmente confundidas con blastos, dado que su morfología en ocasiones es muy similar (Ellis, 1976; Galeano *et al.*, 2010; Valenzuela *et al.*, 2003). Las células blásticas fueron observadas en menor frecuencia (4%), la proliferación de blastos, indica patologías severas que ponen en riesgo la integridad de los organismos llegando a producir neoplasias que pueden ser irreversibles y causar la muerte (Tavares-Dias *et al.*, 2008). El grupo denominado eosinófilos fue poco observado (1%) y se asocia a procesos de alergias e infecciones parasitarias, sin embargo, su función aún no es específica, al menos para este tipo de organismos (Ellis, 1976).

El número de alteraciones observadas en la sangre de los peces provenientes de Tecolutla, Ver., fue mayor con respecto al de Manantlán, Jal. y al de Valle de Bravo, Edo. de Mex. La alta incidencia de alteraciones encontradas en Tecolutla; Veracruz con respecto a las otras zonas puede estar relacionada a la alta actividad antropogénica del lugar en cual se dan paseos turísticos en lanchas por el río además de existir una concentración importante de la mancha urbana en

las cercanías de la zona. No así, en Manantlán y Valle de Bravo, que son zonas protegidas (SEMARNAT, 2018; SIMEC, 2019).

El análisis de los parámetros químicos y hematológicos son herramientas importantes para conocer el estado fisiológico de los peces ya que resultan ser precisas, eficaces y de bajo costo (Hahn-von-Hessberg *et al.*, 2014). El estudio de parámetros hematológicos en peces permitió la detección temprana del efecto del estrés ambiental, por lo que son recomendables como biomarcadores en el monitoreo de la contaminación acuática.

5. Conclusiones

El análisis Ictiohematologico en *Ariopsis felis* y *Cyprinus carpio* permitió caracterizar e identificar la morfología de las células, así como la predominancia de los eritrocitos y linfocitos. Las alteraciones morfológicas tuvieron mayor prevalencia en los eritrocitos y dan evidencia de alteraciones que pueden asociarse con patologías de tipo reversible o irreversible.

La incidencia y porcentaje de alteraciones de acuerdo al sitio de muestreo fue mayor para los peces recolectados en Tecolutla con respecto a Manantlán y Valle de Bravo. El registro de alteraciones compromete la salud de los organismos, por lo que se recomienda continuar con este tipo de estudios a fin de generar valores de referencia que favorezcan el diseño de protocolos para el diagnóstico ictiohematológico.

Agradecimientos

Los autores agradecen la contribución académica del Mtro. Miguel Ángel León-Tapia del Instituto de Biología de la UNAM por la elaboración y edición del mapa de las zonas de estudio. Así mismo agradecemos los comentarios del escrito a Meztli L. Matadamas Guzmán.

A la Universidad Autónoma Metropolitana que a través de los proyectos Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental (2014-2018). Y a la SEMARNAT a través del PRONAME (Programa de Monitoreo y Evaluación de Sustancias Tóxicas, Persistentes y Bioacumulables) por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

6. Referencias

AL-Dulaimi, K., Banks, J., Chandran, V., Tomeo-Reyes, I., & Nguyen Thanh, K. (2018). Classification of White Blood Cell Types from Microscope Images: Techniques and Challenges. En E. Torres-Hergueta & A. Méndez-Vilas (Eds.), *Microscopy Science: Last Approaches on Educational Programs and Applied Research* (pp. 17–25). Spain: Formatex Research Center.

Alaye-Rahy, N., & Morales-Palacios, J. J. (2013). Parámetros hematológicos y células sanguíneas de organismos juveniles del pescado blanco (*Chirostoma estor estor*) cultivados en Pátzcuaro, Michoacán, México. *Hidrobiológica*, *23*(3), 340–347.

Arriaga-Gaona, M. L., Hernández-Limón, L., Sandoval-Reyes, F., Vera-Lara, J., Vargas-Moreno, E., & García-Rojas, L. (2009). Monitoreo de la calidad del agua del río Tecolutla desde Coyutla hasta Gutierrez Zamora, Veracruz. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, *5*(2), 141–147.

Azevedo, J. S., Sarkis, J. E. S., Hortellani, M. A., & Ladle, R. J. (2012). Are Catfish (Ariidae) effective bioindicators for Pb, Cd, Hg, Cu and Zn? *Water, Air, and Soil Pollution*, *223*(7), 3911–3922. https://doi.org/10.1007/s11270-012-1160-2

Azevedo, T. M. P., Albinati, R. C. B., Guerra-Santos, B., Lira, A. D., & Ayres, M. C. C. (2014). Fauna parasitária e características hematológicas de tilápias (Oreochromis niloticus, Linaeus 1758) cultivadas na região do Baixo Sul-Bahia. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, *36*(3), 327–331.

Barcia, J. J. (2007). The Giemsa Stain: Its History and Applications. *International Journal of Surgical Pathology*, *15*(3), 292–296. https://doi.org/10.1177/1066896907302239

Becerra Amezcua, M. P., Hernández Díaz, M., López Vite, S. A., Hernández Calderas, I., & Guzmán García, X. (2018). Eritrocitos de peces como biomarcadores para evaluar el efecto de sustancias tóxicas. En *Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México. Volumen 2* (p. 616). Ciudad de México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., … Segner, H. (2003). The use of fish cells in ecotoxicology: The report and

recommendations of ECVAM workshop 47. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, *31*(3), 317–351.

Centeno, L., Silva-Acuña, R., Barrios, R., Lugo, R. S., Matute, C., & Pérez, J. L. (2007). Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro, Venezuela. *Zootecnia tropical*, *25*(4), 237–243.

Chovanec, A., Hofer, R., & Schiemer, F. (2003). Chapter 18 Fish as bioindicators. En B. A. Markert, A. M. Breure, & H. G. Zechmeister (Eds.), *Bioindicators & Biomonitors* (pp. 639–676). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0

Clauss, T. M., Dove, A. D. M., & Arnold, J. E. (2008). Hematologic disorders of fish. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, *11*(3), 445–462, v. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). (2017). *Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2017*. Ciudad de México.

Costa, P. M. (2018). *The handbook of histopathological practices in aquatic environments : guide to histology for environmental toxicology* (1a ed.). Oxford, United Kigdom: Academic Press.

de Pedro, N., Guijarro, A., López-Patiño, M. A., Martínez-Álvarez, R. M., Alonso-Bedate, M., & Jesús Delgado, M. (2004). Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (*Tinca tinca*): Ritmos diarios y estacionales. *III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, 173–190. Zaragoza, España: Patología Infecciosa y Epidemiología Universidad de Zaragoza.

Duman, M., Saticioglu, I. B., Suzer, B., & Altun, S. (2019). Practices for Drawing Blood Samples from Teleost Fish. *North American Journal of Aquaculture*, *81*(2), 119–125. https://doi.org/10.1002/naaq.10077

Ellis, A. E. (1976). Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Biology*, *8*(2), 143–156. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1976.tb03928.x

Evans, G. O. (2009). *Animal hematotoxicology : a practical guide for toxicologists and biomedical researchers*. CRC Press/Taylor & Francis.

Galeano, N. A., Prat, M. I., Guagliardo, S. E., Schwerdt, C. B., & Tanzola, D. (2010). Características hematológicas de *Porichthys porosissimus* (Pisces: Batrachoidiformes) en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Analecta Veterinaria*, *30*(1), 5–11.

Guzmán-García, X., Ramirez-Romero, P., & Barrera-Escorcia, G. (2018). *Indicadores de Integridad Ecológica y Salud Ambiental. Informe de Proyecto*. Ciudad de México.

Guzmán Paredes, J. L., Matadamas Guzmán, F. M., Maldonado, E., & Guzmán-Garcia, X. (2014). Cambios hematológicas en el bagre (*Ariopsis felis*) como biomarcadores de contaminación. *Congreso Estudiantil de Investigación del Sistema Incorporado*, 13. Ciudad de México: UNAM.

Guzmán, X., Muñoz, F., & Matadamas, M. (2012). Relational base of information: indicators of ecological integrity and environmental health, México. Recuperado el 29 de marzo de 2019, de http://etmira.ecotoxicologia.com/

Hahn-von-Hessberg, C. M., Quiroz-Bucheli, A., & Grajales-Quintero, A. (2014). Caracteres hematológicos en individuos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Trewavas 1983) con pesos entre 50-150 g y 150-250 g, estación piscícola, Universidad de Caldas, Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, *18*(1), 142–157.

Kumar, M. V. (2016). Morphometric studies of blood cells in *Cyprinus carpio*, <i>Ctenopharyngodan idella<,i> and *Hypophthalmichthys molitrix* cultured fish in west Godavari region of Andhra Pradesh. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, *4*(5), 489–493.

López-Portillo, J. A., Gómez-Aguilar, L. R., & Vázquez, V. (2009). Criterios para la selección del sitio de manglar Tecolutla, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). En *Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica.* México, D.F.: CONABIO.

Maceda-Veiga, A., Figuerola, J., Martínez-Silvestre, A., Viscor, G., Ferrari, N., & Pacheco, M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of The Total Environment*, *514*, 322–332. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004

Martins, M. L., Tavares-Dias, M., Fujimoto, R. Y., Onaka, E. M., & Nomura, D. T. (2004). Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichtyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *56*(5), 640–646. https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000500011

Martins, M., Pilarski, F., Onaka, E., Nomura, D. D. T., Fenerick, J., Ribeiro, K., … Malheiros, E. B. (2004). Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. En *Boletim do Instituto de Pesca* (Vol. 30).

Neiffer, D. L., & Stamper, M. A. (2009). Fish sedation, analgesia, anesthesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR journal*, *50*(4), 343–360.

Newton, T., & Gregory Cope, W. (2006). Biomarker Responses of Unionid Mussels to Environmental Contaminants. En J. H. Van Hassel & J. Farris (Eds.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology* (pp. 257–284). https://doi.org/10.1201/9781420042856.ch10

Odaka, T., Suetake, H., Maeda, T., & Miyadai, T. (2018). Teleost Basophils Have IgM-Dependent and Dual Ig-Independent Degranulation Systems. *Journal of immunology*, *200*(8), 2767–2776. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701051

Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, *9*(2), 110–118. https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753

Prieto, Z., León-Incio, J., Quijano-Jara, C., Fernández, R., Polo-Benites, E., Vallejo-Rodriguez, R., & Villegas-Sánchez, L. (2008). Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *25*(1). https://doi.org/10.17843/RPMESP.2008.251.1236

Ramírez-Romero, Guzmán-García, X., García-Guzmán, M. C., Becerra-Amezcua, M. P., Arellano-López, I., Elizalde-Ramírez, L. G., … Vilchis-Alfaro, M. I. (2011). *Programa Nacional de Monitoreo y Evaluación Ambiental (PRONAME). Evaluación Ecotoxicológica y análisis de sustancias tóxicas, persistentes y bioacumulables en ecosistemas mexicanos.*

Rašković, B., Jarić, I., Koko, V., Spasić, M., Dulić, Z., Marković, Z., & Poleksić, V. (2013). Histopathological indicators: a useful fish health monitoring tool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) culture. *Open Life Sciences*, *8*(10), 975–985. https://doi.org/10.2478/s11535-013-0220-y

Readman, G. D., Owen, S. F., Knowles, T. G., & Murrell, J. C. (2017). Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia. *Scientific reports*, *7*(1), 7102. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06917-2

Rodak, B., & Carr, J. (2010). Introducción al examen del frotis de sangre periférica. En *Atlas de Hematología Clínica* (3a ed., pp. 1–10). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Rodriguez Padilla, C. (2010). *Manual de Inmunologia* (1a ed.). Editorial Trillas.

Rush Miller, R. (2009). *Peces dulceacuícolas de México* (1a ed.). México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

SEMARNAT. (2018). Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán. Recuperado el 15 de abril de 2019, de Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales website: https://www.gob.mx/semarnat/articulos/reserva-de-la-biosfera-sierra-de-manantlan?idiom=es

SIMEC. (2019). Zona Protectora Forestal los terrenos constitutivos de las cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec. Recuperado el 15 de abril de 2019, de Sistema de Información Monitoreo y Evaluación para la Conservación website: https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=41&reg=7

Tavares-Dias, M., Affonso, E. G., Oliveira, S. R., Marcon, J. L., & Egami, M. I. (2008). Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and *Agassiz*, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazonica*, *38*(4), 799–805. https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400026

Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Luna Azul*, *32*, 121–127.

Trushenski, J. T., Johnson, J. A., & Bowker, J. D. (2018). Efficacy and Hematological Responses of Walleyes to Chemosedation and Electrosedation.

North American Journal of Aquaculture, *80*(4), 355–362. https://doi.org/10.1002/naaq.10040

Valenzuela, A., Oyarzún, C., & Silva, V. (2003). Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (Elasmobranchii, Scyliorhinidae): La serie blanca. *Gayana (Concepción)*, *67*(1), 130–137. https://doi.org/10.4067/S0717-65382003000100018

Vázquez-Botello, A., Villanueva-Fragoso, S., Gutiérrez, J., & Rojas-Galaviz, J. L. (Eds.). (2010). *Vulnerabilidad de la zonas costeras mexicanas ante el cambio climático* (2a ed.). Campehce, México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalpa. UNAM-ICMyL. Universidad Autónoma de Campeche.

Villa, O., Salido, M., Pérez-Vila, M. E., Ferrer, A., Arenillas, L., Pedro, C., … Solé, F. (2008). Blast cells with nuclear extrusions in the form of micronuclei are associated with MYC amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*, *185*(1), 32–36. https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.04.014

Witeska, M. (2013). Erythrocytes in teleost fishes: a review. *Zoology and Ecology*, *23*(4), 275–281. https://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963

Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., & Georgieva, E. (2016). Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*, *14*(1), 47–75. https://doi.org/10.15666/aeer/1401_047075

Zeitz, M., & Sens, P. (2012). Reversibility of red blood cell deformation. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *85*(5), 051904. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.051904

Capítulo 24

EFECTO REPROTÓXICO Y TRASGENERACIONAL INDUCIDO POR EL ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) EN *Drosophila melanogaster*

Edgar Alberto Ragde Gutiérrez Álvarez[1*]
Patricia Ramos Morales[1]

[1] Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CDMX, México.

[a] ragde_punk@ciencias.unam.mx

Resumen

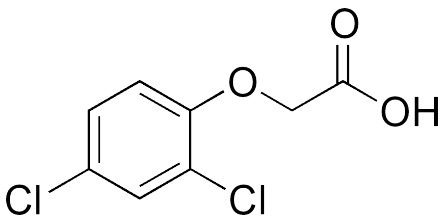
El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un regulador de crecimiento en plantas (auxina) y se utiliza como herbicida sistémico. Forma parte de la mezcla química que compone al "Agente Naranja" y en México, este herbicida se distribuye como Hierbamina (Syngenta). Todos los días grandes cantidades de sustancias se liberan en el medio ambiente, lo que representa un peligro potencial para los organismos y en su mayoría, se ignora el alcance de las repercusiones en las generaciones subsiguientes a la exposición. En este trabajo se busca establecer el daño reprotóxico inducido por el 2,4-D a lo largo de 3 generaciones de *Drosophila melanogaster*. Larvas de 72 h fueron alimentadas con medio para mosca enriquecido con 2,4-D (1.72E-04 – 1.12E+01mM). Al emerger los adultos, se cuantificó el número de hembras y machos para obtener la sobrevivencia promedio y la proporción sexual. Se realizaron 3 sistemas de cruzas utilizando hembras y machos tratados (T) o no tratados (NT): NTxT, TxNT, TxT hasta obtener la F_3. El tratamiento afectó significativamente el promedio de la progenie en la cruza NTxT. El análisis morfológico mostró anomalías en el tamaño corporal, alteraciones en la placa genital y en las patas. La exposición al 2,4-D modificó la cantidad de progenie y afectó la morfología de estructuras reproductivas, principalmente. A pesar de no presentarse diferencias significativas en la sobrevivencia de los organismos expuestos, existe un efecto que prevalece en las generaciones posteriores. Es necesario incluir el análisis de la exposición a un compuesto para establecer el alcance de su actividad genotóxica.

Palabras clave: 2,4-D, *Drosophila*, Herbicida, Efecto transgeneracional.

1. Introducción

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un regulador de crecimiento en plantas y actúa como una auxina sintética, alterando el metabolismo de las plantas. Por esta razón es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo. Sin embargo, este producto también muestra una toxicidad significativa en los seres humanos y otros organismos que no son el blanco de este plaguicida.

Molécula de 2,4-D



Durante la Guerra de Vietnam, el ejército de los Estados Unidos roció una mezcla química denominada "Agente Naranja" para destruir la cubierta forestal. La mezcla estaba compuesta por el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T). Diversas enfermedades fueron asociadas a la exposición al agente naranja en soldados afectados (Stellman & Stellman, 2018). Un metaanálisis desarrollado por Ngo y colaboradores, 2010 sugiere que la exposición paterna al agente naranja puede estar asociada a un mayor riesgo a padecer espina bífida y otras malformaciones (Ngo, Taylor, & Roberts, 2010).

En sistemas acuáticos el 2,4-D es poco biodegradable, y su biodegradación por bacterias puede retrasarse debido a los factores que cambian la calidad del agua (por ejemplo, otros contaminantes), ya que las variaciones en la temperatura, así como en la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, afectan directamente a dicho proceso. Estudios previos han evaluado el impacto del 2,4-D en diferentes organismos bioindicadores de la calidad ambiental e informaron de diversos cambios en bacterias, artrópodos, peces, anfibios, reptiles y mamíferos, además de registrar variaciones en diferentes especies de plantas (Mesak, de Oliveira Mendes, de Oliveira Ferreira, & Malafaia, 2018).

En mamíferos el 2,4-D no se metaboliza, se elimina rápidamente a través de los riñones y se excreta con la orina como el compuesto original (Li et al., 2017). Sin embargo, puede ser absorbido en el cuerpo humano por ingestión, inhalación y/o contacto con la piel (Sharifi Pasandi et al., 2017).

La exposición al 2,4-D produce efectos tóxicos en mamíferos tales como la hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y del sistema reproductivo, además induce efectos teratogénicos, efectos inmunosupresores y citotóxicos. Durante los periodos pre y post natal, el sistema nervioso central (SNC) parece ser uno de los principales objetivos de los efectos tóxicos del 2,4-D. Provoca efectos

adversos en el desarrollo cerebral, la deposición de lípidos de mielina, la inducción de astrogliosis, la interrupción del ensamblaje del citoesqueleto y la desorganización del aparato de Golgi (Horikoshi, Miura, Kajitani, & Serpone, 2008; Rosso, Cáceres, de Duffard, Duffard, & Quiroga, 2000; Sharifi Pasandi et al., 2017).

En animales la toxicidad del 2,4-D produce estrés oxidativo y es considerado un posible disruptor endocrino. Se sabe que este compuesto bloquea la maduración meiótica *in vitro* al inhibir la maduración del ovocito de *Xenopus* porque interfiere con los mecanismos de traducción y post-traducción; por lo tanto, es un potencial disruptor endocrino ambiental con efectos reproductivos tempranos (LaChapelle et al., 2007).

En roedores la administración de 2,4-D produce disfunción testicular. En los agricultores expuestos al 2,4-D, se ha reportado astenospermia, necrospermia y teratospermia, y se asocia con un mayor riesgo de aborto espontáneo temprano (Harada et al., 2016).

El 2,4-D tiene un efecto mutagénico en renacuajos de *Lithobates catesbeianus*, en concentraciones bajas (relevantes para el medio ambiente) y por un corto período de tiempo de exposición (Mesak et al., 2018). Se ha reportado que el ácido 2,4-D tiene efectos citotóxicos y mutagénicos en levaduras, células hematopoyéticas transformadas y médula ósea de ratón después de un análisis de los cromosomas en metafase que indicó una inducción probada de roturas, deleciones e intercambios después de la administración del 2,4-D (Venkov, Topashka-Ancheva, Georgieva, Alexieva, & Karanov, 2000).

En el sapo argentino o sapo grande (*Rhinella arenarum*), el 2,4-D fue "altamente" teratogénico, lo que resultó en una reducción del tamaño corporal, desarrollo retrasado, microcefalia, agenesia de las branquias y procesos de proliferación celular anormales (Aronzon, Sandoval, Herkovits, & Pérez-Coll, 2010).

En pez cebra, se ha encontrado que el 2,4-D se acumula, reduce la tasa de eclosión, la tasa de supervivencia, la longitud del cuerpo de embriones y causa malformaciones pericárdicas (Li et al., 2017).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasificó al 2,4-D como un carcinógeno de clase 2B, "posiblemente carcinógeno para los humanos" (Li et al., 2017), sin embargo, algunos estudios sostienen que el 2,4-D no causa cáncer en los seres humanos (Garabrant & Philbert, 2002; Goodman, Loftus, & Zu, 2017).

Existe evidencia de la toxicidad producida por el 2,4-D en organismos expuestos, sin embargo, es muy poca o casi nula la información que existe sobre los efectos que pudiera tener este compuesto en los descendientes de los organismos que son expuestos. Es relevante conocer si existe un efecto transgeneracional provocado por este compuesto.

Drosophila es buen modelo biológico para poder estudiar el posible efecto transgeneracional del 2,4-D. Entre las ventajas que se destacan para su uso está la facilidad para realizar cultivos experimentales, la corta duración de su ciclo

de vida (dura de 10 a 12 días a 25°C), la distinción clara entre cada una de las fases de su ciclo de vida y la gran cantidad de descendencia que produce una sola pareja (Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J., Ordaz, Ma. Orozco, P., Maldonado & Hernández, J., Gonzales, E., Reyes, P., Galicia, E., 1993).

Drosophila es un modelo bien establecido que, con su estructura genética ampliamente estudiada, muestra casi el 75% de homología funcional con los genes humanos que causan enfermedades. Los mecanismos de desarrollo, celulares y moleculares en *Drosophila* están bien estudiados y comprendidos, por lo que es un organismo modelo para la investigación en varios campos, como genética, medicina, biología del desarrollo, inmunología y toxicología, para dilucidar problemas de interés humano (Rajak, Khatun, Dutta, Mandi, & Roy, 2018).

Todos los días grandes cantidades de sustancias se liberan al ambiente, lo que representa un peligro potencial para los organismos y de la mayoría, se ignora el alcance de las repercusiones en las generaciones subsiguientes a la exposición, así como en su capacidad reproductiva. La exposición a estas sustancias puede afectar, entre otros aspectos: la fertilidad, el número de progenie, estructuras de órganos reproductores e incluso la integridad del material genético a nivel de gametos, lo que podría representar un daño a la siguiente generación.

En este trabajo se busca conocer el efecto reprotóxico inducido por el 2,4-D a lo largo de 3 generaciones de *Drosophila melanogaster* mediante tres esquemas de cruzas con moscas tratadas y no tratadas. Con esto se pretende conocer si existe un efecto diferencial en el número de progenie dependiendo del tipo de cruza que se realice y con esto determinar si alguno de los dos sexos trasmite mayor daño a sus descendientes, después de haber sido tratados.

2. Material y métodos

Cepa: *Drosophila melanogaster*, cepa silvestre (Canton-S). Los cultivos se mantuvieron a 25°C y 60 % de humedad relativa en medio estándar para *Drosophila* compuesto de harina de maíz (5.97 %), azúcar (7.60 %), levadura (4.11 %), agar (0.56 %) y agua (81.73 %).

Compuesto: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), CAS: 94-75-7. Nombre comercial: Hierbamina (Syngenta).

Sincronización de cultivos y obtención de larvas: Un cultivo maduro de moscas se transfirió por un período de 8 h a medio fresco. Tres días después, las larvas de 72 ± 4 h de edad se extrajeron del medio utilizando una solución de sacarosa al 20 % según el método de Nöthiger (Nöthinger, 1970). Grupos de aproximadamente 100 larvas se colocaron en tubos homeopáticos de fondo plano de 2 cm de diámetro por 9.5 cm de alto que contenían 1 g de medio instantáneo para mosca (Carolina Biological Supply) y 4.5 ml de la solución a probar.

Tratamiento: A partir de una concentración inicial de 11.24 mM se obtuvieron nueve concentraciones mediante diluciones sucesivas (1.72E-04 mM). Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada. Las larvas permanecieron en este medio hasta completar su desarrollo, para un tratamiento subcrónico de 48 h. Para cada concentración se realizaron al menos dos réplicas y el experimento completo se repitió por triplicado.

Registro de toxicidad: Al emerger los adultos se revisó su morfología para detectar alteraciones y se cuantificó el número de hembras y machos en los lotes testigo y experimental.

Cruzas: Para establecer la actividad reprotóxica del 2, 4-D y determinar el efecto de una sola exposición en los progenitores y en su descendencia, se realizaron 3 esquemas de cruzas: hembra virgen tratada x macho tratado (TxT), hembra virgen tratada x macho no tratado (TxNT) y hembra virgen no tratada x macho tratado (NTxT). Para cada esquema de cruza se siguieron en total 20 parejas que se colocaron en una relación 1 : 1 (hembra : macho) en tubos individuales con medio de cultivo fresco, libre de hierbamina. Los progenitores se retiraron a los 5 días y a los 14 días se revisaron los tubos para determinar la fertilidad.

Se examinó la morfología de las moscas de la primera generación (F_1) y se registró el número de hembras y machos por tubo.

Para cada concentración se sembraron 20 parejas (F_1 x F_1) en tubos individuales libres de hierbamina para obtener la F_2. Se retiró a los progenitores F_1 a los 5 días y se esperó la emergencia de los adultos. Se obtuvo la fertilidad de las moscas de la F_1 y se registró el número de hembras y machos por tubo. El procedimiento se repitió para obtener a la F_3.

Análisis morfológico: Se examinó la morfología de las moscas expuestas y de las tres generaciones siguientes para contabilizar las anomalías morfológicas. Se consideraron únicamente aquellas que estuvieran relacionados con la placa genital, con relación al tamaño de los organismos y por último en relación con las patas.

Análisis de resultados: Se obtuvo la proporción sexual (PSx) y para determinar la toxicidad del tratamiento se calculó la sobrevivencia promedio (SP) en las series experimentales y en el testigo. Se compararon mediante un ANOVA de una vía, a dos colas y $\alpha = 0.05$.

$$SP = \frac{\sum \ de\ organismos\ recobrados}{\sum \ de\ tubos\ sembrados} \qquad PSx = \frac{\sum total\ de\ ♀\ ó\ ♂}{\sum total\ de\ organismos\ (♀\ y\ ♂\ )}$$

Efecto reprotóxico: Se determinó si existían diferencias entre la fertilidad de las series experimentales y el testigo mediante una prueba de Z para proporciones, a dos colas, con un $\alpha = 0.05$.
Mediante la Fertilidad (F) y la Progenie promedio (PP), se evalúa cómo afectó el tratamiento con 2,4-D a las capacidades reproductivas y cómo se modificó la cantidad de hijos obtenidos en las tres diferentes cruzas.

$$F = \frac{\sum de\ tubos\ con\ progenie}{\sum tubos\ sembrados} \qquad PP = \frac{\sum de\ moscas\ por\ concentración}{\sum de\ tubos\ con\ progenie}$$

Para determinar el efecto de la exposición de los progenitores en la cantidad de progenie F_1, F_2 y F_3 se comparó la progenie promedio/familia de las series experimentales y el testigo, mediante un ANOVA de una vía, a dos colas y α=0.05, respectivamente; en caso de existir diferencias significativas se realizó un contraste de Dunnett con α=0.05

Los resultados de la progenie promedio obtenida se corrigieron a 1, dividiendo cada concentración sobre el testigo de su respectivo tratamiento y tipo de cruza. Esto para para poder visualizar de mejor manera los resultados y comparar el comportamiento a lo largo de las tres generaciones corrigiendo las variaciones que se presentan durante cada generación.

Mediante la prueba de Kastenbaum – Bowman (Kastenbaum & Bowman K. O., 1970) se comprobó si existen diferencias significativas en el número de malformaciones por concentración entre el número total de organismos recuperados.

3. Resultados

3.1 Toxicidad del 2,4-D

Los resultados de sobrevivencia promedio, proporción sexual y fertilidad obtenidos después de la exposición de larvas al 2,4-D se muestran en la tabla 1. No se recuperaron moscas en la concentración más alta (1.12E+01 mM) por lo que las cruzas que se realizaron para obtener la F_1, F_2 y F_3, únicamente fueron de las concentraciones 1.72E-04 mM a la 2.81E+00 mM y el testigo negativo.

Tabla 1. Sobrevivencia promedio, proporción sexual y fertilidad de moscas tratadas con 2,4-D

Concentración [mM]	N	Sobrevivencia promedio ± ee	Proporción sexual		Fertilidad		
			♀♀	♂♂	TxT	TxNT	NTxT
Test	738	105.4 ± 9.2	0.51 ± 0.01	0.492 ± 0.01	0.90	0.95	1.00
1.72E-04	565	113.0 ± 4.8	0.51 ± 0.04	0.491 ± 0.04	0.95	1.00	0.95
6.86E-04	855	122.1 ± 4.6	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.00	1.00	0.90
2.74E-03	791	113.0 ± 6.0	0.49 ± 0.02	0.509 ± 0.02	0.95	0.90	0.85
1.10E-02	834	119.1 ± 6.7	0.48 ± 0.02	0.523 ± 0.02	1.00	0.90	0.85
4.39E-02	757	108.1 ± 4.4	0.47 ± 0.02	0.527 ± 0.02	1.00	0.80	0.95
1.76E-01	759	108.4 ± 5.5	0.46 ± 0.02	0.537 ± 0.02	0.95	0.95	0.95
7.03E-01	685	97.9 ± 6.3	0.51 ± 0.03	0.495 ± 0.03	1.00	1.00	0.95
2.81E+00	588	84.0 ± 5.2	0.45 ± 0.02	0.555 ± 0.02	1.00	0.95	0.90
1.12E+01	4	0.6 ± 0.4 *	0.67 ± 0.14	0.333 ± 0.14	0.00	0.00	0.00

*****Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p<0.05$)**.** Elaboración propia

La figura 1 muestra el resultado de la sobrevivencia promedio obtenida en cada concentración después del tratamiento. A partir de la concentración 1.72E-04 mM y hasta la 1.10E-02 mM, es evidente un incremento en el número de organismos que logran sobrevivir. En las concentraciones siguientes empieza a disminuir el número de organismos recobrados hasta llegar a una concentración letal, siendo esta última estadísticamente significativa con respecto al testigo ($p<0.05$).

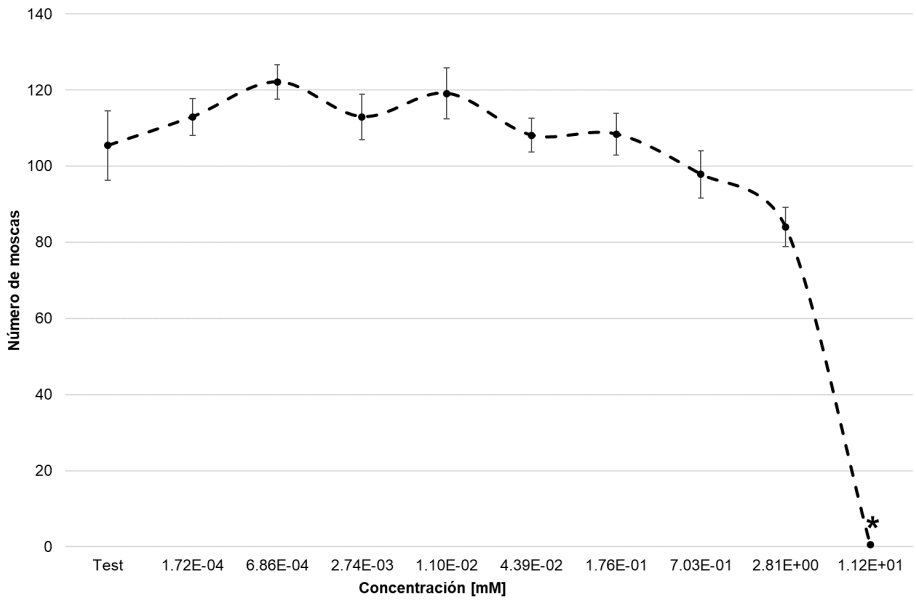


Fig. 1 Curva de sobrevivencia de moscas *D. melanogaster* a la exposición de 2,4-D
*****Diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$)**.** Elaboración propia

En la figura 2 se muestra el resultado de la proporción sexual promedio de los organismos tratados. Durante el tratamiento se recuperaron más machos que hembras, a excepción de las concentraciones 1.72E-07 y 7.03E-04.

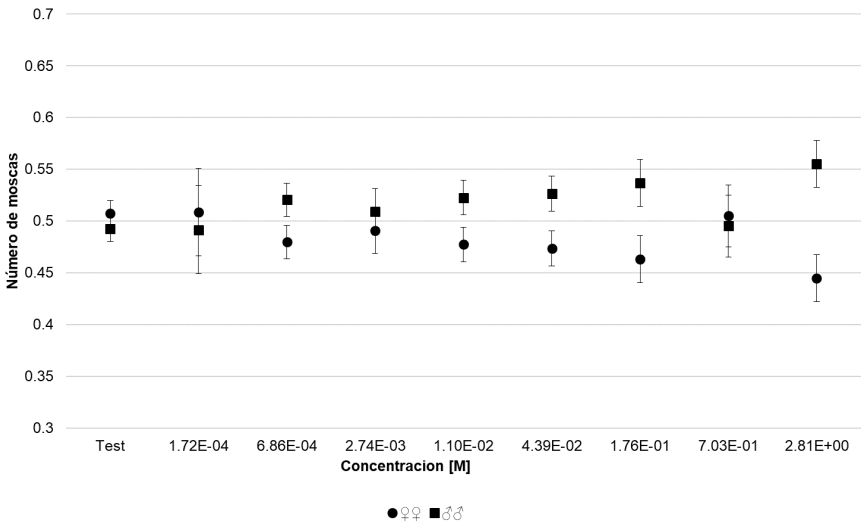


Fig. 2 Proporción sexual de moscas *D. melanogaster* expuestas a 2,4-D
Elaboración propia

3.2 Efecto reprotóxico y transgeneracional.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos de la progenie promedio y la fertilidad para cada una de las diferentes cruzas, a lo largo de 3 generaciones.

En las cruzas TxT y TxNT, la fertilidad no se vió afectada, pero en la cruza NTxT existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones 6.86E-04 y 1.76E-01, en las que es mayor la fertilidad con respecto al testigo ($p<0.05$).

Tabla 2. Progenie promedio y fertilidad de los tres tipos de cruzas a lo largo de 3 generaciones

	F1			F2			F3	
Concentración [mM]	N	Progenie promedio ± ee	Fertilidad	N	Progenie promedio ± ee	Fertilidad	N	Progenie promedio ± ee
TxT								
Test	1977	109.8 ± 8.2	1.00	2559	127.9 ± 6.9	1.00	2217	110.8 ± 11.3
1.72E-04	1872	98.5 ± 8.5	0.95	2579	135.7 ± 6.4	1.00	2476	123.8 ± 11.1
6.86E-04	1894	94.7 ± 8.3	0.90	2062	114.5 ± 9.6	1.00	2558	127.9 ± 11.9
2.74E-03	1848	97.2 ± 8.3	1.00	2453	122.6 ± 9.7	0.90	1835	101.9 ± 6.0
1.10E-02	2310	115.5 ± 7.2	1.00	2599	129.9 ± 9.6	0.95	2109	111.0 ± 10.9
4.39E-02	1940	97.0 ± 10.8	1.00	2566	128.3 ± 9.8	0.90	2114	117.4 ± 10.9
1.76E-01	1871	98.4 ± 8.0	0.95	2017	112.0 ± 8.4	0.90	1899	105.5 ± 9.4
7.03E-01	2007	100.3 ± 5.8	1.00	2285	114.2 ± 9.6	0.95	2420	127.3 ± 8.2
2.81E+00	1713	85.6 ± 6.2	1.00	2123	106.1 ± 12.4	1.00	2398	119.9 ± 7.9
TxNT								
Test	2035	107.1 ± 8.1	1.00	2697	134.8 ± 10.7	0.95	2541	133.7 ± 8.5
1.72E-04	1985	99.2 ± 6.5	1.00	2523	126.1 ± 11.9	1.00	2603	130.1 ± 7.7
6.86E-04	1723	86.1 ± 6.3	1.00	2754	137.7 ± 11.6	0.95	2176	114.5 ± 4.7
2.74E-03	1604	89.1 ± 10.1	1.00	2071	103.5 ± 10.9	1.00	2156	107.8 ± 12.7
1.10E-02	1565	86.9 ± 10.8	0.90	2090	116.1 ± 12.0	0.90	2149	119.3 ± 7.1
4.39E-02	1390	86.8 ± 10.3	1.00	2612	130.6 ± 6.9	0.85	1923	113.1 ± 8.1
1.76E-01	1550	81.5 ± 9.4	0.95	2363	124.3 ± 8.0	1.00	2395	119.7 ± 8.7
7.03E-01	1689	84.4 ± 6.2	1.00	2763	138.1 ± 10.2	0.95	2395	126.0 ± 10.9
2.81E+00	1986	104.5 ± 7.2	1.00	2828	141.4 ± 5.8	0.95	2340	123.1 ± 9.1
NTxT								
Test	1673	83.6 ± 8.2	0.85	1826	107.4 ± 13.1	0.90	2282	126.7 ± 11.1
1.72E-04	1838	96.7 ± 8.6	0.65	2048	157.5 ± 6.8 *	1.00	2387	119.3 ± 9.1
6.86E-04	2185	121.3 ± 14.1	1.00 *	2248	112.4 ± 12.8	1.00	1824	91.2 ± 9.4
2.74E-03	2482	146.0 ± 9.4 *	0.90	2209	122.7 ± 12.6	1.00	1892	94.6 ± 10.5
1.10E-02	2220	130.5 ± 9.8 *	0.85	2204	129.6 ± 12.3	0.95	1476	77.6 ± 11.2 *
4.39E-02	2477	130.3 ± 11.5 *	0.90	1873	104.0 ± 12.9	0.95	1662	87.4 ± 12.0
1.76E-01	1909	100.4 ± 9.0	1.00 *	1933	96.6 ± 7.4	0.95	1480	77.8 ± 7.1 *
7.03E-01	1938	102.0 ± 9.2	0.85	1359	79.9 ± 11.7	0.90	1391	77.2 ± 13.2 *
2.81E+00	2593	144.0 ± 9.8 *	0.95	2611	137.4 ± 8.7	1.00	2343	117.1 ± 9.2

*****Diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$)**.** Elaboración propia

3.2.1. Cruza TxT.

En la figura 3 se muestra la sobrevivencia y las tres generaciones (F_1, F_2 y F_3) de la cruza TxT, en donde todos los datos están corregidos a 1.

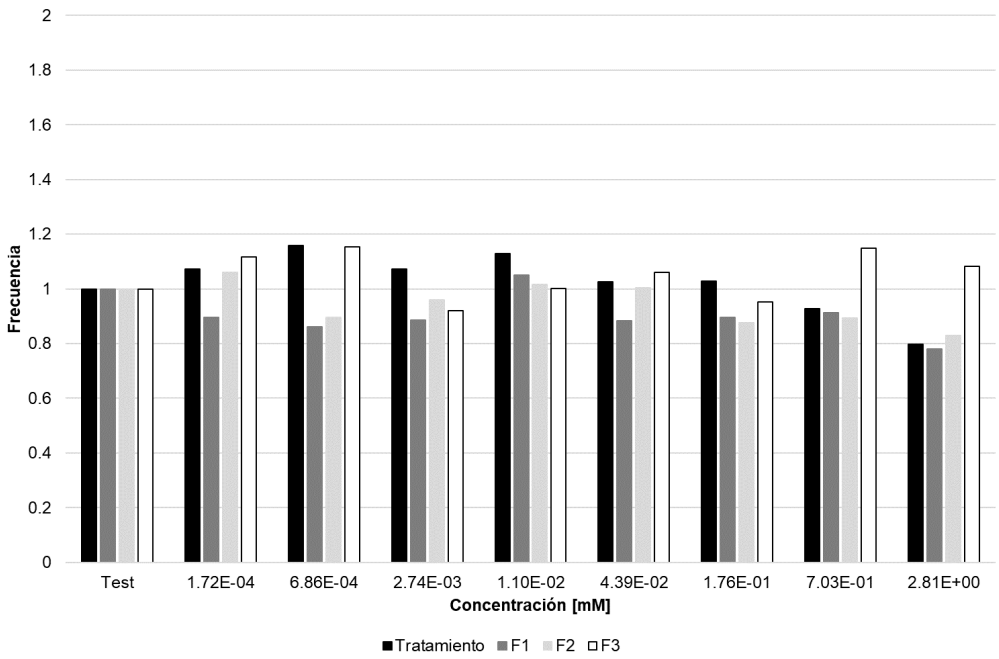


Fig. 3 Sobrevivencia de moscas *D. melanogaster* expuestas a 2, 4-D y progenies F_1, F_2 y F_3 de la cruza TxT
Elaboración propia

La progenie promedio de las diferentes concentraciones se mantiene similar al testigo durante las tres generaciones, por lo que no se existen diferencias estadísticamente significativas. Durante las primeras dos generaciones (F_1 y F_2), las concentraciones 6.86E-04, 7.03E-01 y 2.81E+00 se mantienen por debajo del testigo, pero al llegar a la F_3 hay un incremento en el número de progenie incluso mayor que en el testigo.

3.2.2. Cruza TxNT.

En la figura 4 se muestra la sobrevivencia de las moscas tratadas con el 2,4-D y las tres generaciones (F_1, F_2 y F_3) de la cruza TxNT, en donde todos los datos están corregidos a 1. Cuando se expone únicamente a la hembra se observa una tendencia en donde la progenie de todas las concentraciones es menor o igual a la obtenida en el testigo.

La F_1, F_2 y F_3 de las concentraciones 2.74E-03 y 1.10E-02 siempre mantienen valores por debajo del testigo. En las concentraciones 6.86E-04, 4.39E-02, 7.03E-1 y 2.81E+00 se logra recuperar más progenie en la F_2, obteniendo valores similares al testigo. Numéricamente, no hay diferencias estadísticamente significativas de ninguna concentración con respecto al testigo.

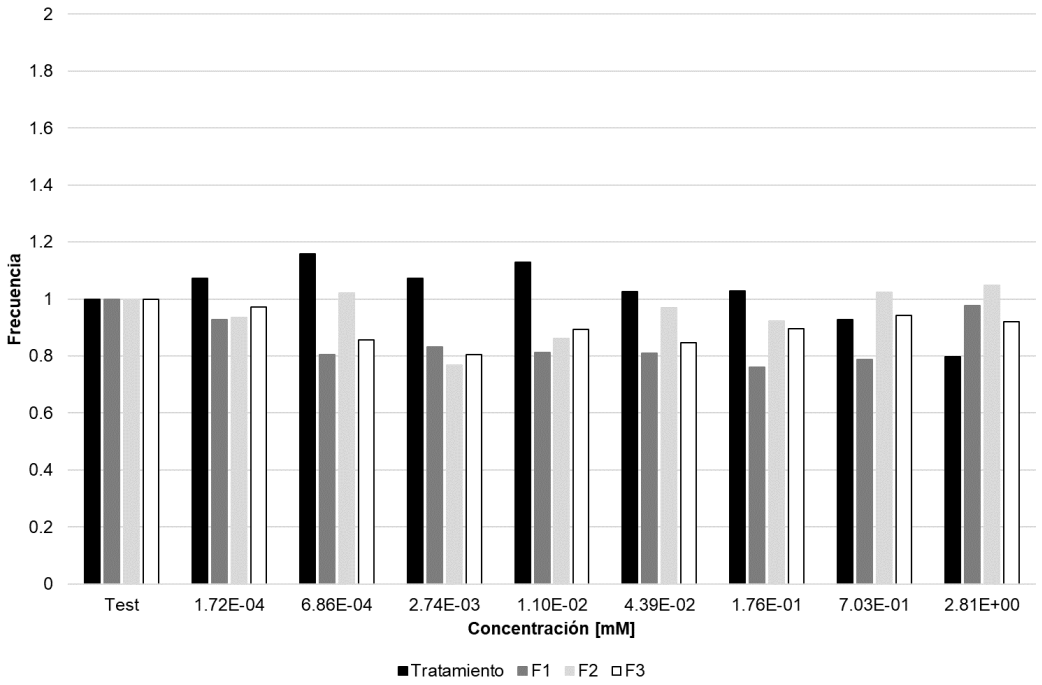


Fig. 4 Sobrevivencia de moscas *D. melanogaster* expuestas a 2, 4-D y progenies F_1, F_2 y F_3 de la cruza TxNT**.**Elaboración propia

3.2.3 Cruza NTxT.

En la figura 5 se muestra la sobrevivencia de las moscas tratadas con el 2, 4-D y las tres generaciones (F_1, F_2 y F_3) de la cruza NTxT, en donde todos los datos están corregidos a 1. Cuando el macho es el único expuesto al 2,4-D, la progenie que se obtiene durante la F_1 siempre es mayor que el testigo y en las concentraciones 2.74E-03, 1.10E-02, 4.39E-02 y 2.81E+00 hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo.

Durante la F_2 hay un incremento en el valor de la progenie en la concentración 1.72E-04, 1.10E-02 y 2.81E+00, pero solo en la concentración 1.72E-04 llega a ser estadísticamente significativo con respecto al testigo. En la concentración 7.03E-01 el valor de la progenie es menor comparado con el testigo, aunque numéricamente no existen diferencias estadísticamente significativas. En concentraciones restantes, los valores son similares al testigo.

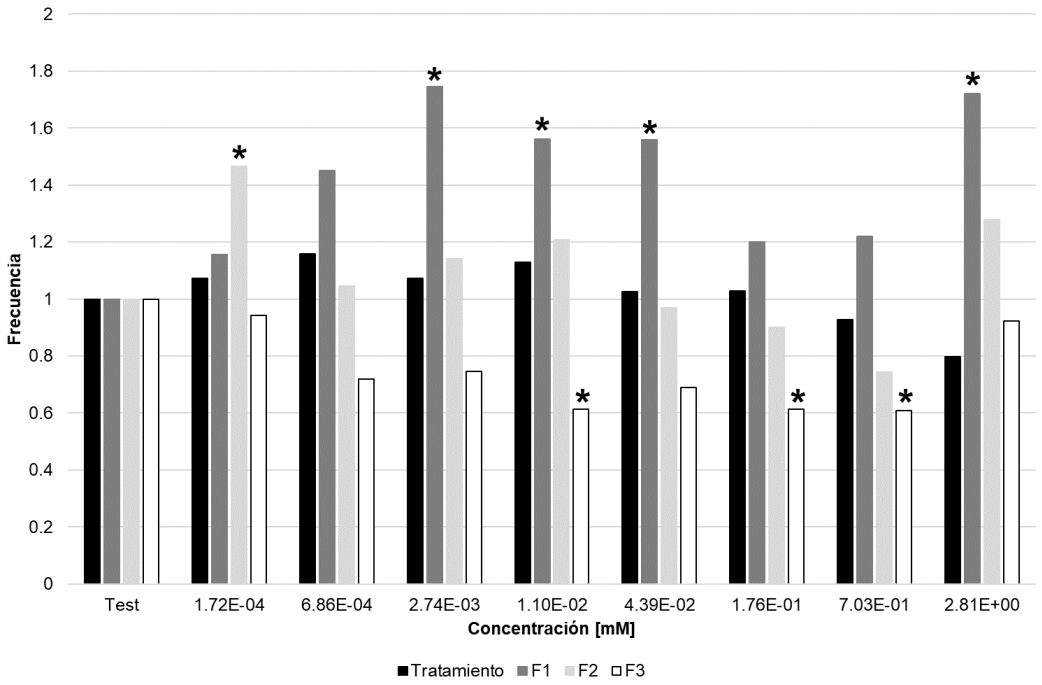


Fig. 5 Sobrevivencia de moscas *D. melanogaster* expuestas a 2, 4-D y progenies F_1, F_2 y F_3 de la cruza NTxT

*****Diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$)**.** Elaboración propia

En la F_3, los valores de la progenie siempre son menores que el testigo, aunque solo en las concentraciones 1.10E-02, 4.39E-2 y 7.03E-01 se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

3.3 Anomalías morfológicas.

Los descendientes de los organismos tratados presentaron una serie de anomalías morfológicas que persistieron durante las tres generaciones. En la figura 6, se observa a los diferentes organismos que fueron encontrados durante la F_3 en los diferentes esquemas de cruzas.

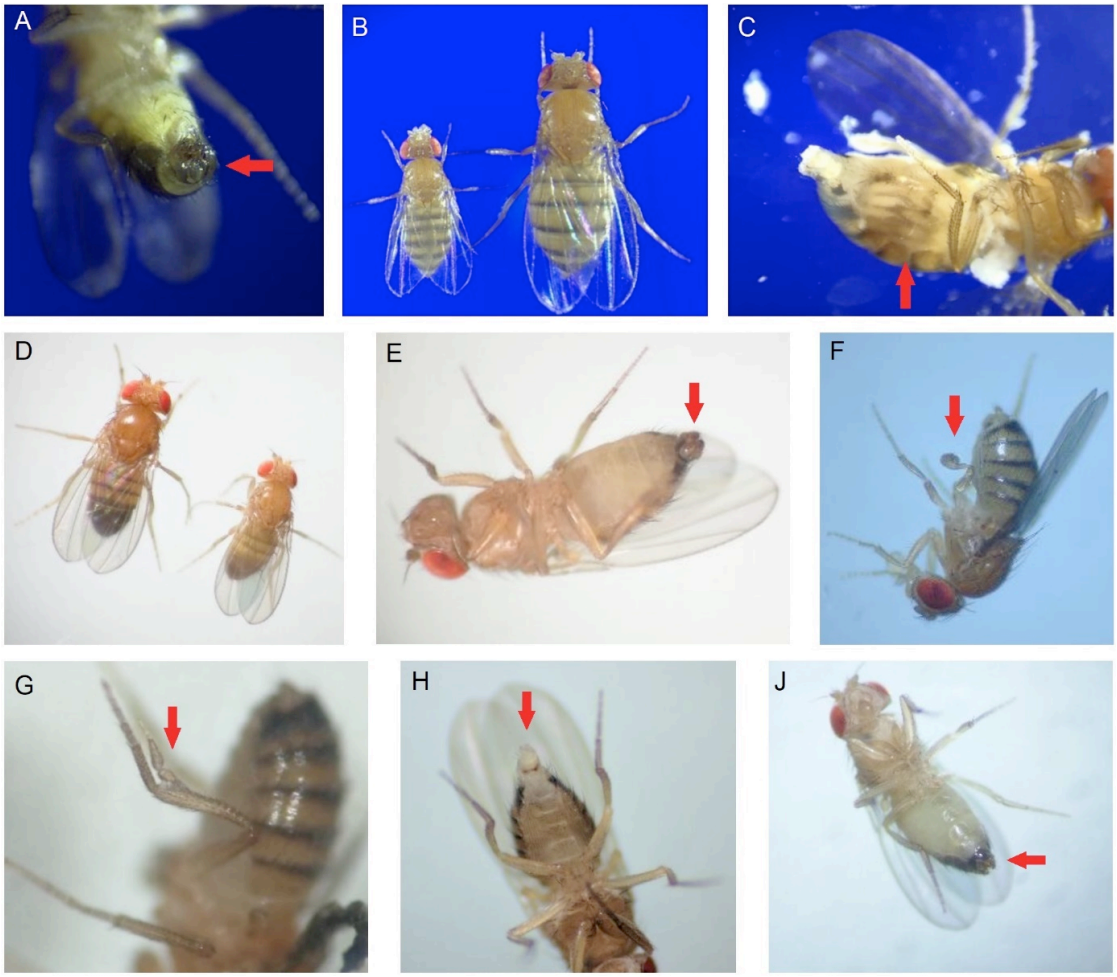


Fig. 6 Anomalías morfológicas en moscas de la F_3. A) Macho con la placa genital evertida, cruza TxNT; B) Hembra de menor tamaño, cruza TxT; C) Hembra con la placa genital evertida y huevos sueltos en la cavidad abdominal, cruza NTxT; D) Macho de menor tamaño, cruza TxT; E) Hembra con placa genital evertida y girada, cruza TxT; F) Extremidad no desarrollada, cruza TxNT; G) Segmento extra en una pata, cruza TxNT; H) hembra con placa genital evertida, cruza TxNT; J) Macho con placa genital evertida y girada, cruza TxNT.

Se consideraron únicamente aquellas que estuvieran relacionados con la placa genital, en la mayoría de los casos la placa estaba evertida y/o girada; con la relación al tamaño de los organismos, ya que hubo una reducción en el tamaño corporal; y por último en relación con las patas, pues se encontraron patas no desarrolladas por completo o segmentos extras en una misma pata.

La incidencia de malformaciones a lo largo de las generaciones y en las diferentes cruzas, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Incidencia de anomalías morfológicas.

	TxT						TxNT						NTxT					
[mM]	F_1	F_2	F_3	Total	N F_1-F_3	TxT % malf	F_1	F_2	F_3	Total	N F_1-F_3	TxNT % malf	F_1	F_2	F_3	Total	N F_1-F_3	NTxT % malf
Testigo	0	0	0	0	6753	0.00	0	0	0	0	7273	0.00	0	0	0	0	5781	0.00
1.72E-04	1	0	6	7	6927	0.10 *	1	2	2	5	7111	0.07 *	0	3	1	4	6273	0.06 *
6.86E-04	1	0	6	7	6514	0.11 *	2	0	2	4	6653	0.06 *	0	1	0	1	6257	0.02
2.74E-03	0	0	2	2	6136	0.03	0	0	0	0	5831	0.00	1	0	3	4	6583	0.06 *
1.10E-02	0	0	0	0	6928	0.00	1	0	3	4	5804	0.07 *	0	0	0	0	5900	0.00
4.39E-02	2	1	1	4	6620	0.06 *	2	0	2	4	5928	0.07 *	0	2	6	8	6012	0.13 *
1.76E-01	1	0	0	1	5787	0.02	3	0	3	6	6308	0.10 *	0	1	1	2	5322	0.04
7.03E-01	0	1	1	2	6712	0.03	0	0	1	1	6847	0.01	0	0	1	1	4688	0.02
2.81E+00	0	0	2	2	6234	0.03	0	0	0	0	7154	0.00	0	1	3	4	7547	0.05 *

N F_1-F_3, Número total de moscas obtenidas durante las tres generaciones según el esquema de cruza; * Diferencias estadísticamente significativas, Tablas de Kastenbaum-Bowman ($p<0.05$). Elaboración propia.

La incidencia de alteraciones morfológicas se mantiene a lo largo de las tres generaciones, en los diferentes sistemas de cruzas y en todas las concentraciones. La mayor incidencia de alteraciones se presenta en la F_3 sin importar el esquema de cruza. En el testigo no se presenta ninguna alteración, lo que indica que el daño es ocasionado por el 2,4-D.

En la cruza TxT existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones 1.72E-04, 6.86E-04 y 4.39E-02, lo que refleja un mayor daño en las concentraciones más bajas. En la cruza TxNT existen diferencias significativas en la concentración 1.72E-04, 6.86E-04, 1.10E-02, 4.39E-02 y 1.76E-01, siendo la cruza en donde hay más daño. En la cruza NTxT existen diferencias significativas en las concentraciones 1.72E-04, 2.74E-03, 4.39E-02 y 2.81E+00.

4. Discusión

4.1. Toxicidad del 2,4-D.

El modelo clásico de estudio dosis-respuesta, plantea que la relación entre la cantidad de compuesto y efecto sobre un organismo sigue un comportamiento creciente y lineal, iniciando por el origen y una región en donde los efectos no son medibles hasta llegar a una región de respuesta máxima o letal (en algunos casos), lo que quiere decir que mientras mayor sea la dosis, mayor será la respuesta (Peña, E., Carter E., 2001). Sin embargo, este modelo no contempla lo que sucede en las concentraciones bajas, en donde no hay un efecto observable o, por el contrario, hay un efecto mayor que a concentraciones más altas. Este aspecto es importante, pues podría estarse ignorando un posible daño al material genético hereditable de los sobrevivientes.

La sobrevivencia es un biomarcador que nos ayuda a conocer la toxicidad de un compuesto de manera general. Al exponer a las larvas al 2,4-D, se observa que en las concentraciones más bajas se recupera mayor número de moscas que en el testigo, aunque no se confirman diferencias estadísticamente significativas. Este tipo de respuesta ha sido denominada "hormesis".

La hormesis se refiere a una respuesta de dosis bifásica a un agente ambiental caracterizado por una estimulación de dosis baja o un efecto beneficioso y un efecto tóxico o inhibitorio de dosis altas. Es una respuesta adaptativa de las células y los organismos a un estrés moderado. Como resultado, las células aumentan su producción de proteínas citoprotectoras y restauradoras, incluidos los factores de crecimiento, enzimas antioxidantes y las proteínas chaperonas. La respuesta de la célula u organismo a la dosis baja de la toxina se considera un proceso compensatorio adaptativo después de una interrupción inicial en la homeostasis (Mattson, 2008).

Como en todos los organismos, en *Drosophila* no todas las larvas logran llegar al estado adulto. Tomando en cuenta esto, sabemos que el número de larvas que completan el desarrollo hasta imagos es menor al 100%. Determinados compuestos inductores de estrés en las larvas provocan que su metabolismo se active y el porcentaje de larvas que llegan a imagos es mayor que el que se obtiene si el estímulo no logra activar la respuesta metabólica asociada con la desintoxicación, así, el efecto de una concentración baja puede llegar incluso a ser letal.

A partir de la concentración 1.72E-04 mM, hasta la 1.10E-02 mM, el 2,4-D no mata a las larvas y el estrés inducido provocó que un porcentaje mayor que en el testigo, logre culminar su ciclo de vida y lleguen a convertirse en imagos.

La determinación sexual en *Drosophila melanogaster* determina que la probabilidad de obtener una hembra o un macho es de 0.5. Por lo que, si el tratamiento no afecta este biomarcador, tendría que haber fluctuaciones dentro de este rango. En la proporción sexual de los organismos tratados, se recuperaron más machos que hembras, con excepción de las concentraciones 1.72E-04 y 7.03E-01 en donde se recuperaron ligeramente más hembras que machos. Existe una tendencia a recuperar más machos, lo que nos indica que el tratamiento podría estar afectando en mayor medida a las hembras. Aunque numéricamente hablando no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo, es evidente que existe un efecto mayor del tratamiento sobre alguno de los dos sexos.

No hay diferencias estadísticamente significativas en la fertilidad de los organismos tratados, todos se mantienen iguales o similares al testigo. El 2,4-D no mostró efecto en la fertilidad de los organismos en las concentraciones utilizadas.

4.2. Efecto reprotóxico y transgeneracional.

La toxicidad de un compuesto además de la sobrevivencia puede tener efectos a otros niveles como la capacidad de reproducción, sufriendo alteraciones en los procesos fisiológicos relacionados con el apareamiento, la diferenciación, maduración sexual, producción de gametos y la fertilización (Repetto & Repetto, 2009).

Los resultados de la cruza TxT no mostraron diferencias estadísticamente significativas. No se observó ninguna alteración en la cantidad de progenie que tienen a lo largo de tres generaciones. A pesar de no mostrarse un efecto evidente en el número de progenie, se considera que existe un efecto perjudicial en las moscas ya que en el estudio morfológico se evidencia daño en algunas de ellas.

En la cruza TxNT, se mostró una tendencia a obtener menor cantidad de progenie y aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, hubo un efecto evidente que mostró como el 2,4-D está alterando y modificando de manera negativa la cantidad de progenie que se obtiene en generaciones siguientes a una única exposición.

En la cruza NTxT se observó el mayor efecto del 2,4-D. En la F_1 siempre se recuperó mayor cantidad de progenie con respecto al testigo. Al llegar a la F_2, en la concentración 1.72E-04 se obtuvo mayor número de progenie y fue estadísticamente significativo, sin embargo, en las concentraciones restantes se obtuvo un menor número de progenie conforme aumentaba la concentración a la que había sido expuesto el macho parental. Al llegar a la F_3 el número de progenie continúo disminuyendo hasta ser estadísticamente significativo en tres concentraciones (1.10E-02, 1.76E-01 y 7.03E-01).

La tendencia de obtener un menor número de progenie conforme aumenta la concentración, haría suponer que en la concentración más alta será en donde se obtenga un menor número de progenie. Los resultados reflejan que en algunas de las concentraciones más altas (1.76E-01 y 7.03E-01) comienza a ser menor el número de progenie, pero al llegar a la concentración 2.81E+00 (que fue la más alta que se probó para el efecto transgeneracional) siempre hubo un incremento en el número de progenie. Este efecto se observó durante las tres generaciones.

La cantidad de progenie se vio alterada cuando se expone al macho, en la primera generación aumenta hasta llegar a ser significativa y en las generaciones siguientes la cantidad de progenie es menor.

Los resultados de la cruza TxNT y NTxT explican porque en la cruza TxT no se mostró un efecto aparente con respecto a la cantidad de progenie. Cuando únicamente la hembra fue tratada, el número de progenie fue menor, pero cuando solamente el macho fue el tratado, la tendencia fue recuperar más progenie. El efecto que tiene el 2,4-D en el macho y en la hembra se está enmascarando cuando ambos organismos son tratados.

El 2,4-D no mostró un efecto en la fertilidad de la F_1 y F_2, se mantuvo igual o similar al testigo. En la cruza NTxT durante la F_1 es en donde hubo mayores variaciones en la fertilidad y llegó a ser estadísticamente significativo en las concentraciones 6.86E-04 y 1.76E-01. En un panorama general, la fertilidad no se vio afectada por el 2,4-D.

En un estudio desarrollado por Mesak (2018) se menciona que el 2,4-D tuvo un impacto en diferentes organismos bioindicadores de la calidad ambiental provocando diversos cambios en su abundancia. Esto coincide con los resultados obtenidos, pues existen fluctuaciones en el número de progenie que se logró recuperar a lo largo de las generaciones con respecto al testigo, siendo este último una referencia del número de progenie habitual que se obtiene cuando no hay una exposición al 2,4-D.

Lo anterior sugiere que el 2,4-D no provoca esterilidad en las moscas, y que afecta directamente los gametos tanto masculinos como femeninos, pues la progenie se ve afectada. En los estudios de Harada (2016) se reportan que la exposición al 2,4-D provoca astenospermia, necrospermia y teratospermia.

4. 3 Anomalías morfológicas

Estudios previos registran que en organismos como el sapo argentino (*Rhinella arenarum*) y en embriones de pez cebra, el 2,4-D provoca una reducción en el tamaño y longitud de los organismos expuestos (Aronzon et al., 2010; Li et al., 2017). En este estudio los organismos expuestos al 2,4-D no presentaron ningún tipo de malformación, pero en sus descendientes hubo una incidencia en la reducción del tamaño de las moscas, tanto en hembras como en machos. Su tamaño se reduce hasta una tercera parte de su tamaño promedio.

LaChapelle y colaboradores (2007) describen cómo el 2,4-D bloquea la maduración meiótica *in vitro* e inhibe la maduración del ovocito en *Xenopus*. En la figura 6 C) se aprecia una hembra con la placa genital evertida y huevos en diferentes estados de maduración que están sueltos en la cavidad abdominal, siendo un posible efecto del 2,4-D lo que está ocasionando que los huevos no maduren de manera correcta y con esto, no puedan ser ovopositados.

Barik (Barik & Mishra, 2018) define a los teratógenos como factores externos (químicos, físicos) que dificultan el proceso de desarrollo si se ingieren durante el período de desarrollo prenatal y los efectos se mantienen durante toda la vida del organismo. Las anomalías causadas por los teratógenos pueden ser anatómicas, morfológicas, fisiológicas o conductuales, que son efectos combinados de alteraciones moleculares, celulares y bioquímicas.

La exposición al 2,4-D, mostró un efecto sobre el desarrollo de las moscas, en donde se vio afectada la anatomía del organismo y hay alteraciones morfológicas que persisten en más de una generación. Por lo anterior, se puede considerar que el 2,4-D tiene un efecto teratogénico en las moscas. En el estudio

desarrollado por Ngo (2010) se muestra una relación de malformaciones asociado con la exposición al 2,4-D.

Sin importar el tipo de cruza, en la F_3 hubo un mayor número de anomalías morfológicas. El efecto del 2,4-D prevalece incluso después de haber pasado tres generaciones a la exposición y no hay una disminución en el efecto, todo lo contrario, hay un mayor número de anomalías morfológicas.

5. Conclusiones

A pesar de no presentarse diferencias significativas en la sobrevivencia de los organismos expuestos, existe un efecto en la cantidad de progenie que se logra obtener y que prevalece en las generaciones posteriores.

Cuando las moscas son expuestas al 2,4-D, existe un efecto reprotóxico que prevalece a lo largo de 3 generaciones. Este hecho es relevante pues muchas veces se ignora el efecto que pueden tener una gran cantidad de compuestos que son utilizados y permanecen en el medio ambiente.

El efecto que tiene el 2,4-D después de una única exposición no disminuye a lo largo de las generaciones, mientras se avanza en el tiempo, las fluctuaciones en el número de progenie y la incidencia alteraciones morfológicas incrementan.

El efecto causado por un compuesto debe ser evaluado no solo en los organismos expuestos, pues es importante conocer si existe algún impacto a lo largo de las generaciones siguientes para comprender completamente su efecto.

El uso descontrolado de pesticidas puede tener y está teniendo un efecto negativo no solo en el ser humano sino también en la diversidad y abundancia de los organismos no blanco de los pesticidas, trayendo consigo un desbalance en el ecosistema.

Agradecimientos

Al laboratorio de Genética y toxicología ambiental – Banco de moscas, a la Dra. Adriana Muñoz Hernández y a la Biól. Estefanía Arroyo Jilote. Taller de Introducción a la toxicología genética y ambiental, Licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. Proyecto PAPIIT (IN229719), DGAPA UNAM.

7. Referencias

Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2010). Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, Rhinella arenarum. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *9*(7), 14247–14253. https://doi.org/10.1002/tox

Barik, B. K., & Mishra, M. (2018). Nanoparticles as a potential teratogen: a lesson learnt from fruit fly. *Nanotoxicology*, *0*(0), 1–27. https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1530393

Garabrant, D. H., & Philbert, M. A. (2002). Epidemiology and Toxicology. *Metabolism Clinical And Experimental*, *32*(4), 233–257. Retrieved from file:///Users/Eric/Dropbox/Papers2 Dropbox/Articles/2002/Garabrant/Metabolism Clinical And Experimental 2002 Garabrant.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/9F630EBC-9E55-431F-8725-2639DE0EC395

Goodman, J. E., Loftus, C. T., & Zu, K. (2017). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and non-Hodgkin's lymphoma: results from the Agricultural Health Study and an updated meta-analysis. *Annals of Epidemiology*, *27*(4), 290–292.e5. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.01.008

Harada, Y., Tanaka, N., Ichikawa, M., Kamijo, Y., Sugiyama, E., Gonzalez, F. J., & Aoyama, T. (2016). PPARα-dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Archives of Toxicology*, *90*(12), 3061–3071. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1669-z

Horikoshi, S., Miura, T., Kajitani, M., & Serpone, N. (2008). Microwave discharge electrodeless lamps (MDEL). III. A novel tungsten-triggered MDEL device emitting VUV and UVC radiation for use in wastewater treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *7*(3), 303–310. https://doi.org/10.1039/b715774f

Kastenbaum, M. A., & Bowman K. O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res*, *9*, 527–549.

LaChapelle, A. M., Ruygrok, M. L., Toomer, M. E., Oost, J. J., Monnie, M. L., Swenson, J. A., … Stebbins-Boaz, B. (2007). The hormonal herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, inhibits Xenopus oocyte maturation by targeting translational and post-translational mechanisms. *Reproductive Toxicology*, *23*(1), 20–31. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.08.013

Li, K., Wu, J. Q., Jiang, L. L., Shen, L. Z., Li, J. Y., He, Z. H., … He, M. F. (2017). Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, *171*, 40–48. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.032

Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, *7*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007

Mesak, C., de Oliveira Mendes, B., de Oliveira Ferreira, R., & Malafaia, G. (2018). Mutagenic assessment of Lithobates catesbeianus tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(15), 15235–15244. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1979-1

Ngo, A. D., Taylor, R., & Roberts, C. L. (2010). Paternal exposure to Agent Orange and spina bifida: A meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, *25*(1), 37–44. https://doi.org/10.1007/s10654-009-9401-4

Nöthinger, R. (1970). Sucrose density separation a method for collecting large numbers of Drosophila larvae, (February), 1970.

Peña, Carlos E., Carter Dean E., A.-F. F. (2001). Toxicología ambiental. *Clinical Infectious Diseases*, *22*, 1–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8824972

Rajak, P., Khatun, S., Dutta, M., Mandi, M., & Roy, S. (2018). Chronic exposure to acephate triggers ROS-mediated injuries at organismal and sub-organismal levels of *Drosophila melanogaster*. *Toxicology Research*, *7*(5), 874–887. https://doi.org/10.1039/C8TX00052B

Ramos, P., Abundis, H., Gaytán, J., Ordaz, Ma. Orozco, P., Maldonado, J., & Hernández, J., Gonzales, E., Reyes, P., Galicia, E., M. J. (1993). Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster.

Repetto, M., & Repetto, G. (2009). *Toxicología Fundamental. Cuarta Edición*.

Rosso, S. B., Cáceres, a O., de Duffard, a M., Duffard, R. O., & Quiroga, S. (2000). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *56*(1), 133–140. https://doi.org/10.1093/toxsci/56.1.133

Sharifi Pasandi, M., Hosseini Shirazi, F., Gholami, M. R., Salehi, H., Najafzadeh, N., Mazani, M., … Niapour, A. (2017). Epi/perineural and Schwann Cells as Well as Perineural Sheath Integrity are Affected Following 2,4-D Exposure.

Neurotoxicity Research, *32*(4), 624–638. https://doi.org/10.1007/s12640-017-9777-y

Stellman, J. M., & Stellman, S. D. (2018). Agent Orange During the Vietnam War: The Lingering Issue of Its Civilian and Military Health Impact. *American Journal of Public Health*, *108*(6), 726–728. https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304426

Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexieva, V., & Karanov, E. (2000). Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Archives of Toxicology*, *74*(9), 560–566. https://doi.org/10.1007/s002040000147.

Capítulo 25

EFECTOS TÓXICOS Y POTENCIAL DE BIORREMOCION DEL COLORANTE AZO "ROJO CONGO" POR DOS MICROALGAS CLOROFÍCEAS

Aldo Azael Chávez Vargas[1]
Miriam Azucena Hernández Zamora[1]
Felipe Fernando Martínez Jerónimo[1*]

[1] Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Hidrobiología Experimental. Carpio y Plan de Ayala s/n, México, Ciudad de México, 11340.

[a] ferjeronimo@hotmail.com

Resumen

Dada la contaminación acuática ocasionada por la descarga de colorantes textiles y la importancia de las microalgas en la biorremoción de contaminantes químicos, en este estudio se evaluó la capacidad de *Ankistrodesmus falcatus* y *Scenedesmus incrassatulus* para biorremover el colorante Rojo Congo, cuantificando efectos sobre la morfología y la concentración total de macromoléculas y pigmentos fotosintéticos. Se determinaron las Concentraciones Inhibitorias Medias (CI_{50}) de Rojo Congo para cada clorofícea de acuerdo al protocolo 201 de la OECD. Las pruebas de biorremoción se realizaron en medio Basal de Bold, con inóculos iniciales de $5x10^4$, $1x10^6$ y $2x10^6$ células mL^{-1}, y concentraciones subinhibitorias del colorante (CI_1, CI_{10}, CI_{20}, CI_{30}, CI_{40}, CI_{50} y CI_{60}), en cultivos aireados y aireados-estáticos, con iluminación continua a 120 PPFD y a 25°C. La cuantificación del Rojo Congo residual se realizó espectrofotométricamente a 495 nm. Asimismo, se evaluaron las alteraciones ocasionadas sobre la morfología, concentración total de proteínas, lípidos, carbohidratos y pigmentos fotosintéticos. *S. incrassatulus* fue más sensible al colorante que *A. falcatus*, presentando CI_{50} de 9.27 y 19.25 mg L^{-1}, respectivamente. Con respecto a la morfología, *A. falcatus* no presentó cambios en ninguna concentración ensayada, sin embargo, en *S. incrassatulus* se redujo el número de células por cenobio al aumentar la concentración del colorante. *S. incrassatulus* biorremovió 38.48% de Rojo Congo (Concentración inicial: 4.99 mg L^{-1}) en sistemas combinados aireados-estáticos, mientras que *A. falcatus* no biorremovió al colorante en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que demostró no solo la diferencia en sensibilidades sino en su capacidad para eliminar el colorante.

Palabras clave: colorante azo, Rojo Congo, biorremoción, *Ankistrodesmus falcatus*, *Scenedesmus incrassatulus*

1. Introducción

La industria es la segunda actividad productiva que más agua consume a nivel mundial, no obstante, de los 6 billones de litros que se destinan anualmente a este sector se trata solamente el 15% de aguas residuales producidas; para el caso de México se trataron únicamente 83,700 L s^1 de 218,100 L s^1 generadas en 2017 (CEMDA, 2006; CONAGUA, 2018).

Las aguas residuales textiles se caracterizan por la presencia de altas concentraciones de colorantes (Kandelbauer y Guebitz, 2005; Holkar *et al.*, 2016) estas sustancias son capaces de absorber energía luminosa y de fijarse a un sustrato, y son ampliamente utilizados por la industria textil, papelera, fotográfica, farmacéutica, alimenticia, cosmética, peletera, entre muchas más (Ali, 2010; Pereira y Alves, 2012). Los efluentes que contienen colorantes representan un riesgo ambiental cuando no son tratados y se liberan en cuerpos de agua, pues reducen la penetración de luz y con ello la actividad fotosintética de los productores primarios; además alteran la solubilidad de gases, aumentan la demanda biológica y química de oxígeno, y son tóxicos para la biota acuática (Sedlak, 2011; Pereira y Alves, 2012; Holkar *et al.*, 2016).

Entre el 60 y 70% de los colorantes sintéticos utilizados a nivel mundial son azoicos; estos presentan en su molécula un grupo azo (R-N=N-R') (Sedlak, 2011; Wardman, 2017). Muchos colorantes azoicos, como el Rojo Congo, han demostrado ser carcinogénicos y mutagénicos, prohibiéndose su producción y venta en varios países (Sabnis, 2007; Hernández-Zamora *et al.*, 2015); sin embargo, aún son empleados en muchos otros, por lo que el tratamiento de los efluentes industriales que contienen colorantes azoicos es de suma importancia.

Los métodos de tratamiento convencionales como adsorción, oxidación, precipitación, coagulación, filtración, electrólisis, fotodegradación y lodos activados no suelen ser efectivos para el tratamiento de colorantes, debido a su elevado peso molecular y complejidad estructural. Otras técnicas, como la adsorción con carbón activado, permiten remover rápidamente el color de efluentes, pero son costosos (Ali, 2010). En la actualidad se investiga sobre nuevas metodologías para remover colorantes de manera más económica y eficiente (Tuesta *et al.*, 2005; Bubaez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Hashem *et al.*, 2015; Pedrozo-Martínez, 2015; Santos y Boaventura, 2016; Yang et al., 2016; Yuan *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2017).

Entre las opciones de tratamientos alternativos, en los últimos años se ha evaluado la capacidad de biorremoción de las microalgas. Así se ha demostrado que éstas son útiles en la remoción de nitrógeno y fósforo en efluentes agrícolas y en aguas de tratamiento secundario; también captan y concentran iones metálicos tóxicos e inclusive degradan hidrocarburos y plaguicidas (Priyadarshani *et al.*, 2011). La microalga verde *Ankistrodesmus falcatus* ha sido empleada para la remoción de CO_2, CO_3, HCO_3, fosfatos y nitrógeno amoniacal de aguas residuales, además

Ankistrodesmus sp. puede remover nonilfenoles, moléculas orgánicas complejas que se producen durante la degradación de hormonas (Patil, 1991; He *et al.*, 2016). Algunas especies como *Chlorella* sp., *Elakatothrix* sp., *Haematococcus* sp., *Microspora* sp., *Spirogyra sp.* y *Volvox* sp. han demostrado capacidad de biorremover colorantes (El-Sheekh *et al.*, 2009; Martínez-Tristán, 2012; Brahmbhatt y Jasrai, 2013; Mahalakshmi *et al.*, 2015). Inclusive *Scenedesmus* sp. se ha empleado para biorremover colorantes azoicos (Mahalakshmi *et al.*, 2015; Omar, 2008). Por lo antes descrito, en el presente estudio se evaluó la capacidad de dos microalgas clorofíceas para eliminar al colorante azo Rojo Congo, como organismos alternativos para el posible tratamiento de efluentes que contengan este tipo de contaminantes acuáticos.

2. Material y métodos

2.1. Microalgas

Ankistrodesmus falcatus y *Scenedesmus incrassatulus* (Fig.1) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Hidrobiología Experimental de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Las microalgas se propagaron en medio mineral Basal de Bold (Tabla 1) utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad total, con un volumen de trabajo de 175 mL, temperatura de 25°C, luz continua de 120 PPFD y aireación constante.

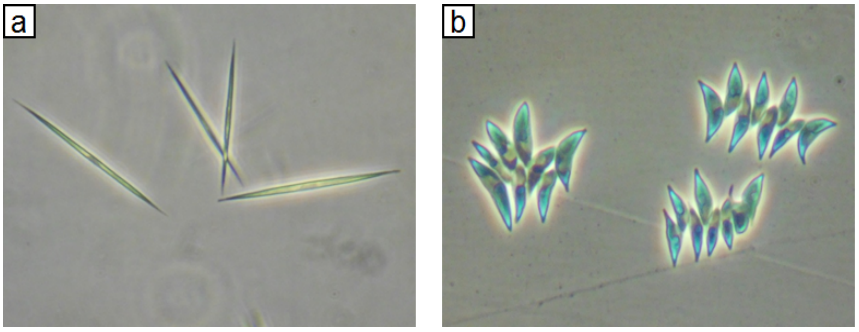


Figura 1. Microalgas verdes: (a) *A. falcatus* y (b) *S. incrassatulus.*
De elaboración propia.

Tabla 1. Composición del Medio Basal de Bold

Macronutrientes	mg L^{-1}	Micronutrientes	mg L^{-1}
$NaNO_3$	250	$ZnSO_4$-$7H_2O$	8.82
$CaCl_2$-$2H_2O$	25	$MnCl_2$-$4H_2O$	1.44
$MgSO_4$-$7H_2O$	75	MoO_3	0.71
K_2HPO_4	75	$CuSO_4$-$5H_2O$	1.57
KH_2PO_4	175	$Co(NO_3)_2$-$6H_2O$	0.49
NaCl	25		
H_2SO_4	1		
$FeSO_4$-$7H_2O$	4.98		
H_3BO_3	11.42		
KOH	3.1		
EDTA	50		

Tomado de Barsanti y Gualtieri, 2006

2.2. Colorante Rojo Congo

En la Fig. 2 se muestra la estructura del Rojo Congo. Su fórmula molecular es $C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$ y tiene un peso molecular es de 696.7 g mol^{-1}; este fue adquirido en *Sigma-Aldrich*®. Se trabajó con una solución stock de 500 mg L^{-1} en agua desionizada estéril a pH 7.0.

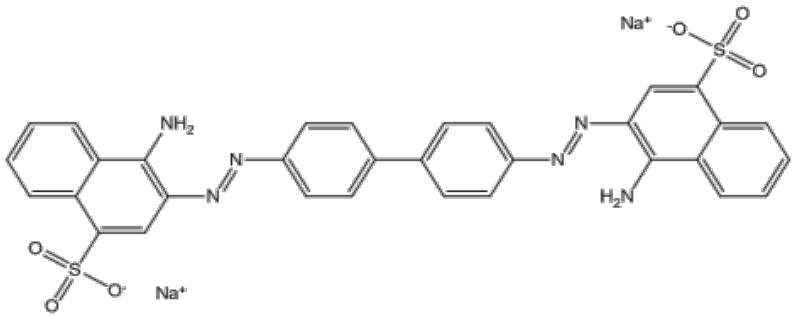


Figura 2. Estructura del colorante Rojo Congo. Tomado de May (2016)

2.3. Inhibición del crecimiento microalgal con Rojo Congo y determinación de la CI_{50}

Para determinar la inhibición del crecimiento de las microalgas ocasionada por la exposición del colorante, se siguió el protocolo 201 de la OECD (2011). Los experimentos se realizaron de manera independiente para cada microalga. En matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad se colocaron 15 mL de concentraciones iniciales de 4, 8, 16, 32 y 64 mg L^{-1} de Rojo Congo disuelto en medio Basal de Bold. A cada matraz se agregó un inóculo microalgal de $1x10^4$ células mL^{-1} y se incluyó un control de crecimiento microalgal sin colorante. Se emplearon 9 réplicas por tratamiento y las condiciones de incubación para las pruebas fueron: temperatura 25°C, iluminación continua de 120 PPFD, sin aireación. La incubación se realizó durante 96 h y se tomaron muestras cada 24 h para evaluar la densidad celular en cámara de Neubauer.

Las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) se determinaron mediante el método Probit con el software RA (Risk Hazard Assessment Tools), versión 1.0, con base en la densidad celular alcanzada a las 96 h de incubación.

2.4 Efecto del colorante sobre el contenido de macromoléculas, pigmentos fotosintéticos y morfología de las microalgas verdes

A partir de los valores de inhibición determinados con el software RA® se seleccionaron las concentraciones CI_{20}, CI_{30}, CI_{40}, CI_{50} y CI_{60} de Rojo Congo, que corresponden respectivamente a los valores de inhibición del crecimiento poblacional de 20, 30, 40, 50 y 60%. La evaluación de los efectos de estas concentraciones de Rojo Congo sobre las microalgas se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 175 mL de volumen de prueba, usando para la dilución y como control negativo el medio Basal de Bold. El inóculo inicial fue de $5x10^4$ células mL^{-1} y la incubación durante 96 h fue a 25°C, con iluminación de 120 PPFD y aireación constante.

La cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), lípidos (Hao *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2014), carbohidratos (Dubois *et al.*, 1956) y pigmentos fotosintéticos (Wellburn, 1994) en *A. falcatus* y *S. incrassatulus* se realizó después de 96 h de exposición al colorante. Las células se concentraron por centrifugación (4500 rpm, 5 min) y el paquete celular se lavó con medio Basal de Bold, repitiendo este proceso tres veces para eliminar el colorante posiblemente adherido extracelularmente.

La determinación de alteraciones morfológicas en las células expuestas se realizó mediante la observación en microscopio de contraste de fases Nikon ALPHAPHOT-2 YS2, haciendo una cuenta diferencial entre células con morfología típica y atípica en cada concentración de Rojo Congo. Adicionalmente, en *S. incrassatulus* se registró el número de células por cenobio.

2.5 Biorremoción del Rojo Congo con las microalgas *A. falcatus* y *S. incrassatulus*

Para evaluar la capacidad de las microalgas de biorremover el Rojo Congo, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, 175 mL de una suspensión inicial de $5x10^4$ células mL^{-1} adicionado con cinco concentraciones inhibitorias de Rojo Congo (CI_{20}, CI_{30}, CI_{40}, CI_{50}, CI_{60}). Cada tratamiento tuvo tres réplicas, que se incubaron 96 h a 25°C, con iluminación de 120 PPFD y aireación constante.

Cada 24 h se tomaron alícuotas de 750 µL para realizar el conteo celular en cámara de Neubauer. El Rojo Congo residual se determinó midiendo la absorbancia a 495 nm en un espectrofotómetro Thermo GENESYS 10UV del medio de prueba libre de células, que fueron separadas por filtración. La biorremoción se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \left[\frac{C_0 - C_f}{C_0}\right] \times 100$$

Dónde:

C_0 = concentración inicial de Rojo Congo

C_f = concentración final de Rojo Congo

2.5.1 Efecto de la variación en la cantidad de inóculo, concentración de colorante y tiempo de exposición en la biorremoción del Rojo Congo con *A. falcatus* y *S. incrassatulus*.

Con el objetivo de evaluar los efectos de la concentración del colorante y de la densidad celular sobre la capacidad de biorremoción, se repitió el experimento descrito en el apartado 2.5 empleando concentraciones más bajas de Rojo Congo (CI_1, $CI_{10,}$ CI_{20} y CI_{50}) y un inóculo algal 20 veces mayor ($1x10^6$ células mL^{-1}).

Así mismo, se realizó una tercera prueba de biorremoción en la que se evaluó, además del efecto de la concentración del colorante y de la densidad celular, el efecto del tiempo. Para ello se emplearon las concentraciones CI_1, $CI_{10,}$ y CI_{20} de Rojo Congo, inóculo inicial de $2x10^6$ células mL^{-1} y tiempo de incubación de 144 h.

2.5.2 Biorremoción del Rojo Congo con *A. falcatus* y *S. incrassatulus* en condiciones estáticas y con aireación

Este experimento de biorremoción se llevó a cabo en dos fases, para la primera se utilizó un inóculo inicial de $5x10^4$ células mL^{-1} y concentraciones de Rojo Congo equivalentes a CI_{20}, CI_{30}, CI_{40}, CI_{50} y CI_{60}; los experimentos se incubaron 96 h en aireación, seguido de 96 h sin suministro de aire.

La densidad celular se determinó por conteo en cámara de Neubauer y la absorbancia del colorante se midió a 495 nm. La eficiencia de biorremoción se cuantificó según lo descrito en el apartado 2.5.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía ($P < 0.05$), y en los casos procedentes, aplicando pruebas *post hoc* de Dunnett y Tukey para determinar diferencias con respecto al control y entre todos los tratamientos, respectivamente. Se utilizó el *software* SigmaPlot versión 11.0 y previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos mediante la prueba de F.

3. Resultados

3.1 Efecto del Rojo Congo sobre el crecimiento de *A. falcatus* y *S. incrassatulus*

El crecimiento poblacional de *A. falcatus* y *S. incrassatulus* expuestas a diferentes concentraciones de Rojo Congo se muestra en las Figs. 3a-3b. En los testigos el mayor número de células se alcanzó en *S. incrassatulus* (8.6 x 10^5 células mL^{-1}), mientras que en *A. falcatus* la densidad celular fue de 2.7 x 10^5 células mL^{-1}. En ambos casos la densidad celular fue inversamente proporcional a la concentración de Rojo Congo, además de que en todos los tratamientos el número de células fue significativamente menor al testigo ($P<0.05$).

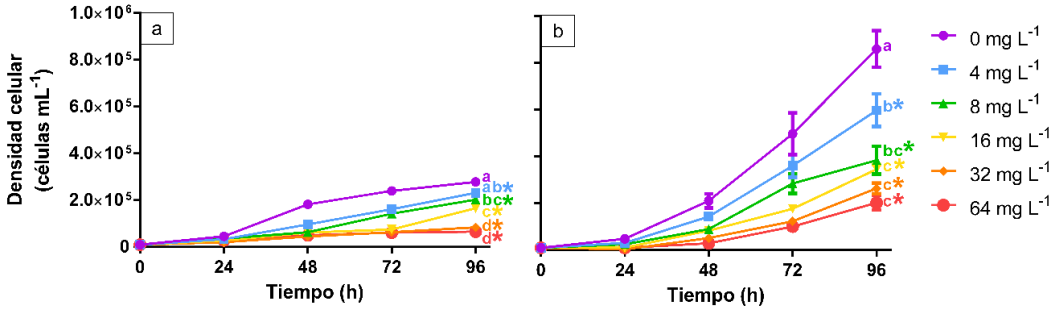


Figura 3. Efecto del Rojo Congo sobre la densidad celular de *A. falcatus* (a) y *S. incrassatulus* (b). Valores promedio ± error estándar (n = 9). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey para cada concentración de Rojo Congo. * Indican diferencias significativas ($P<0.05$) respecto al control mediante la prueba de Dunnett. De elaboración propia.

3.2 Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) de ambas microalgas

En la Fig. 4 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento de ambas microalgas a las 96 h de exposición al Rojo Congo. Los valores de CI_{50} determinados fueron de 19.25 mg L^{-1} (límites de confianza 95%: 16.05-23.33 mg L^{-1}) para *A. falcatus* y 9.27 mg L^{-1} (6.37-12.33 mg L^{-1}) para *S. incrassatulus*, de acuerdo con lo cual la especie más sensible es *S. incrassatulus*.

3.3 Efecto del Rojo Congo sobre el contenido de macromoléculas, pigmentos fotosintéticos y la morfología de las microalgas

En la concentración más alta de Rojo Congo (CI_{60}), la concentración total de carbohidratos y lípidos en *A. falcatus* (Figs. 5b-5c) aumentó 5 y 7 veces, respectivamente con respecto al control. Sin embargo, en *S. incrassatulus* (Figs. 5d-5f) no se observó variación significativa (P<0.05) en ninguna de las macromoléculas evaluadas (proteínas, carbohidratos y lípidos).

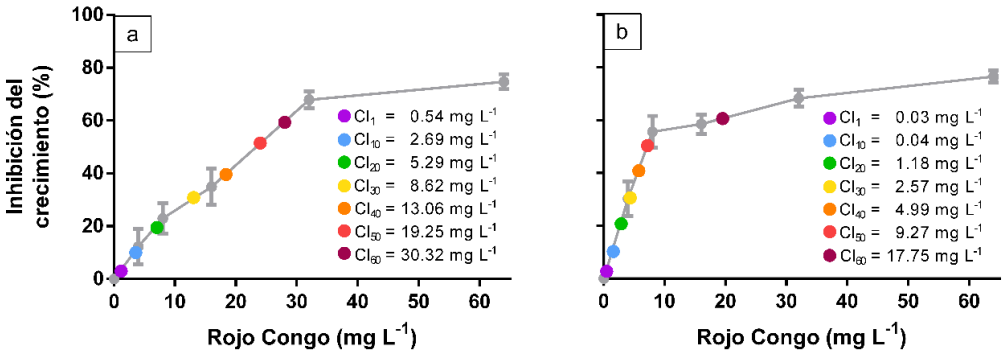


Figura 4. Inhibición del crecimiento microalgal en *A. falcatus* (a) y *S. incrassatulus* (b) con Rojo Congo. Valores promedio ± error estándar (n = 9). De elaboración propia.

En la Fig. 6 se aprecia que en ambas microalgas el aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos se da de manera proporcional a la concentración de Rojo Congo. No obstante, en *A. falcatus* se observó aumento significativo (P<0.05) de clorofila *a* y carotenoides (Figs. 6a y 6c) desde la CI_{30}, mientras que en el caso de la clorofila *b* (Fig. 6b) el incremento se observa a partir de la CI_{40}. En *S. incrassatulus* (Fig. 6d-6f) el aumento en los tres pigmentos cuantificados se da únicamente en la concentración más alta de Rojo Congo evaluada (CI_{60} = 17.75 mg L^{-1}).

En la Fig. 7 se muestran las principales alteraciones morfológicas observadas al microscopio en las microalgas expuestas a las concentraciones subinhibitorias de Rojo Congo. Se aprecia una célula típica (Fig. 7a) y células atípicas de *A. falcatus*

(Figura b-7o). En el caso de *S. incrassatulus* se registraron cenobios con células típicas (Figura p, 7q, 7t, 7v, 7x), cenobios con células atípicas (Figura r, 7s, 7u, 7w, 7y, 7ab, 7ac, 7ad, 7ae) y células individuales típicas y atípicas (Figura z y 7aa, respectivamente).

Con el registro de alteraciones morfológicas se elaboró la Figura , en la que se muestra que el número de células atípicas de *A. falcatus* no se relacionó con respecto a la concentración de colorante (Fig. 8a); por el contrario, en *S. incrassatulus* (Fig. 8b) el número de cenobios atípicos aumentó de manera proporcional a la concentración de colorante.

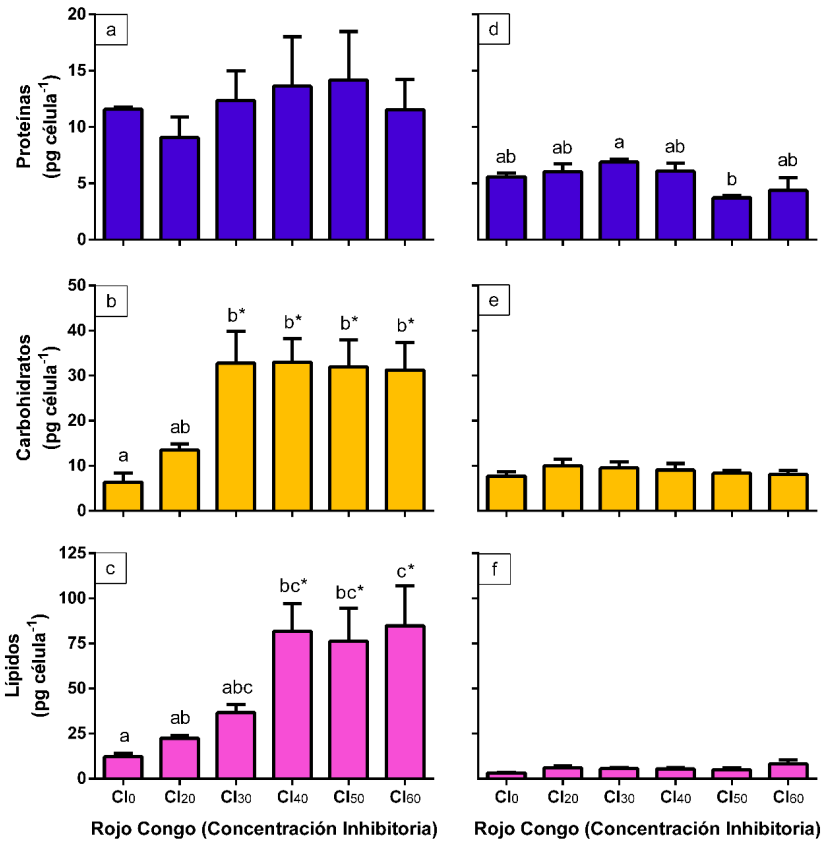


Figura 5. Efecto del Rojo Congo sobre la concentración total de proteínas, carbohidratos y lípidos en *A. falcatus* (a, b, c) y *S. Incrassatulus* (d, e, f). Valores promedio ± error estándar (n = 6). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey para cada tipo de macromolécula. *Indican diferencias significativas ($P<0.05$) respecto al control mediante la prueba de Dunnett. De elaboración propia.

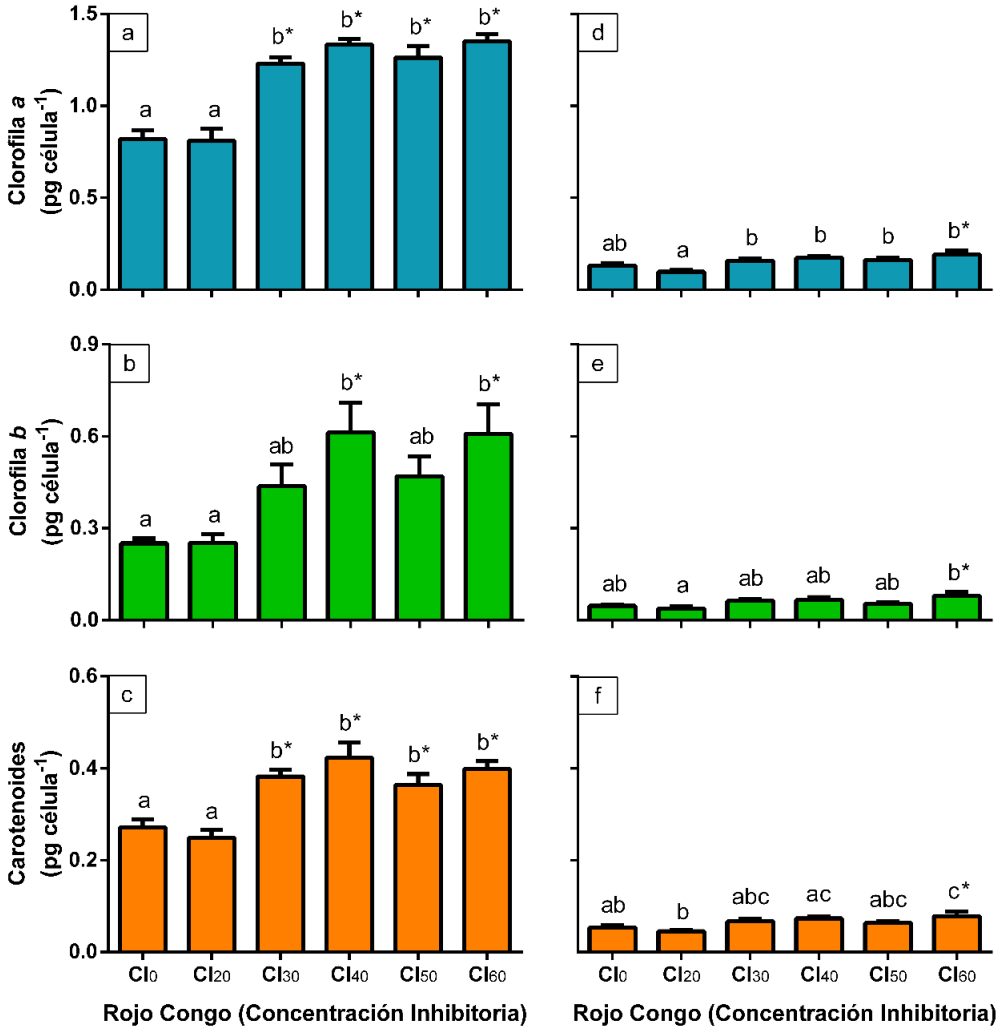


Figura 6. Efecto del Rojo Congo sobre la concentración total de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) en *A. falcatus* (a, b, c) y *S. Incrassatulus* (d, e, f). Valores promedio ± error estándar (n = 6). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P<0.05$) de acuerdo a la prueba de Tukey para cada tipo de pigmento. *Indican diferencias significativas ($P<0.05$) respecto al control mediante la prueba de Dunnett. De elaboración propia.

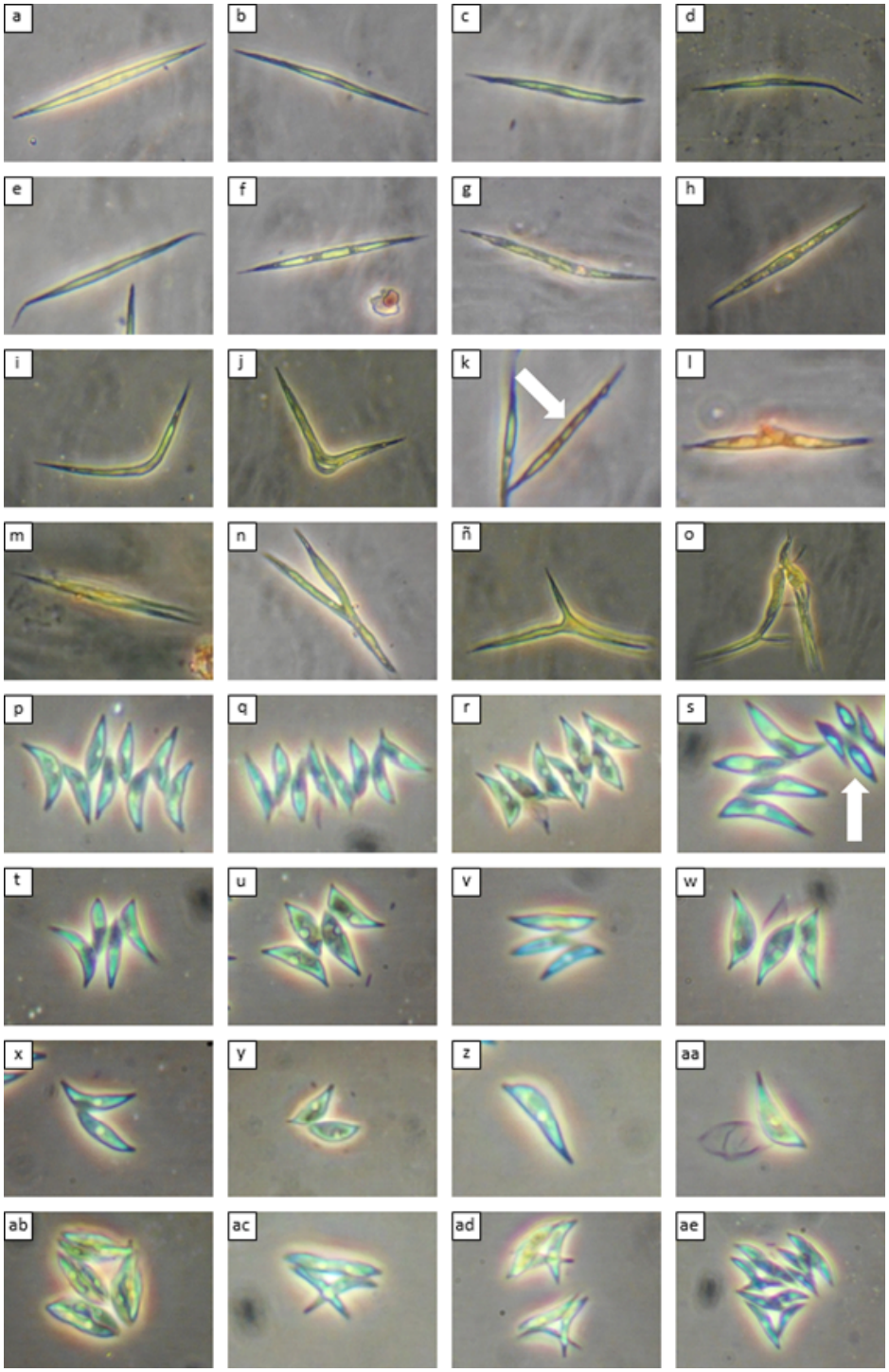


Figura 7. Alteraciones morfológicas por exposición al Rojo Congo en *A. falcatus* (a-o) y en *S. incrassatulus* (p-ae). De elaboración propia.

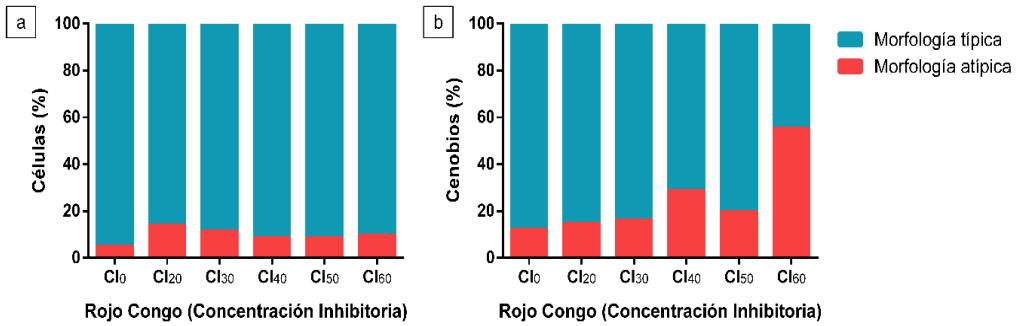


Figura 8. Efecto del Rojo Congo sobre la aparición de formas típicas y atípicas en *A. falcatus* (a) y *S. incrassatulus* (b). Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

En *S. incrassatulus* el número de células por cenobio permite identificar alteraciones ocasionadas por estrés químico, como la exposición al Rojo Congo. En la Fig. 9 se observa que en condiciones normales *S. incrassatulus* se desarrolla dominantemente como cenobios de 4 y 8 células (45 y 25%, respectivamente), pero al aumentar la concentración de Rojo Congo el número células por cenobio se reduce. Para la concentración más alta de colorante (CI_{60}) los cenobios predominantes fueron los de dos células (62%).

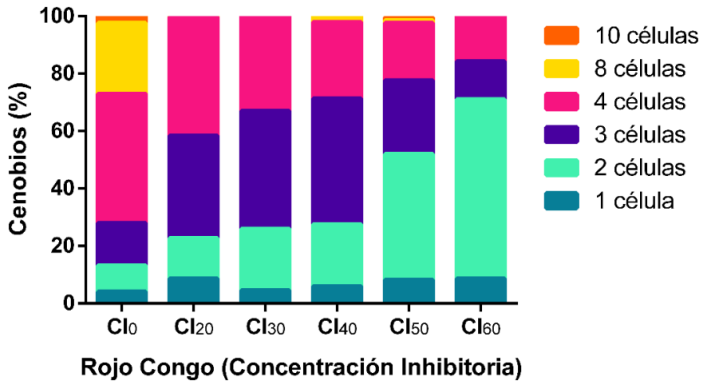


Figura 9. Efecto del Rojo Congo sobre el número de células por cenobios en *S. incrassatulus*. Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

3.4 Biorremoción de Rojo Congo con *A. falcatus* y *S. incrassatulus* con inóculo de $5x10^4$ células mL^{-1}

En la Fig. 10 se muestra la relación entra la concentración de Rojo Congo (mg L^{-1}) y la absorbancia a 495 nm así como el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta a partir de la cual se calcularon las concentraciones residuales de Rojo Congo en las pruebas de biorremoción.

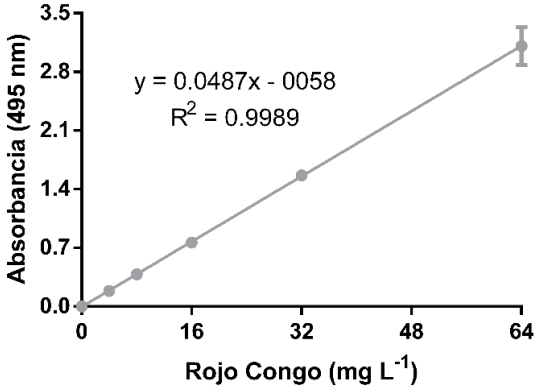


Figura 10. Relación entre la concentración de Rojo Congo y la absorbancia a 495 nm. Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

En la Fig. 11 se muestra la densidad celular de ambas microalgas y la absorbancia del Rojo Congo a 495 nm durante la prueba de biorremoción al utilizar un inóculo de $5x10^4$ células mL^{-1}. De manera general se observa que la densidad celular de ambas especies disminuye al aumentar la concentración de colorante; sin embargo, el crecimiento celular de *S. incrassatulus* fue mayor en comparación con *A. falcatus*. Las Figs. 11b y 11d muestran que la concentración del Rojo Congo se mantuvo constante durante las 96 h, lo que indica que el porcentaje de biorremoción del colorante fue de cero.

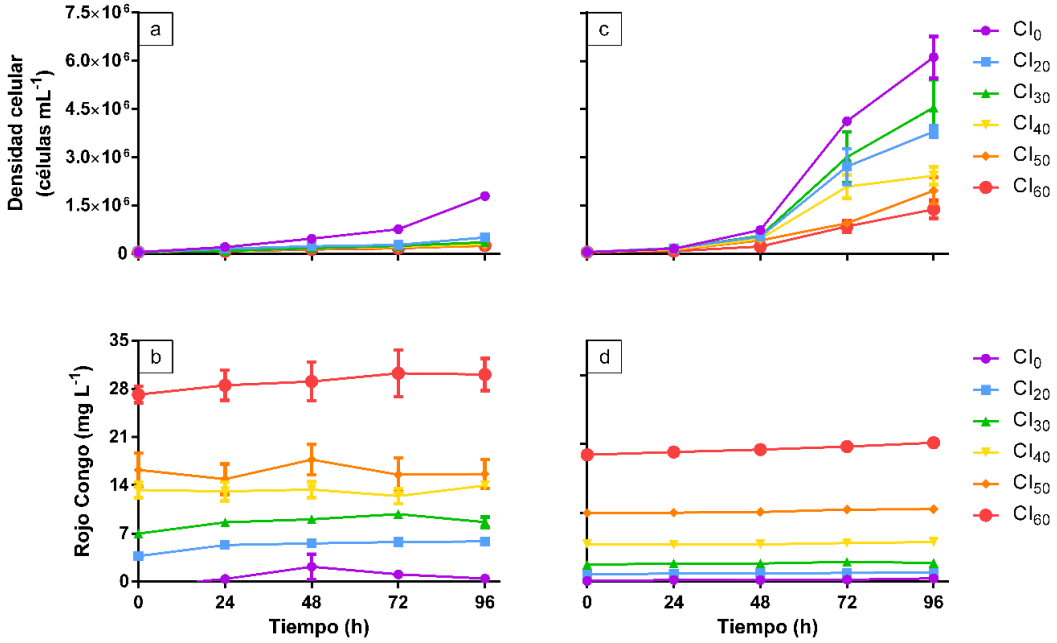


Figura 11. Efecto del colorante Rojo Congo en el crecimiento y durante el proceso de biorremoción con *A. falcatus* (a, b) y *S. incrassatulus* (c, d). Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

3.4.1 Efecto de la variación en la cantidad de inóculo, concentración de colorante y tiempo de exposición en la biorremoción del Rojo Congo con *A. falcatus* y *S. incrassatulus*

En las Figs. 12a-12c se observa que el crecimiento celular de ambas microalgas decrece conforme la concentración del Rojo Congo se incrementa; no obstante, la densidad celular en *A. falcatus* es mayor respecto a *S. incrassatulus*. También se observa que al utilizar un inóculo inicial de $1x10^6$ células mL^{-1} y concentraciones menores de Rojo Congo, el porcentaje de biorremoción fue nulo para ambas clorofíceas (Figs. 12b-12d).

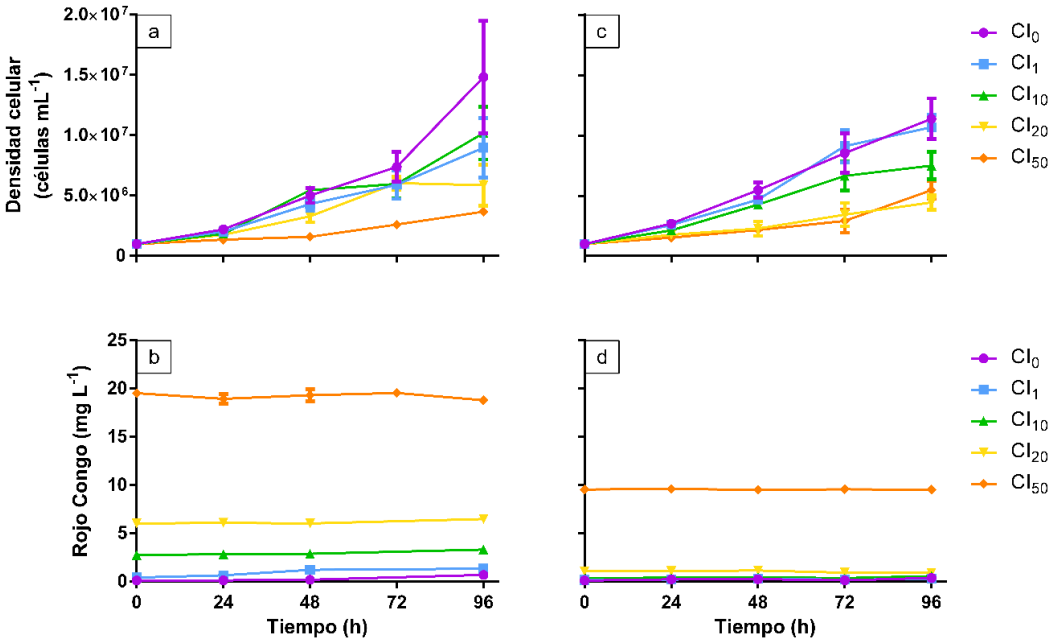


Figura 12. Efecto del colorante Rojo Congo en el crecimiento y durante el proceso de biorremoción con *A. falcatus* (a, b) y *S. incrassatulus* (c, d) al variar el inóculo y la concentración de colorante. Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

El crecimiento poblacional en ambas microalgas decreció al aumentar la concentración de Rojo Congo (Figs. 13a-13c); sin embargo, *A. falcatus* presentó mayor crecimiento que *S. incrassatulus*. Según lo mostrado en las Figs. 13b-13d no hubo biorremoción del colorante al aumentar el tiempo de exposición de 96 a 144 h, cambiar el inóculo inicial de $1x10^6$ a $2x10^6$ células mL^{-1} ni manteniendo las concentraciones más bajas de colorante en *A. falcatus* y *S. incrassatulus*.

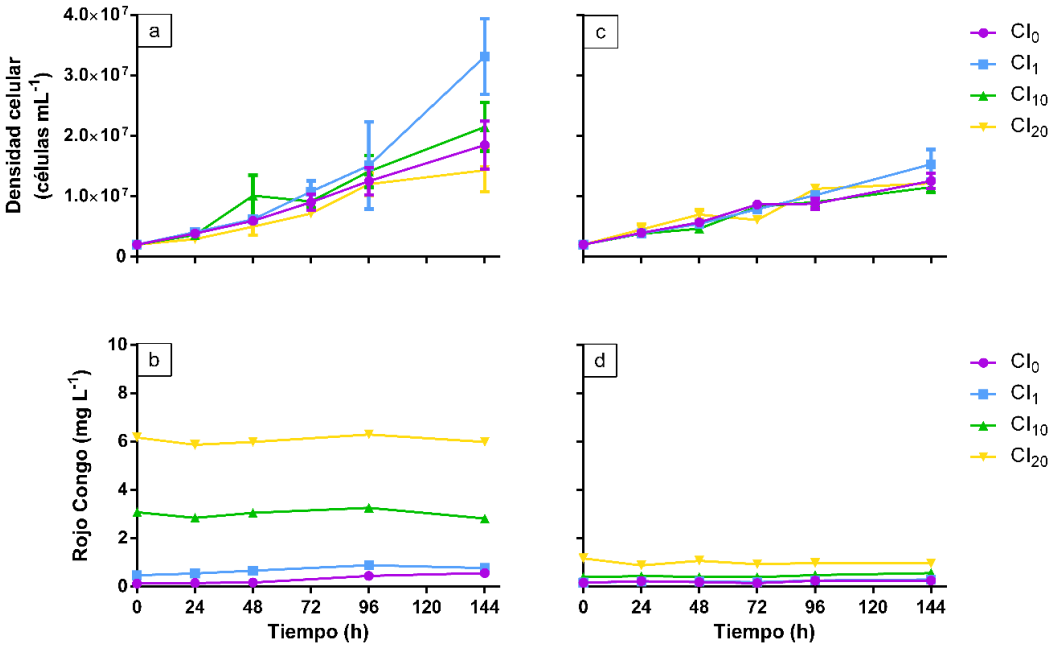


Figura 13. Efecto del colorante Rojo Congo en el crecimiento y durante el proceso de biorremoción con *A. falcatus* (a, b) y *S. incrassatulus* (c, d) al variar el inóculo y el tiempo de exposición. Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

3.4.3 Biorremoción del Rojo Congo con *A. falcatus* y *S. incrassatulus* en condiciones estáticas y con aireación

En la Fig. 14 se presentan los resultados de la prueba de biorremoción realizada en dos fases: aireación y estática. En las Figs. 14a-14c se observó como el número de células aumenta rápidamente al airear el cultivo; en cambio, al retirar la aireación el crecimiento poblacional se reduce al mínimo en ambas microalgas, aunque esto sólo se determinó por apreciación visual.

Con *A. falcatus* no se observó la biorremoción del colorante (Fig. 14b); no obstante en *S. incrassatulus* (Fig. 14d) sí se registró la disminución de la concentración del Rojo Congo en la fase estática de los tratamientos. Para esta microalga el tratamiento con mayor biorremoción fue $CI_{40,}$ seguido de CI_{50}, CI_{20} y $CI_{30,}$ con biorremociones de 38.48 ± 5.08, 34.78 ± 5.4, 23.59 ± 8.48 y 20.7 ± 7.51%, respectivamente; la menor remoción se registró en CI_{60}, con un valor de 2.47 ± 1.08%.

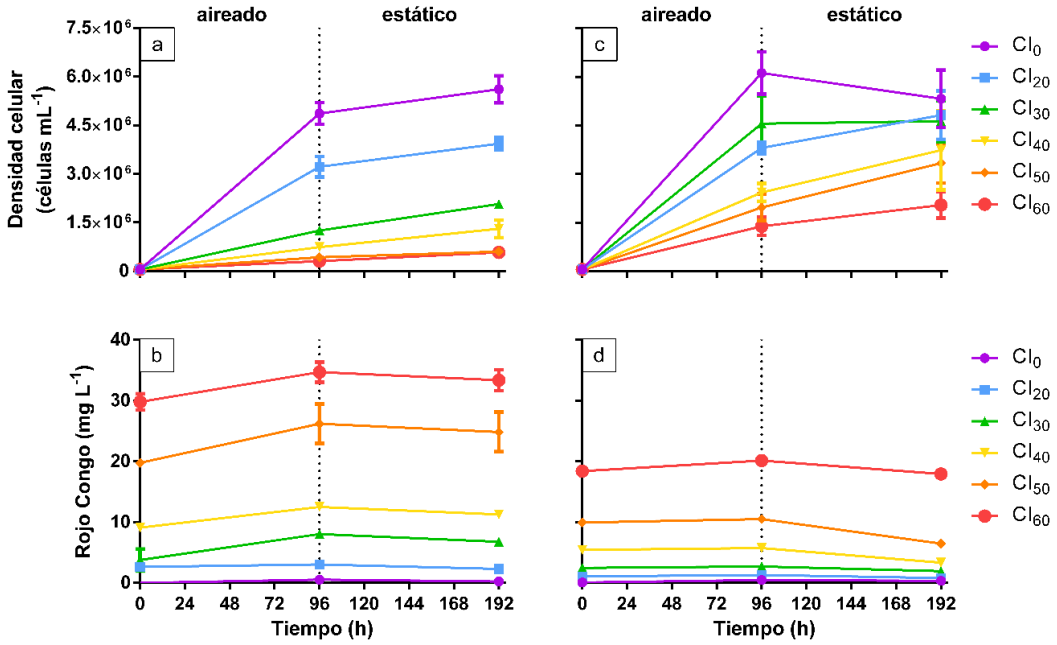


Figura 14. Efecto del colorante Rojo Congo en el crecimiento y durante el proceso de biorremoción con *A. falcatus* (a, b) y *S. incrassatulus* (c, d) utilizando el medio con aireación y estático. Valores promedio ± error estándar (n = 3). De elaboración propia.

4. Discusión

La disminución en el crecimiento algal observada en la Fig. 3 se debe a los efectos tóxicos del colorante, y esto confirma efectos negativos que pueden presentarse en el ambiente acuático, destacando la reducción en la penetración de luz en el medio, cambio en la calidad de la luz, posible alteración de la solubilidad de gases, así como los efectos dañinos producidos por el estrés químico (Sedlak, 2011; Pereira y Alves, 2012; Holkar *et al.*, 2016). Con respecto a la microalga *C. vulgaris*, se observó el mismo efecto inhibitorio sobre el crecimiento después de 96 h de exposición con el Rojo Congo (Hernández-Zamora *et al.*, 2014).

Según el valor de la Concentración Inhibitoria Media (Fig. 4), *S. incrassatulus* es dos veces más sensible a la exposición con Rojo Congo que *A. falcatus*. Se ha reportado la toxicidad del Rojo Congo en otras microalgas, por ejemplo *R. subcapitata* y *C. vulgaris* presentaron una CI_{50} de 4.8 y 5.19 mg L^{-1}, respectivamente (Novotný *et al.*, 2006; Hernández-Zamora *et al.*, 2016). Cabe mencionar que la sensibilidad de un organismo a un determinado compuesto depende tanto del metabolismo como de la estructura química; así, por ejemplo, *Scenedesmus* sp. es más sensible al glifosato que *C. vulgaris* sin embargo esta última presenta mayor sensibilidad al metil paratión, metamidofos y diazinón (Riva *et al.*, 1998).

El aumento en la concentración de carbohidratos puede deberse a la acumulación de fotosintatos que ocurre en algunas especies de microalgas en condiciones de estrés (Priyadarshani *et al.*, 2011). Hay varios factores que aumentan el contenido de carbohidratos en las microalgas; los más conocidos son la deficiencia de macronutrientes, modificación de la iluminación, variación de la temperatura hacia los límites de tolerancia, estrés salino y también interviene el tipo de nutrición de la especie (autótrofa, heterótrofa o mixótrofa) (Markou *et al.*, 2012).

La producción y acumulación de lipídos en las microalgas puede, en algunos casos, representar un mecanismo de detoxificación pues se sabe que estos acumulan sustancias tóxicas, particularmente aquellas de baja hidrosolubilidad (Asserlborn *et al.*, 2015). En especial *A. falcatus* es una especie empleada en la industria por su capacidad de acumular concentraciones significativas de lípidos en condiciones de estrés ambiental (Álvarez-Díaz *et al.*, 2014).

Ambas microalgas estudiadas fueron más afectadas en las mayores concentraciones de Rojo Congo; sin embargo, con base en las variaciones macromoleculares, *A. falcatus* aparentemente fue más sensible a la exposición al colorante debido a que los carbohidratos se vieron aumentados significativamente desde la CI_{30} y los lípidos desde la CI_{40}, mientras que *S. incrassatulus* no presentó alteración alguna.

En la Fig. 6 se muestra el aumento en la concentración de clorofilas y carotenoides de las microalgas expuestas al Rojo Congo. De acuerdo a la variación de pigmentos fotosintéticos, la especie más sensible fue *A. falcatus* pues la clorofila *a* (Fig. 6a) y los carotenoides (Fig. 6c) aumentaron significativamente desde la CI_{30}, mientras que la clorofila *b* (Fig. 6b) se incrementó a partir de la CI_{40}; en cambio, *S. incrassatulus* solo mostró aumento significativo de pigmentos fotosintéticos en la concentración más alta del colorante (Figs. 6d-6f). De manera similar Olaru *et al.* (2016) demostraron que este colorante aumenta la síntesis de clorofila *b*. Los carotenoides son compuestos con reconocida actividad antioxidante, pudiendo incrementarse su concentración hasta doce veces en condiciones de estrés químico (Lv *et al.*, 2016); se tiene documentado el aumento en la concentración de carotenoides de la microalga *Haematococcus. pluvialis* por acción de colorantes, como el azul de metileno, y de compuestos azoicos, como el AAPH (Yu *et al.*, 2015). El Rojo Congo aumenta la producción de carotenoides no solo en las microalgas evaluadas, sino también en *Lemna minor* (Olaru *et al.*, 2016), como posible mecanismo de resistencia a la toxicidad del colorante.

Entre los principales efectos morfológicos (Fig. 7) observados en *A. falcatus* se encuentran: adelgazamiento celular, extremos curveados, disgregación del citoplasma y formas no aciculares. La morfología característica de *A. falcatus* se altera dependiendo de las condiciones de cultivo, por ejemplo, George *et al.*, (2014) describieron en esta especie la presencia de células deformes con alto contenido de carbohidratos y lípidos en medio Zarrouk, así como la aparición de células de tamaño reducido ante la deficiencia de luz. Por otro lado, Asselborn *et*

al., (2015) mencionan que el insecticida clorpirifos reduce el biovolumen de *Ankistrodesmus gracilis* además de favorecer la acumulación de lípidos y almidón.

Para el caso de *S. incrassatulus* el tipo de alteración morfológica se relacionó con la concentración de Rojo Congo; a bajas concentraciones (CI_{20} – CI_{50}) predominaron las células hipertróficas con coloración atípica, mientras que en las más altas (CI_{50} – CI_{60}) abundaron las células hipotróficas. De manera similar, Apandi *et al.* (2017) encontraron una variación en el tamaño celular de *Scenedesmus* sp al exponerla a residuos industriales; a bajas concentraciones osbervaron células de mayor tamaño en comparación con el testigo, mientras que las células fueron de menor talla al aumentar la concentración de los desechos.

Con base en la morfología observada, se realizó una cuenta diferencial para cuantificar el porcentaje de células atípicas para *A. falcatus* y *S. incrassatulus*, expuestas a las concentraciones inhibitorias de Rojo Congo ensayadas (Figs. 8a-8b). En los testigos sin colorante de ambas especies se registraron también formas atípicas; sin embargo, el porcentaje de éstas aumentó por la exposición al colorante. *A. falcatus* presentó el mayor porcentaje de células atípicas en la menor concentración (CI_{20}), por el contrario, en *S. incrassatulus* el porcentaje de células atípicas se incrementó conforme aumentó la concentración de Rojo Congo.

Otra forma de evaluar los efectos tóxicos de una sustancia sobre *Scenedesmus* es a través de su plasticidad fenotípica; este término hace referencia a la capacidad genética de un organismo (principalmente vegetal) de acondicionarse morfológica y fisiológicamente a las condiciones ambientales a las que está sometido modificando su morfología (Palacio-López, 2007). En este sentido la cantidad de células por cenobio permite observar más claramente el grado de afectación por un estresor químico, como lo es el Rojo Congo. Se aprecia que en condiciones normales *S. incrassatulus* (Fig. 9) se encuentra formando principalmente cenobios de 4 y 8 células, además de presentar un 2.3% de cenobios formados por 10 células. De manera general en la Fig. 9 se observa que al aumentar la concentración de Rojo Congo el promedio de células por cenobio disminuye, encontrándose en un mayor porcentaje cenobios de dos células. Peña-Castro *et al*. (2004) demostraron que *S. incrassatulus* presenta una morfología específica por efecto de agentes estresantes; por ejemplo el Cu^{+2} inducía la aparición de células individuales mientras que el Cr^{+6} de cenobios atípicos de cuatro células.

Entre los principales factores que afectan el proceso de biorremoción se encuentran la concentración inicial celular, la concentración del colorante, el tiempo de exposición y la especie empleada. A mayor cantidad de adsorbente o densidad celular, mayor el número de sitios de adsorción y superficie de contacto lo cual aumenta la interacción colorante-alga y favorece el proceso de biorremoción. Se evaluaron densidades celulares iniciales desde $5x10^4$ hasta $2x10^6$ células mL^{-1} (Figs. 11, 12 y 13); no obstante, en ninguna se presentó biorremoción pese a existir

reportes de biorremoción de colorantes con inóculos microalgales incluso menores a los utilizados en este proyecto ($2x10^4$ células mL^{-1}) (El-Sheekh *et al.*, 2009).

Concentraciones elevadas de colorante inhiben el crecimiento de las microalgas, así como su capacidad de biorremoverlos. Mahalakshmi *et al.* (2015) encontraron que las microalgas presentan una capacidad máxima de biorremoción entre 2 y 15 mg L^{-1} de Rojo Congo, y *Chlorella vulgaris* fue capaz de biorremoverlo aún a 25 mg L^{-1} (Hernández-Zamora *et al.*, 2015). Varias de las concentraciones de Rojo Congo evaluadas en este proyecto (0.03 – 30.32 mg L^{-1}) (Figs. 11, 12, 13 y 14) se ubicaban dentro de los intervalos en los que se ha evidenciado biorremoción con otras especies. Estas concentraciones se determinaron con el fin de no afectar severamente el crecimiento poblacional de las microalgas; sin embargo, en ningún tratamiento se evidenció el fenómeno de biorremoción.

La biorremoción también se favorece al aumentar el tiempo de exposición, aunque la mayor eficiencia suele darse entre las 48 y 96 h, a partir de las cuales la biorremoción aumenta poco o es nula (El-Sheekh *et al.*, 2009; Hernández-Zamora *et al.*, 2014; Mahalakshmi *et al.*, 2015); sin embargo, no se observó biorremoción del Rojo Congo ni siquiera al llevar la incubación hasta 144 h.

La aireación juega un papel importante sobre la biorremoción dependiendo del tipo de microorganismos y del compuesto químico; por ejemplo, en bacterias se ha logrado la degradación del Rojo Congo tanto en condiciones anóxicas como en óxicas, sin embargo la primera suele dar mejores rendimientos (Kolekar *et al.*, 2008). En cambio con hongos de pudrición parda, como *Aspergillus. flavus*, *A. terreus*, *Alternaria* spp. y *Penicillium* spp., se obtuvieron mejores resultados al crecer en agitación. Para el caso de las microalgas, hay especies capaces de biorremover el Rojo Congo en condiciones de aireación (Mahalakshmi *et al.*, 2015; Hernández-Zamora *et al.*, 2018); no obstante, Jinqi y Hountian (1992) demostraron que la deficiencia de carbono y nitrógeno en los cultivos microalgales aumenta el porcentaje de biorremoción de colorantes azoicos.

Los compuestos azoicos se degradan principalmente por acción de las azoreductasas, enzimas que rompen el doble enlace entre los nitrógenos del grupo azo, cuya actividad puede verse inhibida en presencia de oxígeno al competir como aceptor final de electrones (Kolekar *et al.*, 2008; Satheesh-Babu *et al.*, 2015).

Las microalgas pueden biorremover colorantes por biodegradación, biosorción o ambos. La biodegradación se lleva a cabo gracias a la inducción a la síntesis de azorreductasas, enzimas que descomponen los colorantes en aminas aromáticas; no obstante, también hay enzimas oxidativas inespecíficas que pueden llevar esto a cabo. La eficiencia depende de la especie algal y la estructura del colorante (Solís *et al.*, 2012).

Son varias las microalgas que producen azorreductasas; entre ellas destaca el género *Scenedesmus* cuyas enzimas se inducen ante la presencia de colorantes azo (Jinqi y Hountian, 1992; Solís *et al.*, 2012). Por lo tanto, inducir previamente la

síntesis de azorreductasas microalgales a través de exposiciones prolongadas al colorante, además de trabajar con medios carentes de oxígeno y de fuentes de carbono, permitiría obtener rendimientos mayores de biorremoción, tal y como se demostró en la Fig. 14, donde la fase aireada permite la aclimatación de *S. incrassatulus* al Rojo Congo permitiendo que en la fase estática se lleve a cabo la biorremoción del colorante. Esto podría interpretarse como que *S incrassatulus* estaría empleando al Rojo Congo como fuente de carbono ante la disminución de la fuente inorgánica (CO_2) que se proporciona durante la aireación. Adicionalmente, la posible deficiencia de oxígeno favorecería la acción de las azorreductasas, aunque es necesario hacer ensayos adicionales para comprobar la expresión e inducción de estas enzimas y la degradación del colorante por acción directa de la microalga.

Si bien la biorremoción se ve afectada por diversos factores físicoquímicos, la eficiencia de biorremoción depende en gran medida de la microalga seleccionada, pues el metabolismo y la estructura de cada especie les confieren propiedades y rendimientos únicos. La organización celular, la composición de la membrana, la pared celular, la presencia de exopolisacáridos, la maquinaria enzimática y los mecanismos de resistencia, tolerancia y desintoxicación permiten que cada microalga presente una determinada sensibilidad hacia un compuesto dado, así como la capacidad de biorremoverlo. También es necesario señalar que la biorremoción implica resistencia al colorante y el posible desarrollo de mecanismos de destoxicación o de aprovechamiento del compuesto como sustrato para el crecimiento celular. En el estudio realizado se evidenciaron efectos tóxicos del Rojo Congo, así como la biorremoción bajo algunas condiciones de manejo del cultivo.

5. Conclusiones

Los efectos en la morfología, concentración total de proteínas, lípidos, carbohidratos, clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides demuestran la toxicidad del colorante azo Rojo Congo sobre productores primarios, permitiendo inferir el impacto sobre la estructura trófica en ecosistemas dulceacuícolas.

La resistencia de las microalgas a la presencia del Rojo Congo no tiene relación con su capacidad de biorremoción, debido a que *S. incrassatulus* a pesar de ser la especie más sensible biorremovió el colorante.

De las variables involucradas en la biorremoción, la aireación resultó ser la más importante para *S. incrassatulus* pues únicamente disminuyó la absorbancia del Rojo Congo en cultivos mixtos aireados-estáticos presentando rendimientos de 38.48 ± 5.08%.

Agradecimientos

Agradecemos al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico proporcionado a A. A. Chávez-Vargas a través de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI), y al programa de asistentes de investigación del CONACYT-SNI.

7. Referencias

Ali, H. (2010). Biodegradation of synthetic dyes - a review. Water, Air, & Soil Pollution, *213*, 251-273.

Álvarez-Díaz, P. D.; Ruiz, J.; Arbib; Z.; Barragán, J.; Garrido-Pérez, C.; Perales, J. A. (2014). Lipid production of microalga *Ankistrodesmus falcatus* increased by nutrient and light starvation in a two-stage cultivation process. Applied Biochemistry and Biotechnology, *174*, 1471-1483.

Apandi, N. M.; Mohamed, R. M. S. R.; Latiffi, N. A. A.; Rozlan, N. F. M.; Al-Gheethi, A. A. S. (2017). Protein and lipid content of microalgae *Scenedesmus* sp. biomass grown in wet market wastewater. MATEC Web of Conferences, *103*, 06011.

Asselborn. V.; Fernández, C.; Zalocar, Y.; Parodi, E. R. (2015). Effects of chlorypyrifos on the growth and ultrastructure of green algae, *Ankistrodesmus gracilis. 120*, 334-341.

Barsanti, L.; Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Florida, Estados Unidos: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Brahmbhatt, N. H.; Jasrai, R. T. (2013). Biodegradation of reactive dyes by two microalgal species. International Journal of Science and Research, *4*(5), 1697-1702.

Bubaez. K.; Choina, J.; Dolat, D.; Morawski, A. W. (2010). Methylene blue and phenol photocatalylic degradation on nanoparticles of anastase TiO_2. Polish Journal of Environmental Studies, *19*(4), 685-691.

CEMDA. (2006). *El agua en México: lo que todas y todos debemos saber*. Distrito Federal: Fondo para la Comunicación y la Educación Ambiental, A. C.

CONAGUA. (2018). *Estadísticas del agua en México*. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, *28*(3), 350-356.

El-Sheekh, M. M.; Gharieb, M. M.; Abou-El-Souod, G. W. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. International Biodeterioration & Biodegradation, *63*, 699-704.

George, B.; Pancha, I.; Desai, C.; Chokshi, K.; Paliwal, C.; Ghosh, T.; Mishra, S. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – a potential strain for bio-fuel production. Bioresource Technology, *171*, 367-374

Hao, Z.; Liu, P.; Yang, X.; Shi, J.; Zhang, S. (2013). Screening method for lipid-content microalgae based on sulpho-phospho-vainillin reaction. Advanced Materials Research, *610-613*, 3532-3535.

Hashem, A.; Ahmad, F.; Badawy, S. M. (2015). Adsorption of direct green 26 onto fix 3500 treated sawdust: equilibrium, kinetic and isotherms. Desalination and Water Treatment, 1-13.

He, N.; Sun, X.; Zhong, Y.; Sun, K.; Liu, W.; Duan, S. (2016). Removal and biodegradation of nonylphenol by four freshwater microalgae. International Journal of Environmental Research and Public Health, *13*(1239).

Hernández-Zamora, M.; Cristiani-Urbina, E.; Martínez-Jerónimo, F.; Perales-Vela, H. V.; Ponce-Noyola, T.; Montes-Horcasitas, M. D.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2015). Bioremoval of the azo dye congo red by the microalga *Chlorella vulgaris*. Environmental Science and Pollution Research, *22*, 10811-10823.

Hernández-Zamora, M.; Martínez-Jerónimo, F.; Cristiani-Urbina, E.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2016). Congo red dye affects survival and reproduction in the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Effects of direct and dietary exposure. Ecotoxicology, *25*(10), 1832-1840.

Hernández-Zamora, M.; Perales-Vela, H. V.; Flores-Órtiz, C. M.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2014). Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to congo red. Ecotoxicology and Environmental Safety, *108*, 72-77.

Holkar, C. R.; Jadhav, A. J.; Pinjari, D. V.; Mahamuni, N. M.; Pandit, A. B. (2016). A

critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. Journal of Environmental Management, *182*, 351-366.

Jinqi, L.; Hountian, L. (1992). Degradation of azo dyes by algae. Environmental Pollution, *75*, 273-278.

Kandelbauer, A.; Guebitz, G. M. (2005). "Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review", en E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer y D. Robert, (2005), *Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems* (269-288). Berlín: Springer.

Kolekar, Y. M.; Pawar, S. P.; Gawai, K. R.; Lokhande, P. D. (2008). Decolorization and degradation of disperse blue 79 and acid orange 10, by Bacillus fusiformis KMK5 isolated from the textile dye contaminated soil. Bioresource Technology, *99*, 8999-9003.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Lewis, F. A.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, *193*(1), 265-275.

Lv, H.; Cui, X.; Wahid, F.; Xia, F.; Zhong, C.; Jia, S. (2016). Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation. PloS ONE *11*(3).

Mahalakshmi, S.; Lakshmi, D.; Meneaga, U. (2015). Biodegradation of different concentration of dye (congo red dye) by using green and blue algae. International Journal of Environmental Research, *9*(2), 735-744.

Markou, G.; Angelidaki, I.; Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. Applied Microbiology & Biotechnology, *96*(3), 631-645.

Martínez-Tristán, A. (2012). Biosorción del colorante rojo congo en sistemas en lote utilizando biomasa de *Chlorella* sp (Tesis). México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

May, P. (2016). "Molecule of the Month" [en línea], disponible en http://www.chm.bris.ac.uk

Mishra, S. K.; Suh, W. I.; Farooq, W.; Moon, M.; Shrivastav, A.; Park, M. S.; Yang, J.-

W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. Bioresource Technology, *155*, 330-333.

Novontý, Č.; Dias, N.; Kapanen, A.; Malachová, K.; Vándrovcová, M.; Itävaara, M.; Lima, N. (2006). Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. Chemosphere, *63*, 1436-1442.

OECD. (2011). "Test No. 201: freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test", en OECD (2011), *OECD Guidelines for testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems*. OECD publishing.

Olaru, S. M.; Lobiuc, A.; Hancu, E.-I.; Costica, N.; Ivanescu, L.; Zamfirache, M.-M. (2016). Toxicity assessment of congo red azo dye towards *Lemna minor L*.

Omar, H. H. (2008). Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. Pakistan Journal of Biological Sciencies, *11*(10), 1310-1316.

Patil, H. S. (1991). The role of *Ankistrodesmus falcatus* and *Scenedesmus quadricauda* in sewage purification. Bioresource Technology, *37*, 121-126.

Pedrozo-Martínez, R. G. (2015). Remoción de índigo carmín a partir de carbón activado obtenido de neumáticos usados (Tesis). Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana.

Peña-Castro, J. M.; Martínez-Jerónimo, F.; Esparza-García, F.; Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. Chemosphere, *57*, 1629-1636.

Pereira, L.; Alves, M. (2012). "Dyes - environmental impact and remediation", en A. Malik y E. Grohmann (2012), *Environmental protection strategies for sustainable development: strategies for sustainability*. Dordrecht: Springer Science; Business Media B.V.

Priyadarshani, I.; Sahu, D.; Rath, B. (2011). Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. Journal of Biochemical Technology, *3*(3), 299-304.

Riva, M. C.; López, D.; Fabián, L. (1998). Toxicidad de plaguicidas organofosforados en microalgas acuáticas. Boletín Intexter (U.P.C), *113*, 25-29.

Qu, Y.; Shen, W.; Pei, X.; Ma, F.; You, S.; Li, S. ; Zhou, J. (2017). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Trichoderma* sp. WL-Go for azo dyes decolorization. Journal of Environmental Sciences, *58*, 79-86.

Sabnis, R. W. (2007). *Handbook of acid-base indicators*. USA: CRC Press.

Santos, S. C.; Bonaventura R. A. (2016). Adsorption of cationic and anionic azo dyes on sepiolite clay: equilibrium and kinetic studies in batch mode. Journal of Environmental Chemical Engineering, *4*(2), 1473-1483.

Satheesh-Babu, S.; Mohandass, C.; Vijayaraj, A. S.; Dhale, M. A. (2015). Detoxification and color removal of congo red by a novel *Dietzia* sp. (DTS26) - a microcosm approach. Ecotoxicology and Environmental Safety, *114*, 52-60.

Sedlak, D. (2011). Documento / Manual de química (Apéndice F), en AFIRM Manual para proveedores. AFIRM Group.

Solís, M.; Solís, A.; Péres, H. I.; Manjarrez, N.; Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. Process Biotechnology, *47*, 1723-1748.

Tuesta, E. G.; Vivas, M.; Sun, R.; Gutarra, A. (2005). Modificación química de arcillas y su aplicación en la retención de colorantes. Revista de la Sociedad Química del Perú, *71*(1), 26-36.

Wang, C.; Zhang, Y.; Yu, L.; Zhang, Z.; Sun, H. (2013). Oxidative degradation of azo dyes using tourmaline. Journal of Hazardous Materials, *260*, 851-859.

Wardman, R. H. (2017). *An introduction to textile coloration: principles and practice*. UK: John Wiley & Sons Ltd.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, *144*, 307-313.

Yang, G.; Wu, L., Xian, Q.; Shen, F.; Wu, J.; Zhang, Y. (2016). Removal of Congo Red and Methylene Blue from aqueous solutions by vermicompost-derived biochars. PLoS ONE, *11*(5).

Yu, X.; Chen, L.; Zhang, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. Frontiers in Microbiology, *6*, 56.

Yuan, B.; Qiu, L. G.; Su, H. Z.; Cao, C. L.; Jiang, J. H. (2016). Schiff base - chitosan grafted L-monoguluronic acid as a novel solid-phase adsorbent for removal of congo red. International Journal of Biological Macromolecules, *82*, 355-360.

Capítulo 26

EFECTO REPROTÓXICO DEL TRICLOSAN EN DOS LÍNEAS DE *Drosophila melanogaster*

Sergio Daniel Parra Barrera[1*]
Adriana Muñoz Hernández[1]
Patricia Ramos Morales[1]

[1] Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CDMX, México.

[*] sergioparra@ciencias.unam.mx

Resumen

Los "contaminantes emergentes", grupo al que pertenecen los surfactantes, son utlizados en la elaboración de productos farmacéuticos y para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides, hormonas y los subproductos para la desinfección del agua. El triclosan (TCS) es un compuesto de uso antibacteriano y antifúngico que se encuentra en la lista de los 19 ingredientes que la FDA identificó como sustancias de riesgo para la salud presentes en jabones para manos. Se le ha asociado con compuestos que actúan como disruptores hormonales. En este estudio se evaluó el efecto reprotóxico del TCS en dos líneas silvestres de *Drosophila melanogaster:* a) estándar (CS) y b) alta bioactivación [OR(R)]. Larvas de tercer estadio, fueron alimentadas con TCS [1.78E-06 - 30 mM]. Se registró el total de moscas recobradas en cada concentración (IS) y la proporción sexual (PSx). Se eligieron 6 concentraciones para evaluar el efecto reprotóxico a lo largo de tres generaciones, utilizando dos esquemas de cruza: 1) ♀NT x ♂T y 2) ♀T x ♂T. Para cada concentración se sembraron de manera independiente, 15 parejas. Una vez recobrados los adultos se registró el número de progenie por familia (PPF). El TCS no mostró actividad tóxica en las moscas estándar, pero se recobraron menos moscas [OR(R)]. La proporción de sexos no fue afectada en ninguno de los dos esquemas de cruza. El tratamiento al macho parece afectar a más de una generación tanto en las moscas CS como en las [OR(R)].

Palabras clave: Drosophila, reprotóxico, transgeneracional.

1. Introducción

La Sociedad Real de Química (RSC) en Inglaterra, cuenta con más de 71 millones de estructuras químicas concentradas en una base de datos llamada "ChemSpider" (Royal Society of Chemistry, 2015). Lo anterior implica que anualmente se producen miles de productos y que cada uno de ellos debe ser evaluado a distintos niveles toxicológicos, lo cual, representa un reto enorme para las instituciones nacionales e internacionales que se encargan de regular la salida al mercado de estos agentes químicos.

Una de las problemáticas más importantes en el mundo, es la caracterización de los llamados "contaminantes emergentes", ya que son compuestos de origen y naturaleza química diferente, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de ésta, han pasado en gran medida inadvertidas, ocasionando problemas en los ecosistemas y riesgo para la salud (Undiano *et al.*, 2017). A este grupo pertenecen los surfactantes, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas, los subproductos para la desinfección del agua, los productos farmacéuticos y para el cuidado personal.

Los productos de cuidado personal pueden ser introducidos directamente al ambiente al ser liberados dentro de las aguas recreacionales o volatilizados en el aire (Van Stempvoort, Roy, Brown, & Bickerton, 2011). Un ejemplo de lo anterior son los protectores UV tipo benzofenona (BP), los cuales, también son utilizados en la fabricación de insecticidas, compuestos para la agricultura, la farmacéutica, aditivos para plásticos, pieles y revestimientos; se han detectado concentraciones importantes de BP en suelo (500-1,830 ng/Kg) y agua (27-204 ng/L) (Jeon, Chung, & Ryu, 2006).

El triclosán (TCS), es un compuesto químico que posee propiedades antibacterianas y antifúngicas, patentado en 1964 por la compañía Ciba-Geigy. Es hasta 1969 que comenzó a utilizarse en hospitales y a partir de la década de los 70's, se lanzó al mercado (DeLeo & Sedlak, 2014). En diciembre de 2016, la FDA solicitó a los fabricantes de jabones antibacteriales, su completa eliminación; lo anterior debido a que no hay evidencia de que su uso a largo plazo sea seguro, ni que su eficiencia sea mayor a la de los jabones tradicionales, para diciembre de 2017 ya se había lanzado la regla final que prohíbe su uso en estos productos (Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, 2017).

Por su estructura química, contiene 2 anillos aromáticos que lo hacen tener propiedades hidrofóbicas, posee una solubilidad en agua de 10 mg/L a 20°C (O'Neil, 2013). Se utiliza en diferentes tipos de productos de higiene personal como pastas dentales, jabones antibacteriales, talcos, toallas húmedas, cosméticos, desodorantes, entre otros. Puede inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico debido a que se adhiere a la enzima enoil-acil reductasa (ENR), esta adhesión incrementa la afinidad de la enzima por el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD+). Finalmente el resultado es la formación de un complejo terciario entre la ENR, el

NAD+ y el TCS, lo cual impide la síntesis de ácidos grasos que participan en la formación de membrana plasmática (Safet W.A. for P, 2006).

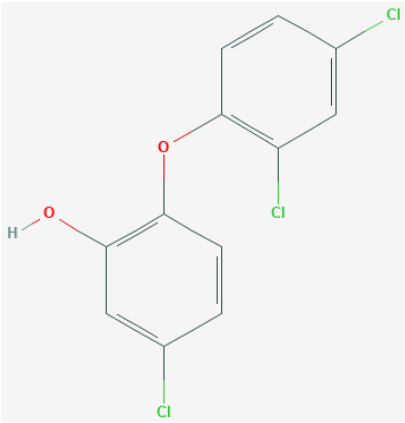


Fig 1.- Estructura química del Triclosan.
Obtenida de (NCBI, 2018).

El TCS tiene una vida media de 11 días en el agua y 18 días en suelos aeróbicos (Bester, 2005). Por otra parte, el TCS puede dar lugar a metil-triclosan (Fig. 2) por biotransformación durante el tratamiento de aguas (Balmer et al., 2004). También se ha observado que pueden generarse compuestos clorados derivados del TCS que son más persistentes en el ambiente y más tóxicos que su predecesor (Kanetoshi *et al.*, 1992).

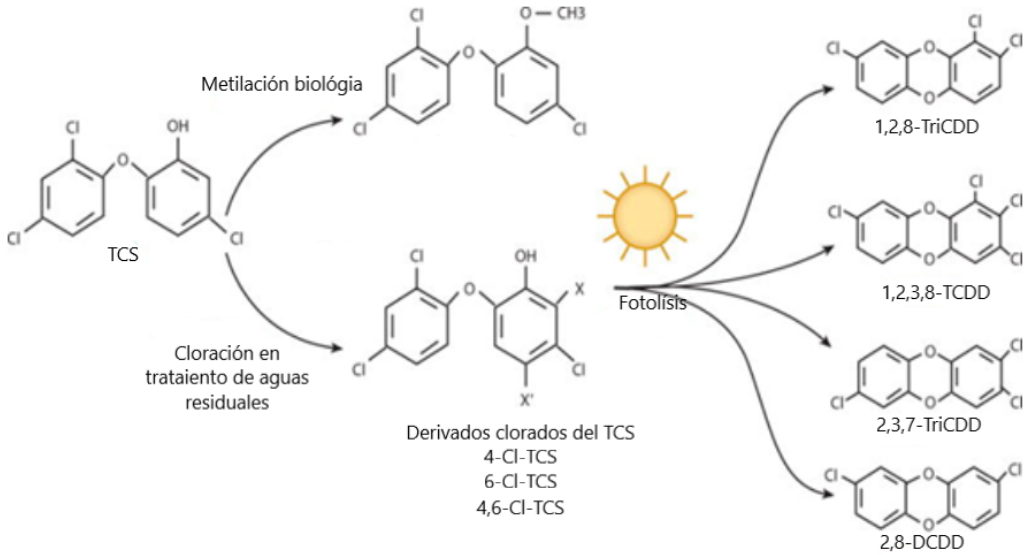


Fig. 2. Productos clorados y fotoproductos de dioxinas presentes en el ambiente generados a partir del TCS
Modificado de (Yueh & Tukey, 2016).

El TCS puede acumularse en cuerpos de agua; Zhao y colaboradores (2013) mencionan que es muy importante tratar el agua residual de las zonas urbanas y suburbanas, debido a que los ambientes acuáticos que reciben estas cargas residuales presentan diferentes concentraciones TCS y Triclocarban (TCC), siendo particularmente altas en sus sedimentos residuales.

El TCS es metabolizado mediante reacciones de conjugación a conjugados glucoronicos y sulfatos, mismos que son eliminados a través de las heces fecales y orina. En seres humanos se han identificado los genes del complejo de citocromos P450 (CYP450) que participan en su metabolismo con el siguiente orden jerárquico: CYP1A2 >CYP2B6 >CYP2C19 >CYP2D6 ≈ CYP1B1 >CYP2C18 ≈ CYP1A1 (Wu et al., 2017).

En *Drosophila melanogaster* no se ha reportado algún gen CYP450 que sea homólogo a los mencionados anteriormente (Tijet, Helvig, & Feyereisen, 2001), sin embargo no se descarta la posibilidad de que los complejos con los que cuenta la mosca, pudieran realizar una función similar.

Estudios realizados por Capdevielle y colaboradores (2008) han identificado que el TCS es altamente tóxico para ciertos grupos de organismos acuáticos, particularmente los pertenecientes al fitoplancton, como el caso de las algas del género *Scenedesmus* y peces como los *Oryzias*, por lo que los efectos adversos parecen presentarse independientemente del nivel de organización de los seres vivos que están expuestos.

Otro aspecto interesante de este compuesto es su posible capacidad para alterar las funciones endócrinas de los organismos. Matsumura y su equipo (2005) detectaron que la concentración de vitelogenina y testosterona en el plasma de *Xenopus laevis* descendía después de ser expuesta a TCS en concentraciones de 4 a 400µg/g durante 14 días. Un estudio similar evaluó el efecto reprotóxico de TCS en el pez mosquito (*Gambusia affinis)*, se probaron concentraciones de 29, 57.9 y 101.3 µg/L con una exposición de 35 días, los resultados obtenidos mostraron un incremento en el RNA mensajero de vitelogenina y reducción en el conteo de esperma de los machos (Rauty & Angus, 2010).

Anitha y colaboradores (2008) evaluaron en *Drosophila melanogaster*, si el TCS tiene propiedades genotóxicas a través de la inducción de mutaciones Letales Recesivas Ligadas al Sexo (Sex-Linked Recessive Lethal, SLRL). Los resultados que obtuvieron no determinan que este agente sea genotóxico, sin embargo, reportan una disminución significativa en los machos obtenidos en la segunda generación (F_2)

A pesar de lo mencionado anteriormente, el TCS continua en el mercado en muchos países como México. Por esta razón es necesario realizar estudios que permitan comprender las implicaciones toxicológicas de la exposición a largo plazo a este químico, independientemente de que se trate de concentraciones bajas. La

implementación de modelos como *Drosophila melanogaster* para este tipo de estudios puede ayudar a establecer los efectos o consecuencias que los contaminantes emergentes podrían generar, debido a que es un modelo *in vivo* en el cual es posible seguir la respuesta del efecto inducido en los organismos expuestos y a través de las generaciones.

Con base en lo anterior, se reconoce la importancia de realizar investigaciones que se enfoquen en determinar el efecto potencial del TCS en la salud, y que proporcionen información sobre su el lugar de las emisiones, su toxicidad, el destino final y transporte, las vías de exposición humana, número de personas expuestas el límite de liberación por uso.

1.1 *Drosophila* como sistema de prueba

Dentro del reino animal, los insectos son considerados los organismos más diversos y abundantes. Díptera es el tercer orden más grande de los insectos, se caracterizan por presentar un desarrollo holometábolo, es decir, llevan a cabo una metamorfosis completa; este orden incluye entre sus familias cosmopolitas a *Drosophilidae*, de la cual el 56% de sus especies pertenecen al género *Drosophila*. Algunas de estas especies han sido estudiadas en diversos aspectos (herencia, especiación, sistemática, biología del desarrollo, toxicología, entre otros) (Wheeler, 1981). Otro aspecto importante, es que la mayoría de las larvas de Díptera suelen desarrollarse en medios acuosos, lo cual favorece su uso como bioindicadores centinelas (Bautista, 2005).

Drosophila melanogaster tiene una determinación sexual que está mediada por cascadas de señalización química, las cuales dependen de la dosis de genes que está dada por la relación entre autosomas y cromosomas sexuales (X), el sexo predeterminado en esta especie es el macho, la doble dosis debida al cromosoma X en las hembras es la que dispara la cascada que las determina como tal (Salz & Erickson, 2010).

En la valoración de daño genético *in vivo*, *D. melanogaster* ha sido utilizada exitosamente, ya que se han diseñado metodologías que favorecen el análisis del efecto de genotóxicos en células germinales y somáticas. En la tabla 1 se presentan algunas de las ventajas que hacen de la mosca del vinagre un organismo adecuado para estimar el riesgo a la salud por la exposición a genotóxicos. Como resultado de los estudios realizados con larvas expuestas a mutágenos (Clark, 1982) y la comparación de sus citocromos P450 en las distintas etapas del desarrollo (Hällstöm, Blanck, & Atuma, 1983), se sabe que este organismo detecta el efecto inducido por compuestos de diversas especies químicas.

Tabla 1. Características y baterías de prueba de *Drosophila melanogaster* . De elaboración propia.

Característica y baterías de prueba	Autor
Ciclo de vida corto (10 días) y progenie numerosa.	(Demerec y Kaufman, 1961)
Presenta 4 pares de cromosomas secuenciados.	(Adams et al., 2000)
Metaboliza xenobióticos.	(Zijlstra & Vogel, 1988)
Citocromos P450 caracterizados.	(Tijet et al., 2001)
Numerosos marcadores fenotípicos y genotípicos.	(Lindsley Dan L. y Grell E. H., 1972)
Existen diversas metodologías para evaluar la actividad genotóxica de diferentes compuestos.	(Lee et al., 1983) (Valencia (Leader) et al., 1984) (Graf et al., 1984)

2. **Método**

2.1 Material biológico

Se emplearon dos cepas silvestres:

- Canton-Special (Canton-S, CS): Se caracterizan por no presentar algún tipo de arreglo en sus cromosomas (Lindsley Dan L. y Grell E. H., 1972). Su uso permite estimar el efecto que tiene la presencia de cualquier mutación o arreglo cromosómico mediante la comparación de la sobrevivencia de la progenie obtenida en otras cepas o cruzas.
- Oregon-R ([OR(R)]): . Han mostrado tener una resistencia mayor a compuestos como la alfa-amanitina (Phillips, Willms, & Pitt, 1982) y a plaguicidas como el dimetil benzo (alfa) antraceno (Saner, Weibel, Würgler, & Sengstag, 1996). Debido a este tipo de resistencia su implementación en pruebas toxicológicas puede aportar información adicional con respecto a la activación metabólica de los xenobióticos con respecto a la cepa CS.

2.2 Compuesto

Triclosán (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol, Irgasan), CAS [3380-34-5], fue adquirido a través de Sigma-Aldrich.

2.3 Colecta de huevos y obtención de larvas

Cultivos maduros de la línea silvestre CS y [OR(R)], se colocaron de manera independiente en frascos de vidrio estériles con medio de cultivo estándar durante un periodo de 8 horas para colectar huevos. Al término de este periodo, se sacó a los adultos y se dejó que los huevos continuaran su desarrollo hasta alcanzar el estadio de larva con 72±4 h de edad.

2.4 Tratamientos

2.4.A Evaluación de la toxicidad

Se realizó una curva que incluyó 28 concentraciones obtenidas mediante diluciones sucesivas (30 mM a 1.7881×10^{-6} mM) a partir de un stock (Fig. 3). Debido a que el TCS es un compuesto poco soluble en agua, se utilizó etanol al 5% como disolvente y como testigo negativo.

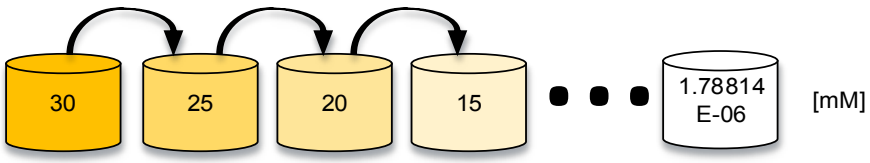


Fig. 3 Curva de concentraciones sucesivas
De elaboración propia.

Grupos de aproximadamente 100 larvas de 72 ± 4 h obtenidas mediante el método de Nöthinger (1970) con un gradiente de sacarosa al 20%, fueron alimentadas por separado, durante 48 h en tubos homeopáticos que contenían 1 g de medio de cultivo instantáneo Carolina® (Fórmula 4-24 Plain, Carolina Biological Supply Company), adicionado con 4.5 mL de las diferentes concentraciones a probar del TCS. Se realizaron dos réplicas por concentración para cada tipo de moscas. Las larvas permanecieron en este medio hasta que se indujo la metamorfosis y emergieron como moscas adultas. Los adultos recobrados fueron anestesiados con éter para su cuantificación. A partir de los datos obtenidos se calculó la sobrevivencia total y la proporción sexual para ambos tipos de moscas (CS y [OR(R)]).

2.4.B Efecto reprotóxico

Con la finalidad de identificar si el TCS tiene efecto sobre la capacidad reproductiva de los organismos expuestos, se analizó la fertilidad de los organismos.

Para medir la fertilidad de las moscas expuestas al TCS y de su progenie, a partir de los resultados obtenidos en la curva de toxicidad, se seleccionaron seis concentraciones de TCS y se realizaron 2 esquemas de cruza para cada una de las cepas: 1) hembras no tratadas x machos tratados (♀NT x ♂T) y 2) hembras tratadas x machos tratados (♀T x ♂T).

Para obtener las diferentes generaciones (F1, F2 y F3), para cada concentración se sembró de manera independiente a 15 parejas. Se contó cuántas parejas tuvieron hijos con respecto al total de parejas sembradas. Aquellos tubos en los que no se recobró descendencia también fueron considerados, para saber qué proporción de parejas no son fértiles. Para cada generación se registró el número de progenie por familia (PPF).

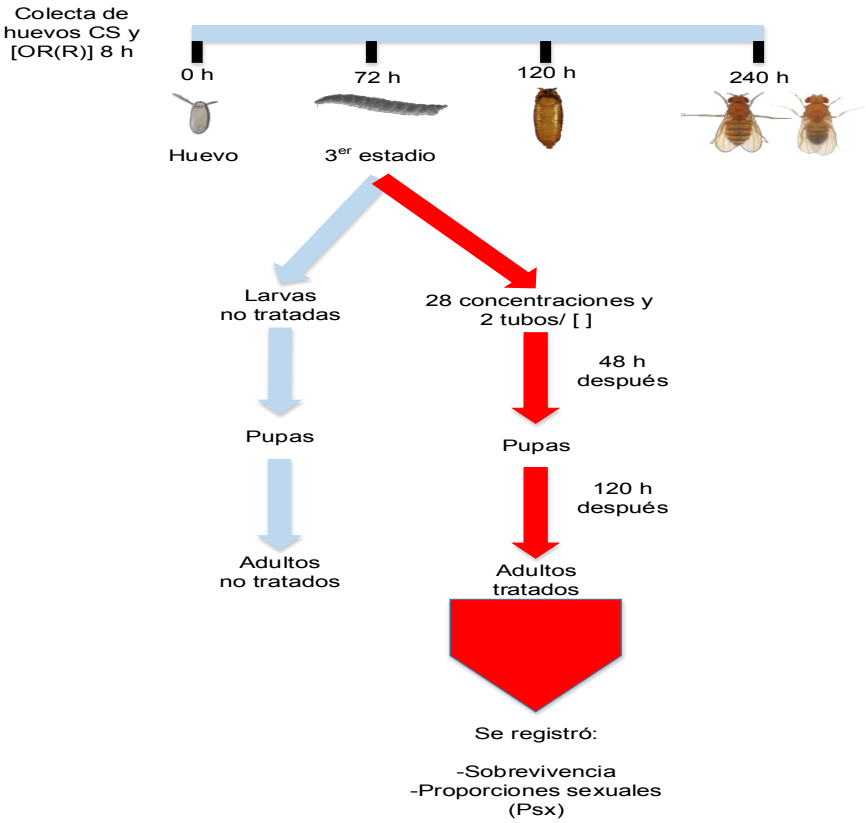


Fig. 4. Método para evaluar la toxicidad TCS

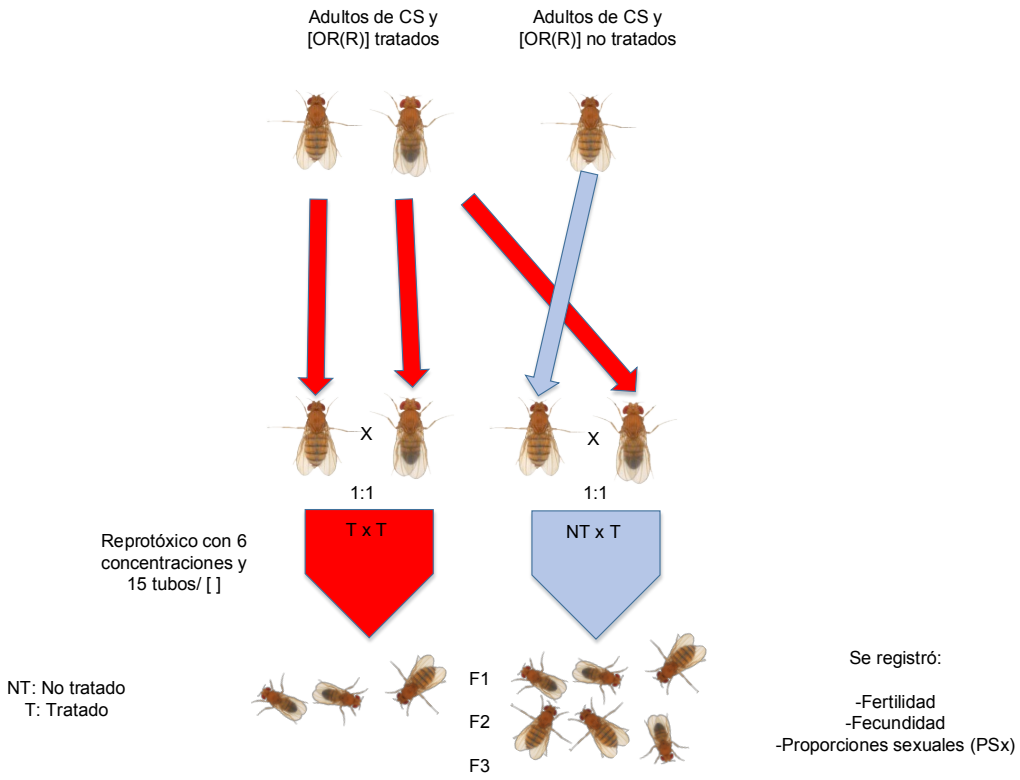


Fig. 5. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto reprotóxico.
De elaboración propia.

2.5 Análisis estadístico

Para determinar la toxicidad del TCS mediante la sobrevivencia obtenida y la proporción sexual de los parentales, se realizaron dos pruebas de ANOVA de una vía mediante el software STATISTICA v12.

Los resultados de la reprotoxicidad se analizaron de la siguiente forma:

Para el caso de la progenie promedio se realizaron 4 pruebas de ANOVA y 4 pruebas de Dunnett, en las cuales se tomaron como variables categóricas las concentraciones y las generaciones, esto se realizó para cada esquema de cruza y para cada línea, las pruebas se realizaron mediante el software STATISTICA v12. Por último, para comparar la proporción sexual se realizaron 2 pruebas MANOVA de 2 vías y sus respectivas pruebas de Dunnett, las variables categóricas fueron las concentraciones, las generaciones y los esquemas; al igual que en los casos anteriores, se utilizó el software STATISTICA v12.

3 Resultados

Los resultados fueron analizados conforme al orden en el que se fueron realizando las diferentes evaluaciones. En primer lugar, se evaluó la sobrevivencia al tratamiento de ambas líneas. Después se analizó la fertilidad de la cruza de la que se obtuvo la primera generación en comparación con la fertilidad de la cruza de la que se obtuvo la segunda y tercera generación. En paralelo, se analizó si el efecto inducido por el TCS se relaciona con la exposición de uno o ambos progenitores mediante dos sistemas de cruza: (nt x t) y (t x t).

3.1 Evaluación de toxicidad

Para comparar el efecto del tratamiento en los dos grupos de moscas se obtuvo la diferencia de sobrevivencia de cada concentración con respecto a su propio testigo e incluyendo al testigo (el cual tendrá un valor de cero).

En la figura 6 se muestra la sobrevivencia promedio corregida obtenida para ambos tipos de moscas. Se obtuvo que el TCS no es tóxico en ninguna de las concentraciones evaluadas. No obstante, se observa una diferencia clara en cuanto a la respuesta en ambas cepas. Para la línea [OR(R)] se recobró una sobrevivencia promedio menor en las series experimentales con respecto a su testigo, en cambio CS mostró que su sobrevivencia promedio fue mayor, sin embargo, no hubo diferencias significativas ($F_{(28,\ 174)}$= 0.891, p= 0.625). Al analizar la respuesta con relación al sexo, ninguna concentración tuvo diferencias con relación al testigo ($F_{(28,\ 174)}$= 0.741, p= 0.822)

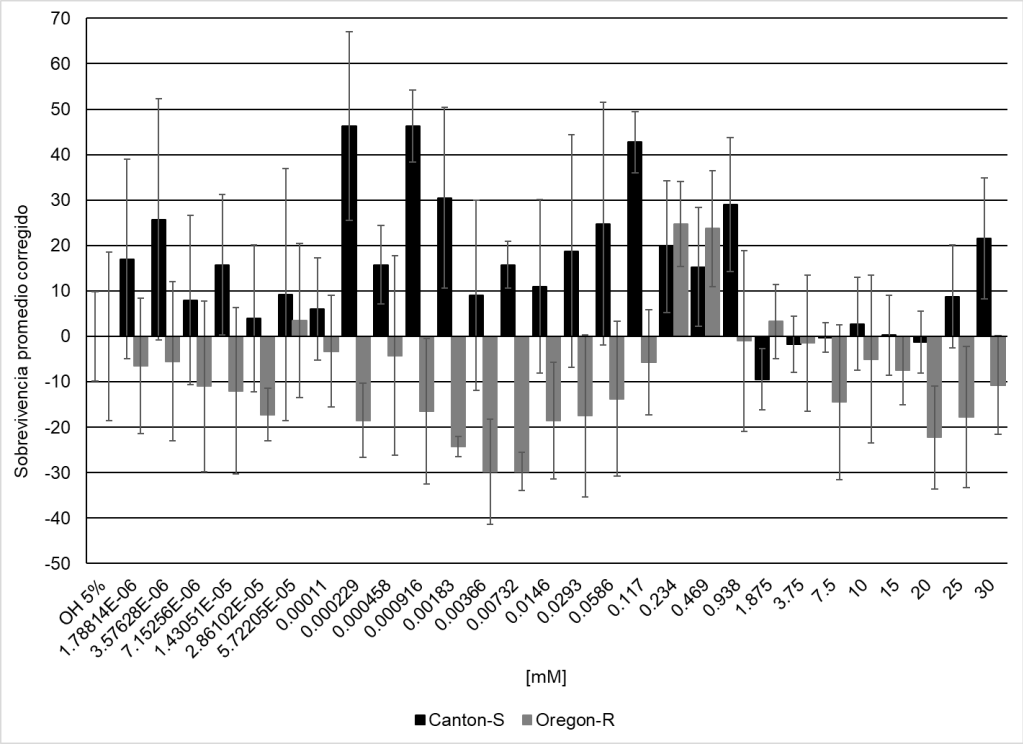


Fig 6. Sobrevivencia promedio corregida ± ee obtenida para moscas CS y [OR(R)]
De elaboración propia.

2. 2 Efecto reprotóxico

Para determinar si existe efecto del TCS en las tres generaciones analizadas, se comparó la curva de sobrevivencia de las moscas al tratamiento, y la progenie promedio tanto de la primera, como de la segunda generación. Para hacer la comparación se corrigieron los valores, llevando el testigo a cero. A continuación, se presentan los resultados para cada esquema de cruza:

2.2.1 ♀no tratada x ♂ tratado (NTxT)

Los resultados obtenidos para ambos tipos de moscas al evaluar el efecto reprotóxico cuando el macho ha sido expuesto a diferentes concentraciones de TCS se presentan en la figura 7 y 8.

En la línea CS (figura 7), al comparar la progenie promedio corregida con respecto a su testigo, sólo para la concentración de 1.875 mM, se obtiene respuesta significativa para la primera generación ($F_{(12,\ 541)}$= 1.930, p= 0.028). Con respecto a la segunda y tercera generación, se recobró una menor cantidad de progenie a partir de la concentración 0.00023 mM, sin que la respuesta fuera significativa.

Para el caso de la línea [OR(R)] (figura 8), se muestra la descendencia obtenida en las 3 generaciones. Aunque no se obtuvo respuesta significativa, se puede apreciar que, en diferentes concentraciones, las tres generaciones muestran una progenie promedio menor a su testigo correspondiente principalmente en concentraciones menores a 0.0037 mM.

Nuevamente la proporción sexual en ambos tipos de moscas no mostró diferencias con relación al testigo (CS: $F_{(12, 1092)}$= 1.450, p= 0.137 y [OR(R)]: $F_{(12, 1111)}$= 1.683, p= 0.064).

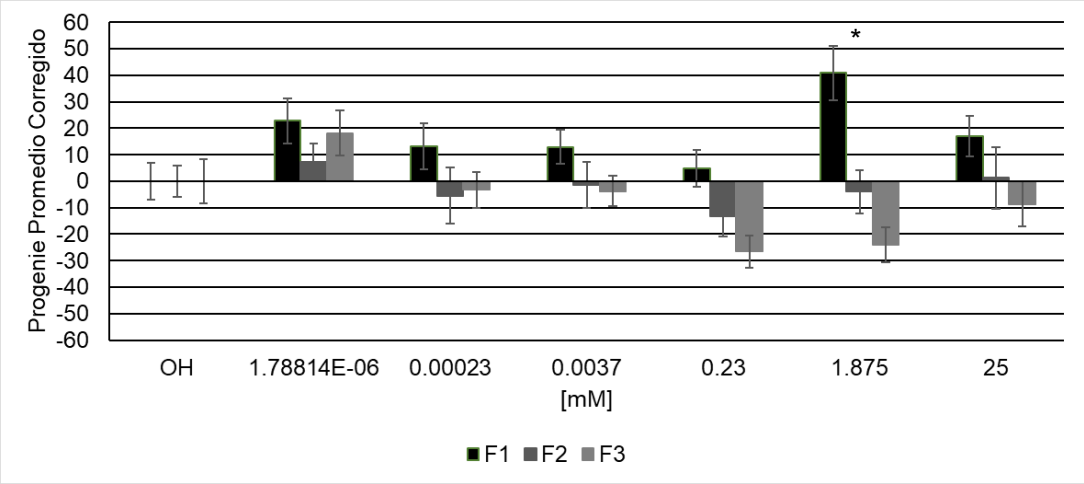


Fig. 7. Progenie promedio corregido en moscas Canton-S en el esquema NTxT. (*) = Diferencias significativas. ANOVA, α= 0.05. De elaboración propia.

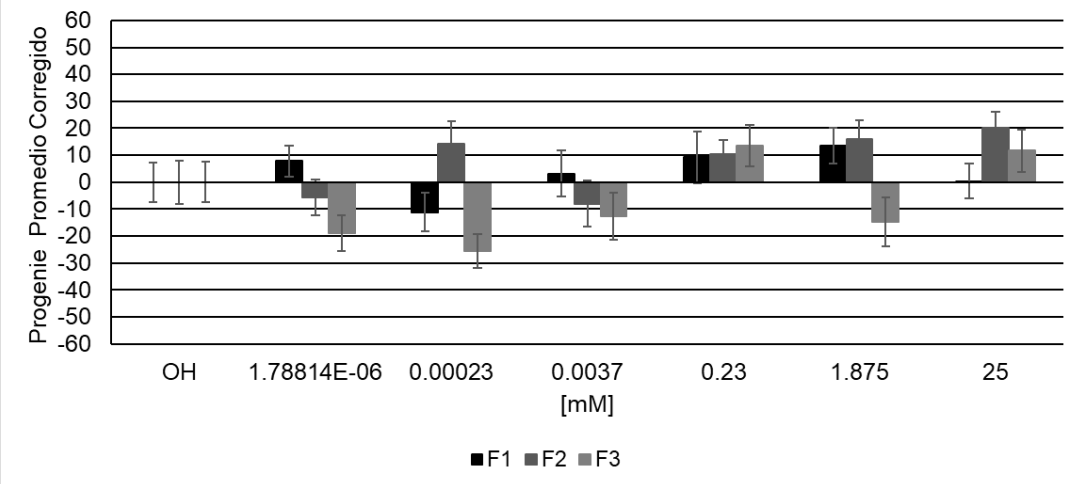


Fig. 8. Progenie promedio corregido en moscas Oregon-R en el esquema NTxT (*) = Diferencias significativas. ANOVA, α= 0.05
De elaboración propia.

2.2.3 ♀ tratada x ♂ tratado (TxT)

En la figura 9 y 10 se presenta los resultados para ambos tipos de moscas al evaluar el efecto reprotóxico cuando ambos progenitores fueron expuestos a las diferentes concentraciones de TCS.

Se puede apreciar que para moscas CS (figura 9), en la primera generación, la cantidad de progenie promedio recobrada con respecto a su testigo, fue menor en todas las concentraciones, siendo sólo significativa la respuesta para la concentración de 1.875 mM ($F_{(12, 560)}$= 2.376, p= 0.005). De forma contraria, la F_2 y la F_3 muestran una respuesta mayor con respecto a su testigo.

Para las moscas [OR(R)] (figur 10), en la mayoría de las concentraciones y a lo largo de las generaciones, la progenie promedio recobrada es menor con respecto a el testigo correspondiente. Sólo para la concentración de 25 mM, se recobró un mayor número de organismos, siendo la respuesta significativa ($F_{(12, 563)}$= 3.532, p= 0.00004).

Al igual que en los casos anteriores, la proporción sexual no mostró diferencias con respecto al testigo para ningún tipo de mosca a lo largo de las generaciones.

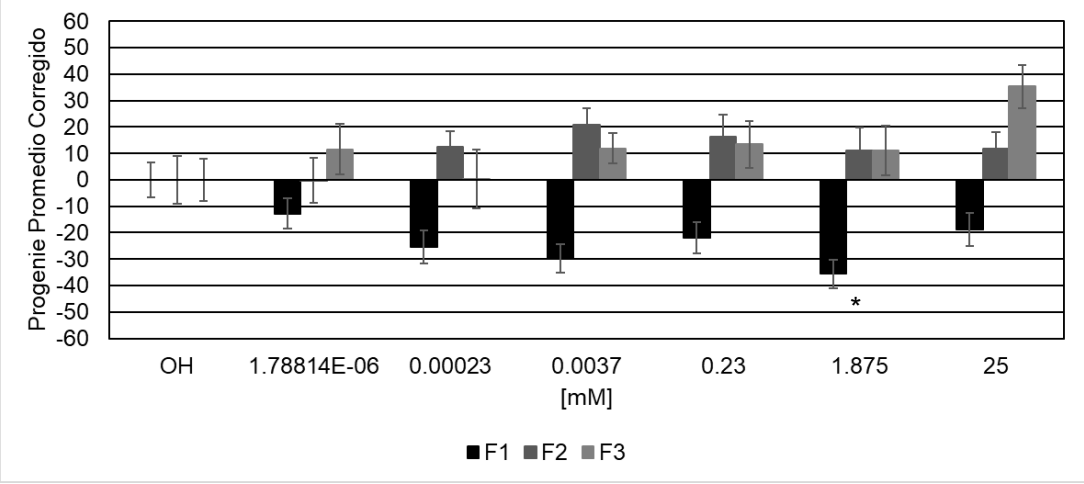


Fig. 9. Progenie promedio corregido en moscas Canton-S en el esquema NTxT

(*) = Diferencias significativas. ANOVA, α= 0.05. De elaboración propia.

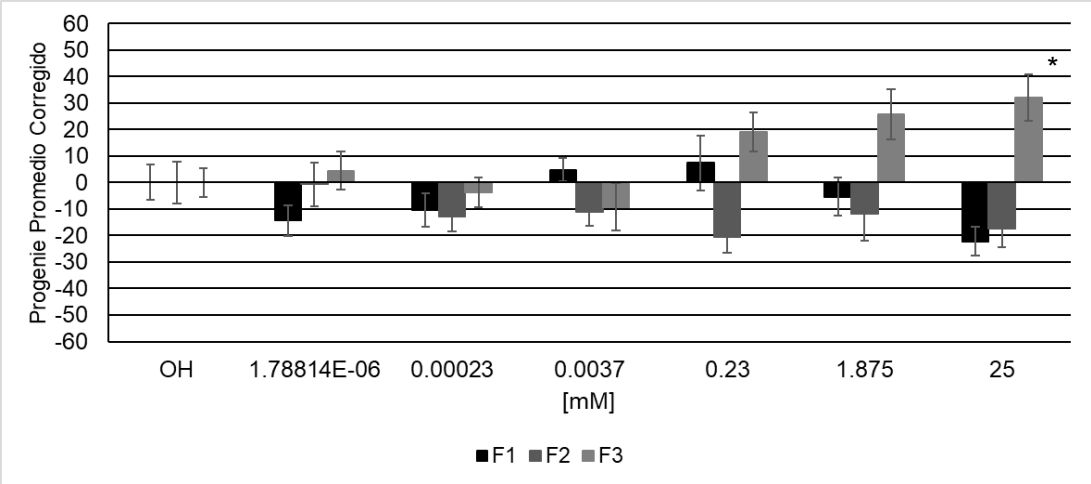


Fig. 10. Progenie promedio corregida para moscas Oregon-R en el esquema TxT. (*) = Diferencias significativas. ANOVA, α= 0.05. De elaboración propia.

4 Discusión

La problemática que actualmente se enfrenta con respecto a la gran cantidad de compuestos que se encuentran disponibles en el ambiente y de los cuales se desconoce su efecto a largo plazo, ha motivado el impulsar investigaciones que ayuden a elucidar los mecanismos mediante los cuales estas sustancias ingresan a los sistemas biológicos generando un impacto.

Los disruptores hormonales son un buen ejemplo de contaminantes emergentes, su importancia radica en que actúan mimetizando a las hormonas producidas por los seres vivos, interfiriendo en diferentes funciones. Con base en lo anterior, el TCS al ser identificado como un compuesto con este perfil (Rauty & Angus, 2010), llama la atención en cuanto a los efectos que puede generar en los organismos expuestos.

Un aspecto interesante de los estudios de genotoxicidad en cuanto a la relación dosis-respuesta, es el hecho de que se espera que, a mayor dosis, mayor será la respuesta observada (Klaassen & Watkins, 2005). Sin embargo, cuando se evalúan concentraciones bajas, la respuesta puede ser contraria, lo cual es muy importante para determinar el daño que podría presentar el material genético de los organismos que sobrevivieron a la exposición de ciertas sustancias.

En los estudios para evaluar el potencial genotóxico de las sustancias, se recurre al registro del efecto a través de diversos biomarcadores, con la finalidad de identificar el perfil de actividad de los compuestos. Para este trabajo se utilizaron como biomarcadores la sobrevivencia, la proporción sexual, la fertilidad, progenie por familia, además de dar seguimiento al impacto de la exposición de uno o

ambos progenitores en tres generaciones sucesivas, no expuestas a tratamiento con triclosán.

Una vez que una sustancia ingresa al organismo, se desencadena una serie de reacciones que generan cambios en su estructura química, favoreciendo así su eliminación o bien, desintoxicación. Para que esto ocurra, se requiere de la participación de sistemas enzimáticos (Brusick, 1980).

Se sabe que la participación del metabolismo en el efecto recobrado ante la exposición de xenobióticos es de gran interés. Hoy en día se conocen muchas formas diferentes de CYP en todos los grupos taxonómicos (Omura, 1999), sin embargo, el número de familias y enzimas varía entre los diferentes grupos.

Considerando que el TCS tiene la capacidad de interactuar con receptores nucleares y pudiera llegar a modular a genes que participan en el metabolismo de drogas como, por ejemplo, CYP3A4 (Yueh & Tukey, 2016), es de gran importancia explorar la respuesta de organismos como *Drosophila,* en la que existen cepas que presentan una actividad metabólica incrementada.

El hecho de haber recobrado una menor cantidad de organismos de la cepa ORR, hace suponer que el TCS tuvo una disposición diferente una vez que se dio el tratamiento e ingresó al organismo. Al respecto, se entiende por biotransformación al conjunto de procesos que introducen cambios en las estructuras de los xenobióticos, con la finalidad de favorecer su eliminación. La participación de sistemas enzimáticos en el proceso de eliminación recibe el nombre de desintoxicación. Con base en lo anterior, las moscas Oregon R, al tener un metabolismo diferencial, asimilaron el TCS de una forma diferente, lo cual pudo traducirse en generar metabolitos más activos que interfirieran con la sobrevivencia de los organismos o bien, tener mayor cantidad de los metabolitos disponibles, lo que explicaría que hayan sido más sensibles, comparados con las moscas de tipo silvestre CS.

Por el contrario, las moscas Canton-s, al tener un metabolismo regular (Baars, Blijleven, Mohn, Natarajan, & Breimer, 1980; Baars, Zijlstra, Vogel, & Breimer, 1977; Lindsley Dan L. y Grell E. H., 1972; Zijlstra, Vogel, & Breimer, 1984), no lograron metabolizar el compuesto a formas más activas y por ello, la sobrevivencia no fue afectada.

Con base en los resultados obtenidos entre ambos tipos de moscas, se desprende la necesidad de analizar de forma más particular las diferencias metabólicas que porta la línea [OR(R)] con respecto a la línea CS.

Con respecto a la proporción sexual, las fluctuaciones observadas tanto para moscas silvestres Canton-S como para las moscas Oregon-R, expuestas al TCS, como para las tres generaciones, se mantuvieron alrededor de 0.5, lo cual no permite obtener información sobre el comportamiento de este biomarcador. Lo anterior llama la atención ya que con base en el mecanismo de determinación del sexo en *Drosophila melanogaster*, se espera recobrar a un macho o una hembra con la misma probabilidad (0.5). En poblaciones de *Drosophila melanogaster*, que no han sido expuestas a xenobióticos se espera que la proporción sexual entre hembras y machos sea aproximadamente 0.5. Sin embargo, se ha reportado que esta cifra puede mostrar cambios debido al efecto de factores ambientales, así como la exposición a algunos compuestos (Matzkin, Watts, & Markow, 2007).

(Repetto Jiménez & G Repetto, 2009) señalan que la toxicidad de algunos compuestos puede comprometer la sobrevivencia y la proporción sexual de los organismos, además de que pueden provocar deficiencias a nivel de maduración sexual, producción de gametos, fertilización y cambios fisiológicos, lo que finalmente conlleva a alteraciones en la reproducción. Se recurre a la fertilidad como biomarcador para estimar la toxicidad de una sustancia a nivel reproductivo, ya que se puede relacionar el número de parejas (cruzas individuales) que tuvieron descendencia con relación al número total de las mismas. Contrario a lo reportado anteriormente, para el caso del TCS, en ambos tipos de moscas, los organismos recobrados del tratamiento, así como las generaciones sucesivas, no fueron afectados en su capacidad reproductiva, ya que en todas las concentraciones evaluadas se obtuvo una fertilidad arriba del 70%.

Al comparar la progenie promedio de las moscas expuestas al tratamiento con la progenie promedio tanto de la primera como de la segunda generación, se encontraron fluctuaciones, obteniéndose en algunos casos una menor cantidad de organismos con respecto al testigo, sin tener una relación directa con la concentración.

Las variaciones encontradas en la progenie promedio obtenida de CS y [OR(R)] a partir de los 2 esquemas de cruza (NTxT y TxT), evidencian una serie de posibles efectos:

La respuesta observada en el esquema donde las hembras no fueron tratadas, permite suponer que de alguna manera ellas amortiguan el efecto que el TCS ejerció en los machos expuestos. Si se compara la respuesta obtenida en el esquema NTxT *vs* el esquema TxT de la línea CS, observamos que al ser ambos parentales expuestos, hay una disminución considerable en la progenie promedio.

Existen reportes en los que también se ha observado una respuesta diferente con relación a si sólo uno de los progenitores ha estado en contacto con el xenobiótico (Alonso Vásquez, 2018), así como en cuanto a cómo se afecta la fecundidad de los organismos expuestos (Meza González, 2015) (Manzanil & La, 2015). Aunque los efectos transgeneracionales son típicamente considerados por daño materno, debido a la contribución que ésta tiene en cuanto a recursos en la producción de óvulos, se considera que el aporte del macho tratado también impacta a la progenie. A ciertas concentraciones de los compuestos, los organismos sobreviven, sin embargo, podrían tener alteraciones que no se hacen evidentes en el fenotipo, pero, que provocan descendencia con problemas de fertilidad o un comportamiento irregular en la proporción sexual.

Los resultados obtenidos en este trabajo comparados con los resultados por Anitha y colaboradores en 2008, no coinciden en cuanto a que los machos sean afectados de manera preferencial.

Ahora bien, el hecho de que a lo largo de las generaciones se observe una respuesta similar, sugiere que el efecto del compuesto permanece más de una generación, lo cual podría explicarse debido a posibles metilaciones provocadas en el DNA o bien, por posibles cambios en transcritos de mRNA en los espermatozoides (Campion et al., 2013). Con base en lo anterior, podría decirse que el TCS provoca daño transgeneracional.

Considerando los resultados obtenidos es importante impulsar los trabajos en los que se evalúa el cambio de diferentes biomarcadores como la sobrevivencia, proporción sexual, fertilidad, progenie por familia, con la finalidad de reunir una mayor cantidad de evidencias que permitan esclarecer la respuesta de sustancias que representan un riesgo para los organismos. Por lo tanto Se reconoce la importancia de continuar con las investigaciones que permitan identificar la respuesta del TCS como un disruptor hormonal.

5 Conclusiones

El TCS no mostró actividad tóxica en ninguna de las cepas utilizadas.

Se confirmó que las cepas responden de manera diferente a la presencia del TCS.

En general, la sobrevivencia de las moscas Oregon-R fue menor a la de las moscas Canton-s.

En moscas Canton-s el efecto del TCS es más evidente cuando ambos progenitores son expuestos.

Es necesario ampliar los estudios para esclarecer la actividad teratogénica del TCS.

Drosophila ha mostrado ser un organismo sensible al efecto de diversos compuestos con naturaleza química diferente, así como en la evaluación de mezclas complejas, por lo que, con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que es un modelo confiable para explorar el efecto de "contaminantes emergentes".

Debido a los resultados derivados de esta investigación se evidencía la necesidad de continuar estudiando la respuesta del TCS a diferentes niveles, con la finalidad de descartar una respuesta de un compuesto con perfil de falso negativo.

Agradecimientos

Al Banco de moscas de la Facultad de Ciencias, UNAM por el material biológico proporcionado. Proyecto PAPITT (IN229719), DGAPA-UNAM

6 Referencias

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., … Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185

Alonso Vásquez, T. (2018). *Pérdida cromosómica en dos generaciones sexuales sucesivas después de una única administración del citostático colchicina en machos de Drosophila melanogaster.*

Baars, A. J., Blijleven, W. G. H., Mohn, G. R., Natarajan, A. T., & Breimer, D. D. (1980). Preliminary studies on the ability of drosophila microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90040-8

Baars, A. J., Zijlstra, J. A., Vogel, E., & Breimer, D. D. (1977). The occurrence of cytochrome P-450 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in drosophila melanogaster microsomes, and the importance of this metabolizing capacity for the screening of carcinogenic and mutagenic properties of foreign compounds. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. https://doi.org/10.1016/0027-5107(77)90083-5

Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., & Buser, H. R. (2004). Occurrence of Methyl Triclosan, a Transformation Product of the Bactericide Triclosan, in Fish from Various Lakes in Switzerland. *Environmental Science and Technology*. https://doi.org/10.1021/es030068p

Bester, K. (2005). Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. https://doi.org/10.1007/s00244-004-0155-4

Brusick, J. D. (1980). *Principles of Toxicology*.

Campion, S., Aubrecht, J., Boekelheide, K., Brewster, D. W., Vaidya, V. S., Anderson, L., … Goodsaid, F. (2013). The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *9*(11), 1391–1408. https://doi.org/10.1517/17425255.2013.827170

Clark, A. M. (1982). The use of larval stages of Drosophila in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90212-3

DeLeo, P. C., & Sedlak, R. I. (2014). Comment on "on the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States." *Environmental Science and Technology*. https://doi.org/10.1021/es503494j

Demerec, M. y Kaufman, B. P. (1961). *Drosophila Guide*. Washington: Carnegie Institution Of Washington. Retrieved from http://www.evolocus.com/Textbooks/DrosophilaGuide1996_Demerec.pdf

Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. *Environmental Mutagenesis*. https://doi.org/10.1002/em.2860060206

Hällstöm, I., Blanck, A., & Atuma, S. (1983). Comparison of cytochrome P-450-dependent metabolism in different developmental stages of drosophila melanogaster. *Chemico-Biological Interactions*. https://doi.org/10.1016/0009-2797(83)90005-4

Jeon, H. K., Chung, Y., & Ryu, J. C. (2006). Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass

spectrometry. *Journal of Chromatography A*. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.036

Kanetoshi, A., Katsura, E., Ogawa, H., Ohyama, T., Kaneshima, H., & Miura, T. (1992). Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4′-trichloro-2′-hydroxydiphenyl ether (Irgasan® DP300) and its chlorinated derivatives. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. https://doi.org/10.1007/BF00226000

Klaassen, C., & Watkins, J. (2005). *Fundamentos de Toxicología*.

Lee, W. R., Abrahamson, S., Valencia, R., von Halle, E. S., Würgler, F. E., & Zimmering, S. (1983). The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in Drosophila melanogaster. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, *123*(2), 183–279. https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90025-8

Lindsley Dan L. y Grell E. H. (1972). Genetic Variations of Drosophila melanogaster, 471pp. https://doi.org/10.1002/9780470373699.speced0903

Manzanil, M. M. C., & La. (2015). *Modulación del efecto materno del daño reprotóxico inducido por la azida de sodio en D. melanogaster*. Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from http://132.248.9.195/ptd2015/junio/0730668/Index.html

Matzkin, L. M., Watts, T. D., & Markow, T. A. (2007). Desiccation resistance in four Drosophila species. *Fly*, *1*(5), 268–273.

Meza González, N. M. (2015). *Caracterización de la fecundidad como un maracador de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por el uretano en Drosophila melanogaster.*

O'Neil, M. J. (2013). The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Drug Development Research*. https://doi.org/10.1002/ddr.20159

Omura, T. (1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *266*(3), 690–698. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1887

Phillips, J. P., Willms, J., & Pitt, A. (1982). Alpha-amanitin resistance in three wild strains of Drosophila melanogaster. *Canadian Journal of Genetics*

and Cytology. *Journal Canadien de Genetique et de Cytologie*. https://doi.org/10.1139/g82-014

Rauty, S. A., & Angus, R. A. (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, gambusia affinis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. https://doi.org/10.1002/etc.150

Repetto Jiménez, M., & G Repetto, K. (2009). *Toxicología fundamental*.

Royal Society of Chemistry. (2015). ChemSpider Databank. Retrieved from http://www.chemspider.com/Default.aspx#

Safet W.A. for P. (2006). The WHO Guidelines on Hand Hygiene in Healthcare (Advanced Draft) will be issued as a final version in 2007. *Global Patient Safety Challenge*.

Salz, H. K., & Erickson, J. W. (2010). Sex determination in Drosophila: The view from the top. *Fly*, *4*(1), 60–70. https://doi.org/10.4161/fly.4.1.11277

Saner, C., Weibel, B., Würgler, F. E., & Sengstag, C. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by Drosophila melanogaster CYP6A2 enzyme in Saccharomyces cerevisiae. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:1<46::AID-EM7>3.0.CO;2-C

Tijet, N., Helvig, C., & Feyereisen, R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in Drosophila melanogaster: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00533-3

U.S. Department of Health and Human Services. (2017). 5 Things to Know About Triclosan. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00255-7

Undiano, Elizabet. Arroyo, N. A. M. (2017). Contaminantes emergentes, ¿qué son y cómo nos afectan? *Investigación y Desarrollo*, 1–9. Retrieved from https://invdes.com.mx/los-investigadores/contaminantes-emergentes-que-son-y-como-nos-afectan/

Valencia (Leader), R., Abrahamson, S., Lee, W. R., Von Halle, E. S., Woodruff, R. C., Würgler, F. E., & Zimmering, S. (1984). Chromosome mutation tests for mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. https://doi.org/10.1016/0165-

1110(84)90015-0

Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J., & Bickerton, G. (2011). Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology*. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2011.02.013

Wheeler, M. R. (1981). *The Drosophilidae: A taxonomic overview. In '"The Genetics and Biology of Drosophila."'* (H. L. M. Ashburner & J. Carson, and J. N. Thompson, Eds.) (Vol. 3a). New York: Academic Press.

Wu, Y., Chitranshi, P., Loukotková, L., Gamboa da Costa, G., Beland, F. A., Zhang, J., & Fang, J. L. (2017). Cytochrome P450-mediated metabolism of triclosan attenuates its cytotoxicity in hepatic cells. *Archives of Toxicology*. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1893-6

Yueh, M.-F., & Tukey, R. H. (2016). Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417

Zijlstra, J. A., & Vogel, E. W. (1988). Metabolic inactivation of mutagens in Drosphila melanogaster. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90042-5

Zijlstra, J. A., Vogel, E. W., & Breimer, D. D. (1984). Strain-differences and inducibility of microsomal oxidative enzymes in Drosophila melanogaster flies. *Chemico-Biological Interactions*. https://doi.org/10.1016/0009-2797(84)90143-1

Capítulo 27

ESTRÉS GENOTÓXICO DEL METIL METANO SULFONATO EN HEMBRAS Y MACHOS DE D. MELANOGASTER: UNA RESPUESTA DIFERENCIAL EN BIOMARCADORES REPROTÓXICOS

Estefania Arroyo Jilote[1*]

Patricia Ramos Morales [1]

[1] Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental-Banco de Moscas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México

[a] eaj@ciencias.unam.mx

Resumen

El estrés ambiental, como la exposición a contaminantes y agentes genotóxicos pueden tener importantes consecuencias en la capacidad reproductora de los organismos, así como en la viabilidad y desarrollo de sus descendientes. No obstante, existe poca información acerca de si es diferente el efecto de los contaminantes dependiendo del progenitor expuesto (hembra o macho). En este estudio se evaluó, si la ovoposición, viabilidad y la cantidad de progenie adulta de *Drosophila melanogaster* se modificó dependiendo del progenitor expuesto al mutágeno metil-metano-sulfonato (MMS). Larvas de tercer estadio se alimentaron con MMS [0.24µM-10mM] o agua destilada. Se comparó la sobrevivencia de las moscas tratadas respecto al testigo y se formaron 40 parejas (hembra x macho) usando moscas tratadas (T) o no-tratadas (NT) según el esquema: (T $_{X}$ T), (T $_{X}$ NT) y (NT $_{X}$ T). Cada pareja de moscas se colocó en medio fresco por un periodo de ocho horas, en seguida se contó el número de huevos ovopositados y después de 10 días se contó el número de adultos que emergieron. Las concentraciones más altas de MMS fueron letales. En las cruzas: (T $_{X}$ T) y (NT $_{X}$ T) la ovoposición, viabilidad y progenie promedio fue menor en las concentraciones más altas. La progenie de la cruza (T $_{X}$ NT) fue aparentemente la menos afectada, a pesar de que la hembra tratada contribuye a la progenie con su DNA-nuclear, organelos y citoplasma. Estos resultados muestran que existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductora y viabilidad de la descendencia dependiendo de cuál progenitor es sometido a un estrés genotóxico.

Palabras clave: Drosophila melanogaster, metil metano sulfonato, reprotoxicidad, biomarcadores.

1. Introducción

Uno de los objetivos primordiales de cualquier ser vivo es dejar descendencia. En el caso de los organismos con reproducción sexual, los gametos son las células especializadas en transmitir la información genética de una generación a otra, por lo que durante la formación de los gametos es indispensable mantener la integridad del material que será heredado a las siguientes generaciones (Lehmann, 2012).

El estrés ambiental producido por temperaturas extremas, la desecación, el hacinamiento, exposición a agentes genotóxicos o contaminantes, entre otros, puede tener consecuencias en la salud de los organismos (Singh, Kochar and Prasad, 2015) o bien, puede afectar el linaje de las células germinales comprometiendo la capacidad reproductora, así como la calidad del material genético que será transmitido a los nuevos individuos (Parodi *et al.*, 2015).

Por tal motivo, el seguimiento, la identificación y medición de biomarcadores de exposición en individuos y poblaciones para la evaluación ambiental ha tenido gran relevancia porque ofrece grandes oportunidades para detectar de manera rápida y sensible cambios morfológicos, fisiológicos o conductuales relacionadas con la exposición a productos químicos ambientales (Peakall, 1994).

Para ello, el uso de modelos experimentales, sensibles a niveles ambientales de contaminantes, proporciona una alternativa importante a los estudios de biomonitoreo, en particular, aquellos modelos experimentales *in vivo* que involucran sistemas completos a partir de los cuales se puede identificar la fracción de organismos que muestra un cambio particular en relación con algún factor causal (Ramos-Morales *et al.*, 2001).

El impacto de los compuestos xenobióticos en la capacidad reproductiva ha traído un creciente interés en las últimas décadas. Dado que una reducción de ésta en los organismos silvestres puede a la larga amenazar la supervivencia de especies susceptibles. Este aspecto merece un examen exhaustivo por su importancia ecotoxicológica (VanDerOost, Porte-Visa and Van-den-Brink, 2005).

Los efectos adversos en la capacidad reproductiva pueden incluir: cambio en el tiempo de la madurez sexual, las alteraciones en la producción y maduración de los gametos, la irregularidad del ciclo reproductivo, variaciones en el comportamiento sexual, afectaciones en el cortejo, la fertilidad y la fecundación, la viabilidad de las crías, toxicidad en el desarrollo, la reproducción prematura y la senescencia, entre otras (EPA, 1996).

En ese sentido, los estudios de toxicidad reproductiva con mamíferos inferiores, nemátodos e insectos son una importante fuente de información relacionada con la genotoxicidad de las células germinales y la capacidad

reproductiva de los organismos, dado que proporcionan una gran cantidad de biomarcadores que permiten evaluar el daño en las células germinales masculinas, femeninas y tejidos y órganos gonadales, así como sobre los efectos citotóxicos que pueden ocurrir después de exposición a genotóxicos (Yauk *et al.*, 2013; Allard, 2015; Ferreira and Allard, 2015).

Drosophila melanogaster es el modelo biológico más utilizado en la investigación científica desde hace más de 100 años (Adams *et al.*, 2000). Esta mosca ha sido una especie clave para pruebas *in vivo* de genotoxicidad y toxicidad reproductiva, debido a diversas características como la capacidad de realizar reacciones de activación metabólica por la presencia de un complejo enzimático microsomal, similar a la fracción S9 del hígado de los mamíferos (Sobels, 1973; Sobels and Vogel, 1976; Baars *et al.*, 1977).

Tiene un ciclo de vida de 10 días, produce progenie numerosa lo que facilita el análisis estadístico robusto, es posible dar seguimiento al efecto de una exposición a través de varias generaciones (Vogel, 1987) y se dispone de gran cantidad de mutantes con marcadores fenotípicos que permiten el análisis del efecto en distintos procesos biológicos (Lindsley and Zimm, 1992; Nichols, Becnel and Pandey, 2012).

En el aspecto morfológico y fisiológico, se encuentran similitudes con el sistema reproductivo de los mamíferos, como por ejemplo las estructuras de los órganos reproductivos, las hormonas sexuales, las proteínas conservadas implicadas en el desarrollo genitourinario y los mecanismos moleculares del proceso de formación y maduración de las células germinales (Avanesian, Semnani and Jafari, 2009).

Por todas las características antes mencionadas y su bajo costo de mantenimiento *D. melanogaster* es un sistema de prueba que permite detectar reacciones adversas inducidas químicamente en las células germinales y en los órganos reproductivos (Gupta *et al.*, 2007; Avanesian, Semnani and Jafari, 2009) y más importante aún, permite evaluar el desempeño reproductor, tanto a nivel de selección de pareja y frecuencia de apareamientos (Trujillo, 2015) como en cuanto a la evaluación de los gametos dañados y si son capaces de formar nuevos individuos, la cantidad y el estado de éstos, a través de marcadores de daño reprotóxico como la fertilidad y la fecundidad (Wakimoto, Lindsley and Herrera, 2004; Meza, 2015).

Sin embargo, tanto en *Drosophila* como en otros modelos biológicos, la mayoría de los estudios de toxicidad reproductiva, se han centrado en el efecto de la línea paterna debido principalmente a que se dispone de más información acerca del proceso de formación de los gametos masculinos que de los gametos femeninos y a que en las hembras la regulación hormonal limita el trabajo experimental (Susiarjo *et al.*, 2009)

En consecuencia, la información acerca del efecto de los genotóxicos en la capacidad reproductiva en la línea materna es limitada, a pesar de que las hembras además de contribuir con la mitad de la información genética aportan componentes citoplasmáticos como proteínas, RNA y otros factores indispensables para el desarrollo del embrión (Dworkin *et al* 1990; Greiner, et al Despic *et al.*, 2017).

Por lo que surge la necesidad de responder a interrogantes como, la exposición de las hembras a genotóxicos ¿pueden inducir cambios en su capacidad reproductora? y, en caso de presentarse ¿los cambios son similares a los observados en los machos expuestos?

En este trabajo el objetivo central es evaluar si la capacidad reproductora estimada a través de la frecuencia de ovoposición, viabilidad y la cantidad de progenie adulta de *Drosophila melanogaster* se modifica, dependiendo del progenitor expuesto al mutágeno metil metano sulfonato (MMS).

2. Material y Métodos

Se usaron moscas silvestres de *Drosophila melanogaster* de la cepa Canton-S. El mutágeno empleado para inducir estrés genotóxico en las moscas fue metil metano sulfonato [Cas. No 66-27-3] (MMS, Sigma-Aldrich). El MMS es un agente alquilante de acción directa, es decir, no necesita ser metabolizado para ser activo. Adiciona grupos metilo, principalmente en las adeninas y guaninas del ADN (Beranek, 1990; Wyatt and Pittman, 2006).

El MMS induce mutaciones y daños en el DNA en bacterias (De Flora, 1981; Eder, Deininger and Wiedenmann, 1989; Hellmér and Bolcsfoldi, 1992).En células somáticas y germinales de roedores y humanos, incrementó la frecuencia de mutaciones (Slamenová *et al.*, 1990; Natarajan and Darroudi, 1991), el rompimiento en el DNA (Sina *et al.*, 1983; Munzer *et al.*, 1988), los intercambios de cromátidas hermanas (Klungland *et al.*, 1995) y las aberraciones cromosómicas (Darroudi, Natarajan and Lohman, 1989; Moore *et al.*, 1989).

La exposición a MMS en ratas por vía subcutánea, inyección intraperitoneal e inhalación produjo tumores locales, tumores en el sistema nervioso y tumores nasales (Snyder *et al.*, 1986; Sellakumar, Snyder and Albert, 1987). En ratones, la administración oral aumentó la incidencia de tumores de pulmón y linfomas y por vía intraperitoneal generó adenomas (Stoner *et al.*, 1986).

El MMS, también tiene efectos reprotóxicos y en el desarrollo, en ratas ocasiona malformaciones y muerte fetal (Generoso *et al.*, 1991). En *Drosophila melanogaster* induce inversiones cromosómicas (Parkash and Miglani, 1976), pérdida parcial de cromosomas sexuales (Valencia *et al.*, 1985), mutaciones letales

recesivas ligadas al sexo (Vogel and Nivard, 1997) y mutación y recombinación somática (Vogel and Zijlstra, 1987).

Anteriormente, el MMS se utilizaba como insecticida y agente quimioterapéutico, pero actualmente sólo se usa con fines de investigación (IARC, 1990), particularmente, como un mutágeno de referencia en toxicología genética debido a su actividad mutagénica y carcinogénica (Beranek, 1990; Wyatt and Pittman, 2006).

2. 1.Método

Se realizó la cruza de hembras y machos silvestres de *Drosophila melanogaster*, a los tres días se transfirió a frascos con medio de cultivo fresco por un periodo de 8 h con la finalidad de obtener huevos con una diferencia de edad de ± 4 h. Después de tres días, las larvas de 72±4 h se extrajeron por el método de Nöthinger el cual consiste en separar las larvas del medio mediante un gradiente de densidad (Nöthiger, 1970).

Las larvas obtenidas fueron asignadas al azar a tubos homeopáticos que contenían 1 g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply) hidratado con agua destilada, utilizada como testigo negativo, o a tubos hidratados con las diluciones de MMS. Se probaron nueve concentraciones de MMS con un rango de 0.2 µM a 10 mM, las cuales se prepararon por diluciones sucesivas. Por cada concentración se realizaron tres réplicas.

Las larvas permanecieron en los tubos hasta el periodo de pupación (en la que el organismo ya no ingiere alimento), para recibir un tratamiento subcrónico vía alimentación por 48 horas. Luego de una semana se recobraron los adultos emergidos del tratamiento, se separaron y clasificaron por sexo y se obtuvo la sobrevivencia y la proporción sexual de las series testigo y experimentales.

Para evaluar si la capacidad reproductora de las moscas recobradas se modificó dependiendo del progenitor expuesto al mutágeno MMS se formaron 40 parejas (hembra x macho) usando moscas tratadas (T) o no-tratadas (NT) de acuerdo con los siguientes esquemas de cruza:

- Hembras tratadas X machos no tratados (T X NT)
- Hembras no tratadas X machos tratados (NT X T)
- Hembras tratadas X machos tratados (TX T)

Al cuarto día, cada pareja de moscas se trasvasó a tubos homeopáticos con medio fresco por un periodo de ochos horas, con la finalidad de colectar la mayor cantidad de huevos de cada pareja, después de este tiempo las parejas se volvieron a trasvasar a otros tubos con medio fresco. Se obtuvo la frecuencia de hembras que ovopositaron, es decir, el número de tubos que tuvieron huevos (sin importar el número de huevos) respecto al número total de tubos sincronizados y se

contó el número de huevos que había en cada tubo durante las 8 h de sincronización.

Pasados 10 días, se contó la progenie adulta recobrada en cada uno de los tubos sincronizados, a partir de la cual se evaluó el promedio de la cantidad de progenie adulta de los organismos expuestos y la viabilidad de la descendencia de los individuos expuestos (estimada como el porcentaje de huevos que completaron su desarrollo hasta adultos).

2.2. Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas en la sobrevivencia y proporción sexual de las moscas tratadas con MMS respecto al testigo, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada uno y una prueba de Dunnett cuando el ANOVA mostró diferencias significativas.

La comparación de la frecuencia de ovoposición y viabilidad entre las diferentes concentraciones y el testigo, así como las diferencias entre los tres esquemas de cruzas se evaluaron mediante una prueba de Z para proporciones.

Para analizar el promedio del número de huevos, la cantidad de progenie adulta y el número promedio de organismos que no completaron su desarrollo se realizó una prueba de ANOVA de dos vías, que evaluó si existían diferencias entre las medias de las concentraciones y el testigo, los esquemas de cruza y la interacción entre concentraciones y esquemas de cruza. En los casos que hubo diferencias significativas se realizó la prueba post hoc de Tukey. Los resultados de ésta se indicaron con la letra q.

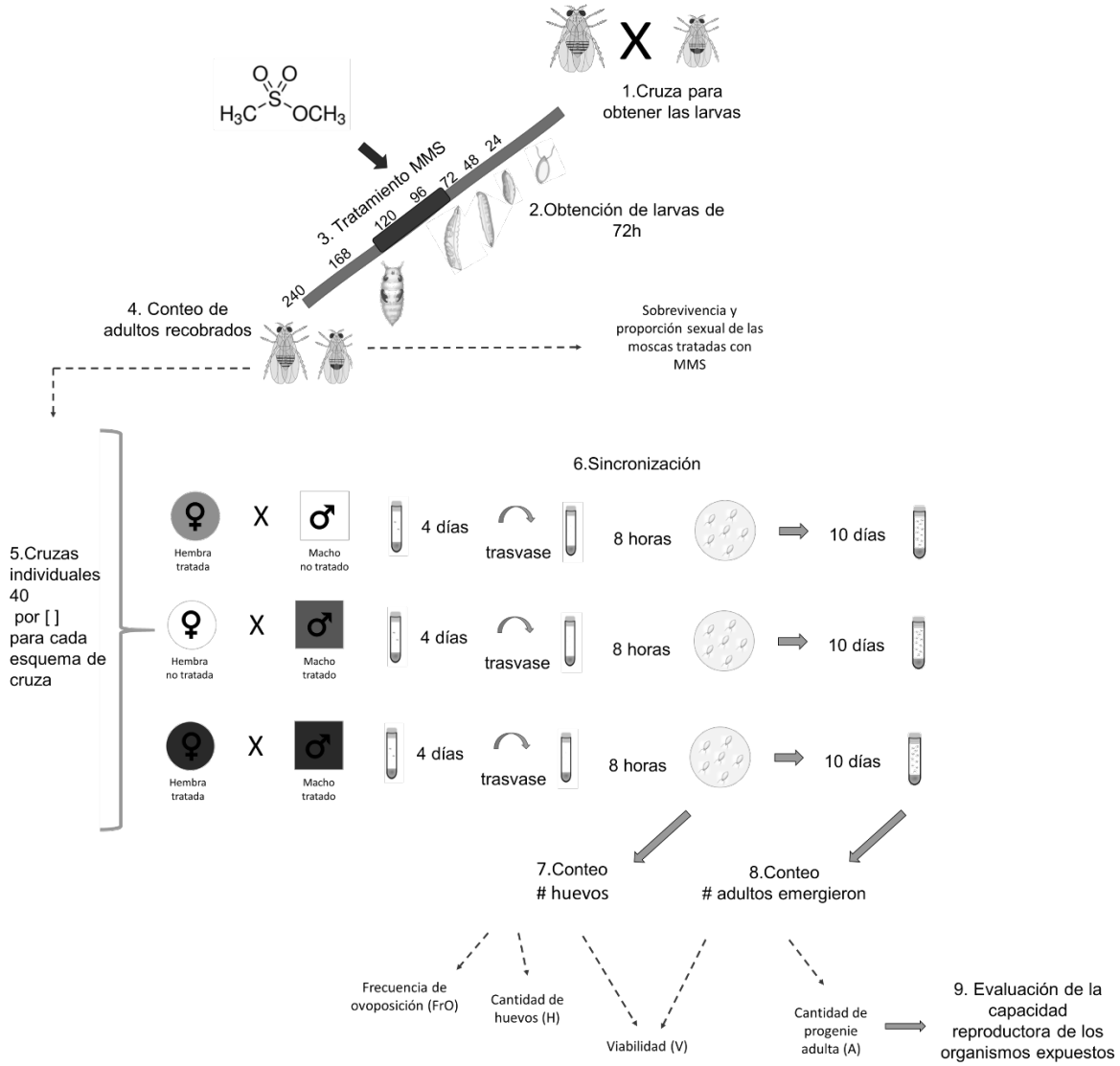


Fig. 1 Representación de la metodología utilizada para evaluar la toxicidad y la capacidad reproductora de las moscas expuestas a MMS. De elaboración propia.

3. Resultados

Para evaluar si existe un efecto tóxico del tratamiento con MMS se obtuvo la sobrevivencia (S) y la proporción sexual (Psx) del testigo y de cada una de las concentraciones de MMS, que se muestran en la tabla 1. En la figura 1 se muestra que las concentraciones a 5mM y 10mM de MMS fueron letales, en las demás concentraciones no se encontraron diferencias significativas respecto a su testigo ($F_{7,38}$=0.84 p=0.8406); no obstante, a partir de la concentración 9.7E-4mM,

la sobrevivencia presentó una tendencia a disminuir conforme se incrementaba la concentración de MMS.

Tampoco la proporción sexual de las moscas recobradas se afectó por la exposición a MMS ($F_{7,38}$=0.5 p=0.8285) como se muestra en los resultados de la tabla 1.

Tabla 1. Sobrevivencia y Proporción sexual de las moscas silvestres expuestas a MMS

[mM] MMS	Total de moscas	S ± ee	d	Psx ♀ ± ee	Psx ♂ ± ee	f
testigo	136	66.00 ± 11.30	a	0.50 ± 0.06	0.50 ± 0.06	a
2.40E-04	117	65.83 ± 14.17	a	0.53 ± 0.07	0.47 ± 0.07	a
3.90E-04	74	55.33 ± 15.41	a	0.54 ± 0.05	0.46 ± 0.05	a
9.70E-04	53	65.40 ± 15.35	a	0.51 ± 0.05	0.49 ± 0.05	a
1.56E-02	112	56.17 ± 12.19	a	0.53 ± 0.07	0.47 ± 0.07	a
6.25E-02	69	53.83 ± 14.25	a	0.44 ± 0.04	0.56 ± 0.04	a
1.25E-01	97	49.33 ± 8.70	a	0.48 ± 0.07	0.52 ± 0.07	a
1.00E+00	27	38.20 ± 12.55	a	0.56 ± 0.09	0.44 ± 0.09	a
5.00E+00	0	0.00				
1.00E+01	0	0.00				

S, sobrevivencia; Psx ♀, proporción sexual de hembras recobradas; Psx ♂, proporción sexual de machos recobradas; ee, error estándar. De elaboración de propia.

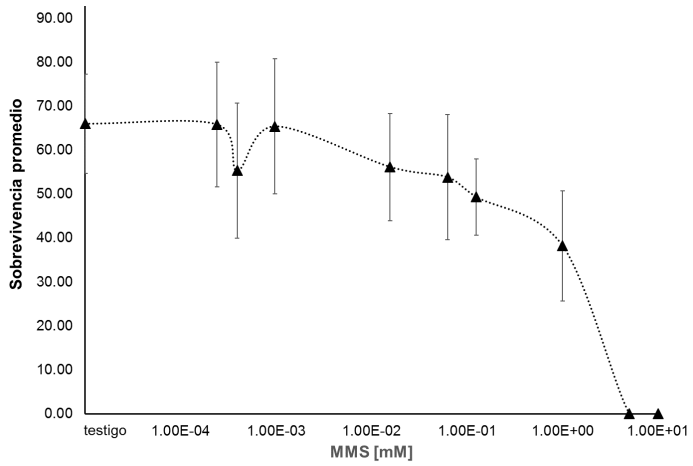


Fig. 2 Sobrevivencia promedio de las moscas expuestas a MMS. De elaboración propia.

Con la finalidad de evaluar si se afecta la capacidad reproductiva de las moscas expuestas a MMS en función del progenitor que recibió el tratamiento, se realizaron tres esquemas de cruzas progenitoras: solo hembras tratadas (T X NT), únicamente machos tratados (NT X T) y ambos progenitores tratados (T X T). En la tabla 2 se muestra el resumen de los resultados obtenidos para los biomarcadores: frecuencia de ovoposición, cantidad de huevos y de progenie adulta recobrada y viabilidad para estimar si la capacidad reproductora de las moscas se afectó por la exposición al MMS

Tabla 2. Biomarcadores de la capacidad reproductora de las moscas expuestas a MMS

Cruza	[mM]	n	% de Ovoposición	d	PH	±	ee	f	PA	±	ee	f	% de Viabilidad	d
T x NT	testigo	40	67.50	-	9.89	±	1.65	-	10.95	±	1.69	-	90.26	-
	2.40E-04	40	60.00	-	7.83	±	1.42	-	7.95	±	1.44	-	84.57	-
	3.90E-04	35	31.43	*	8.09	±	1.92	-	9.22	±	1.96	-	93.26	-
	9.70E-04	34	47.06	-	6.44	±	0.97	-	5.93	±	0.87	-	86.41	-
	1.56E-02	39	53.85	-	8.05	±	1.34	-	7.26	±	1.39	-	81.66	*
	6.25E-02	31	64.52	-	10.25	±	2.00	-	9.50	±	2.09	-	74.15	*
	1.25E-01	40	65.00	-	7.85	±	1.16	-	7.12	±	1.00	-	97.06	*
	1.00E+00	32	46.88	-	8.60	±	1.36	-	7.40	±	1.33	-	86.05	-
NT x T	testigo	40	67.50	-	5.63	±	0.91	-	5.56	±	0.97	-	91.45	-
	2.40E-04	25	28.00	*	7.50	±	2.37	-	6.54	±	0.90	-	94.87	-
	3.90E-04	27	62.96	-	6.41	±	0.87	-	6.19	±	0.83	-	90.83	-
	9.70E-04	26	38.46	*	5.60	±	0.92	-	5.22	±	0.78	-	83.93	-
	1.56E-02	40	55.00	-	6.77	±	1.14	-	6.39	±	1.20	-	77.18	*
	6.25E-02	40	40.00	*	10.75	±	2.57	-	11.38	±	2.84	-	52.91	*
	1.25E-01	39	33.33	*	9.69	±	2.46	-	15.00		--	-	11.90	*
	1.00E+00	25	20.00	*	13.20	±	6.92	-	28.00		--	-	42.42	*
T x T	testigo	40	65.00	-	6.65	±	0.71	-	5.96	±	0.76	-	86.13	-
	2.40E-04	40	52.50	-	7.86	±	1.21	-	7.38	±	1.26	-	93.94	*
	3.90E-04	27	62.96	-	10.59	±	2.68	-	10.38	±	2.65	-	92.22	-
	9.70E-04	25	28.00	*	4.29	±	1.04	-	4.60	±	1.47	-	76.67	-
	1.56E-02	40	67.50	-	6.33	±	1.38	-	6.41	±	1.65	-	82.46	-
	6.25E-02	25	36.00	*	7.44	±	2.22	-	7.57	±	2.26	-	79.10	-
	1.25E-01	32	31.25	*	9.10	±	2.09	-	9.71	±	2.62	-	74.73	*
	1.00E+00	15	20.00	*	11.00	±	2.00	-	0.00				0.00	

n, número de parejas; PH, promedio de huevos por pareja; PA, progenie promedio por pareja: T x NT, cruza hembras tratadas con machos no tratados; NT x T, cruza de hembras no tratadas con machos tratados; T x T, cruza de hembras y machos tratados. ee, error estándar; d prueba de Z para proporciones; f, prueba de ANOVA. * indica diferencias significativas respecto al testigo correspondiente y - -, señala que en la concentración 1.25 E-1mM y 1 mM no se pudo obtener el promedio, sólo se recobró progenie adulta de una hembra. De elaboración propia.

En la cruza en la que únicamente las hembras fueron las expuestas a MMS, (T x NT) la frecuencia de ovoposición a la concentración 3.9 E-4 mM fue menor que la del testigo (Z=3.117, P=0.0009). Mientras la frecuencia de ovoposición se afectó en la mayoría de las concentraciones: 2.4E-4 mM (Z=3.102, P=0.0009), 9.7E-4 mM (Z=2.323 P=0.01), 6.25E-2 mM (Z=2.467 P=0.0068), 1.25E-1 mM (Z=3.034 P=0.0012) y 1 mM (Z=3.727 P<0.0001), cuando los machos expuestos se cruzaron con hembras no tratadas (NT x T). En la cruza donde ambos progenitores fueron expuestos, las concentraciones 9.7E-4 mM (Z=2.903 P=0.0019), 6.25E-02 mM (Z=2.282 P=0.0112), 1.25E-1 mM (Z=2.846 P=0.0022) y 1 mM (Z=2.977 P=0.0015), presentaron menor frecuencia de ovoposición que el testigo.

En la figura tres, se compara la frecuencia de ovoposición de los tres sistemas de cruza, en las tres concentraciones más altas de MMS (6.25E-2 mM, 1.25E-1 mM y 1 mM) la frecuencia de ovoposición de las cruzas (NT x T) y (T x T) fue significativamente menor que en la cruza (T x NT). En la concentración 2.4E-4 mM, la frecuencia de ovoposición sólo mostró diferencias significativas entre la cruza (T x NT) y (NT x T). En cambio, en la concentración 3.9E-4mM la frecuencia de ovoposición de las cruzas (NT x T) y (T x T) fue mayor que en la cruza (T x NT). Estos resultados evidencian que existe una respuesta diferencial en la frecuencia de ovoposición dependiendo de cuál de los progenitores fue expuesto.

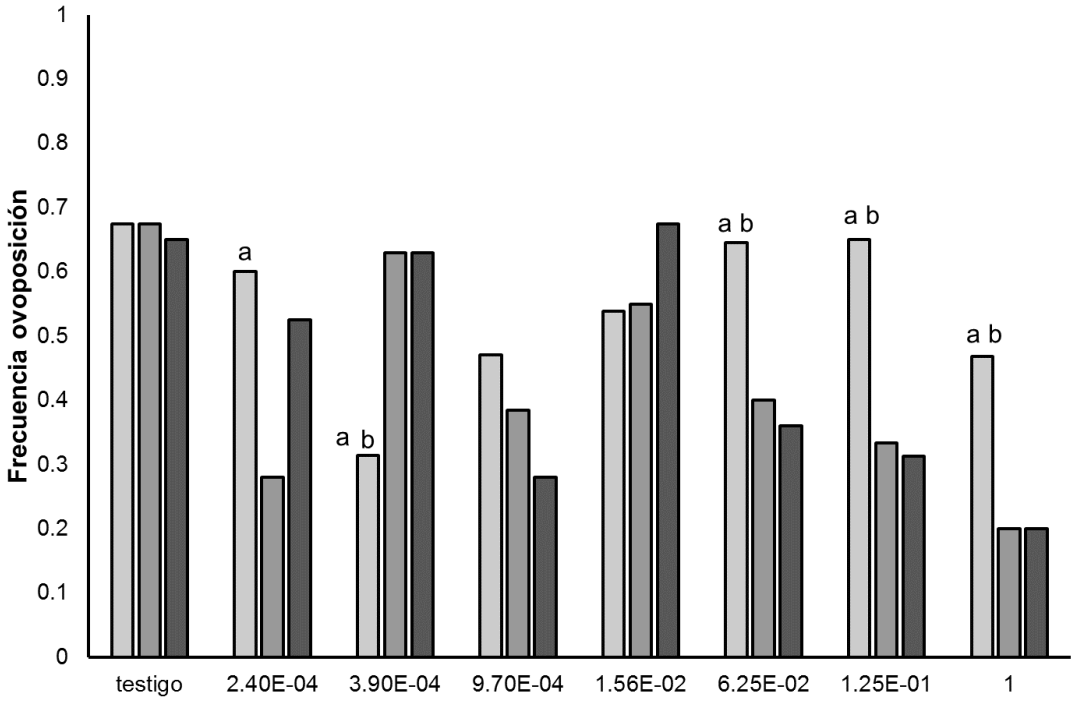
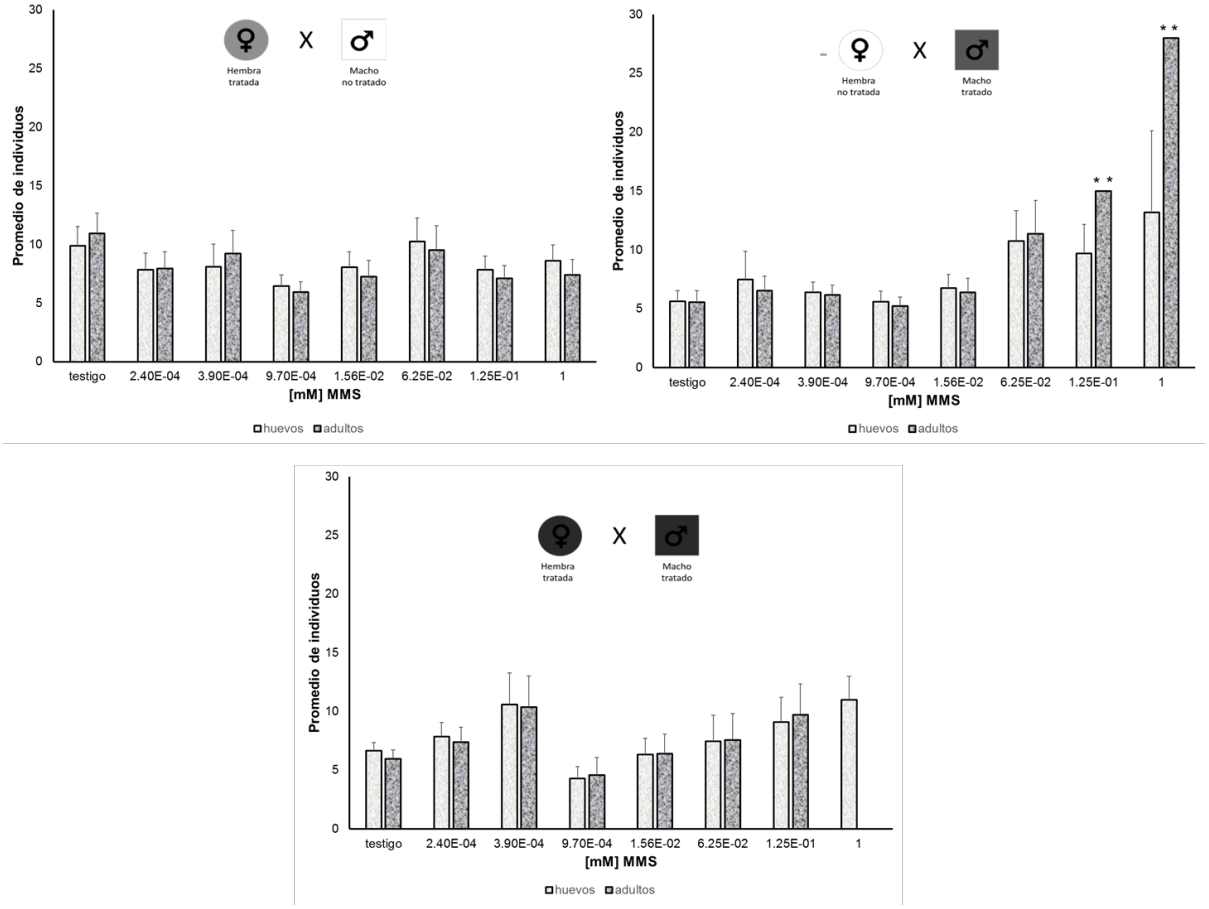


Fig. 3 Comparación de la frecuencia de ovoposición para los diferentes esquemas de cruza.

Para cada esquema de cruza, de las hembras que ovopositaron se contó la cantidad de huevos. El número de huevos promedio que ovopositaron las hembras tratadas cruzadas con machos no tratados mostró una tendencia a ser menor que el testigo en la mayoría de las concentraciones de MMS excepto en 6.25E-2mM (Fig.4).



El ** indica que en las concentraciones 1.25 E-1mM y 1 mM no se pudo obtener el promedio ya que sólo se recobró progenie adulta de una hembra. De elaboración propia.

Fig. 4 Promedio del número de huevos y adultos recobrados de moscas expuestas a MMS.

En las cruzas (NT x T) y (T x T) el número de huevos promedio presentó una tendencia a aumentar respecto a su testigo en la mayoría de las concentraciones de MMS, excepto en la concentración 9.7E-4 mM de la cruza (NT x T) y en las concentraciones 9.7E-4 mM y 1.56E-2 mM de la cruza (T x T) (Fig.4).

Al comparar la cantidad de huevos registrados mediante el índice promedio de huevos entre los diferentes esquemas de cruza se encontró que en todas las concentraciones la cantidad de huevos en la cruza donde las hembras progenitoras fueron expuestas es menor que los obtenidos en las cruzas donde los machos progenitores fueron expuestos (NT x T) y (T X T) como se muestra en la figura 5.

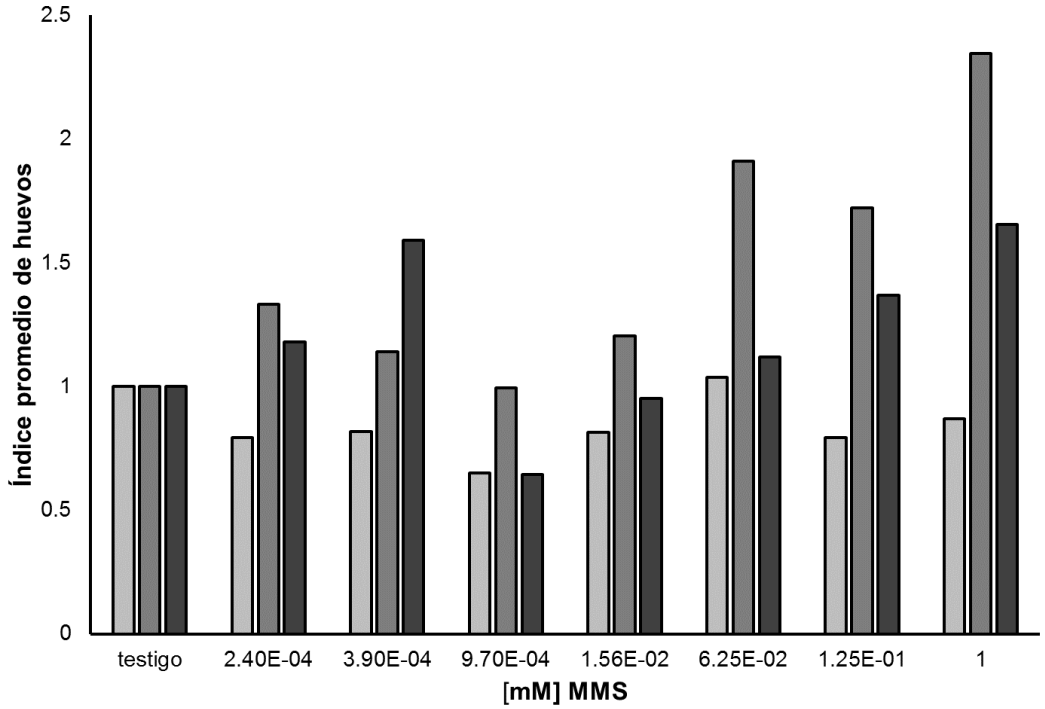


Fig. 5 Comparación del índice promedio de huevos de los diferentes esquemas de cruzas . De elaboración propia.

Estos resultados sugieren que la cantidad de huevos ovopositados por las hembras es diferente dependiendo de si el progenitor expuesto fue la hembra, el macho o ambos progenitores.

Posteriormente se evaluó la cantidad de progenie adulta recobrada en los tubos en los que se contó el número de huevos. La progenie adulta promedio no mostró diferencias significativas respecto a su testigo para la prueba de ANOVA de una vía en ninguno de los esquemas de cruza (Tabla 2).

No obstante, en la figura 4 se observa que la progenie adulta promedio recobrada en las diferentes concentraciones de la cruza (T x NT) presentó una

tendencia a ser menor en todas las concentraciones de MMS respecto a su testigo. En la cruza (NT x T), en la mayoría de las concentraciones se obtuvo más cantidad de progenie adulta promedio que en el testigo, excepto en la concentración 9.7E-4 mM. En las concentraciones 1.25E-1 mM y 1 mM exclusivamente se recobró progenie adulta de una hembra.

Para la cruza (T x T) en las dos concentraciones más bajas (2.4E-4 mM y 3.9 E-4 mM) se incrementó la cantidad de progenie en comparación con su testigo. Mientras que en la concentración superior inmediata 9.7E-4 mM la cantidad de progenie disminuyó respecto a su testigo y a partir de esa concentración la cantidad de progenie se incrementó conforme aumentaba la concentración de MMS hasta la concentración más alta 1 mM, en la cual no se recobró progenie adulta (Fig.4).

En la figura 6 se compara la cantidad de progenie adulta de los tres sistemas de cruza únicamente de las concentraciones en las que se recobró progenie de dos o más hembras mediante el índice de progenie adulta promedio. En las concentraciones más bajas 2.4E-4 mM, 3.9E-4 mM y 1.56E-2 mM la cantidad de progenie obtenida en la cruza donde las progenitoras hembras fueron tratadas fue menor que la cantidad de progenie adulta de las cruzas donde el macho fue expuesto (NT x T) y (T x T).

Con la cantidad total de huevos y de adultos recobrados en el testigo y en cada concentración se estimó la viabilidad huevo-adulto, La tabla 2 muestra el porcentaje de viabilidad de la progenie de los tres esquemas de cruza. Cuando las hembras fueron tratadas con MMS, la viabilidad disminuyó significativamente comparada con el testigo en las concentraciones 1.56E-2 mM ($Z=2.597$, $P=0.0047$), y 6.25E-2 mM ($Z=4.649$, $P<0.0001$), mientras que en la concentración 0.125 mM la viabilidad fue mayor, respecto a su testigo ($Z=2.905$, $P=0.0018$).

La viabilidad disminuyó significativamente en las concentraciones más altas 1.56 E-2 mM ($Z=3.409$, $P=0.0003$), 6.25E-2 mM ($Z=7.629$, $P<0.0001$), 0.125 mM ($Z=13.282$, $P<0.0001$) y 1 mM ($Z=7.856$, $P<0.0001$), respecto a su testigo, para la cruza (NT x T). Cuando ambos progenitores fueron expuestos, la viabilidad fue del 0 % en la concentración más alta (1 mM), es decir, de los huevos ovopositados ninguno completó su desarrollo a adulto, mientras que en la concentración 1.25E-1 mM la viabilidad fue significativamente menor que la del testigo ($Z=2.302$ $P=0.0107$).

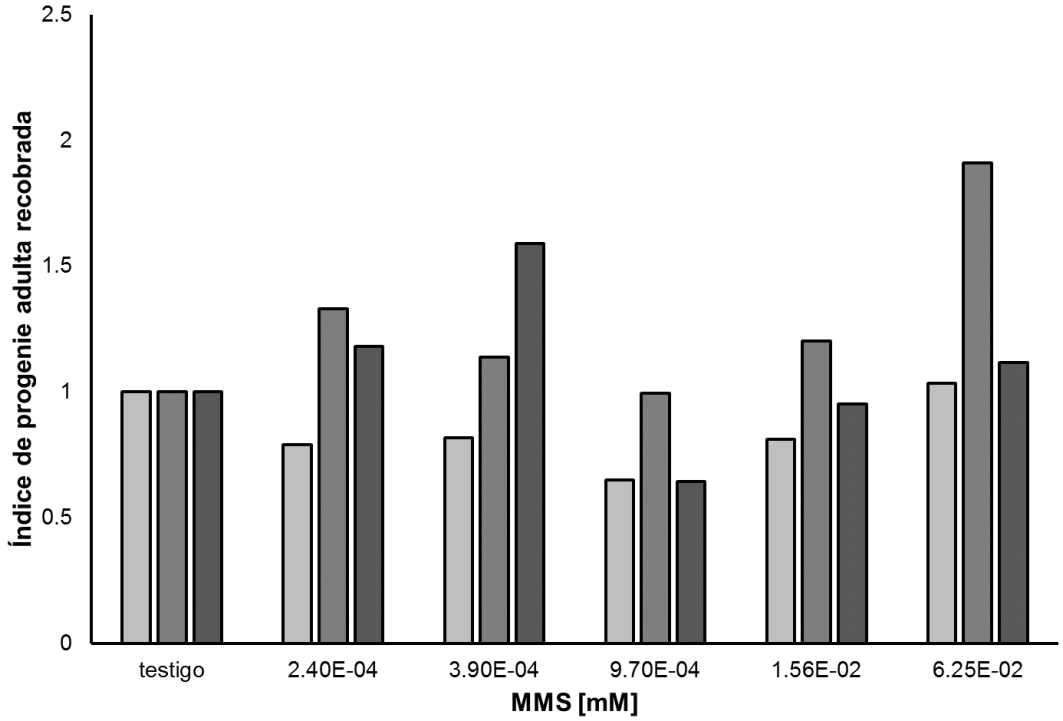


Fig. 6 Comparación del índice promedio de la cantidad de progenie adulta de los diferentes esquemas de cruzas.

Al comparar la viabilidad de la progenie de los diferentes esquemas de cruza se observó una respuesta diferencial dependiendo el progenitor que fue expuesto, esta diferencia fue más evidente y estadísticamente significativa en las concentraciones más altas, siendo las cruzas en los que el progenitor macho fue expuesto a MMS las afectadas (Fig.7).

Una menor viabilidad significa que durante el desarrollo huevo-adulto se perdieron individuos, se calculó el número de adultos que no completaron su desarrollo de lote testigo y de las diferentes concentraciones de MMS para cada esquema de cruza. En la cruza (T x NT) no se encontraron diferencias significativas respecto a su testigo ($F_{7,65}$=4.22, p=0.0003; q=0.05). En la cruza (NT x T), la cantidad de individuos que no completaron su desarrollo se incrementó a partir de la concentración 9.7E-4 mM en comparación con su testigo, pero únicamente fue estadísticamente significativa en la concentración 1.25E-1 mM ($F_{7,65}$=4.22, p=0.0003; q=0.0052). Para la cruza (T x T) la pérdida de organismos fue estadísticamente mayor en la concentración 1 mM en comparación con su testigo ($F_{7,65}$=4.22, p=0.0003; q=0.0038).

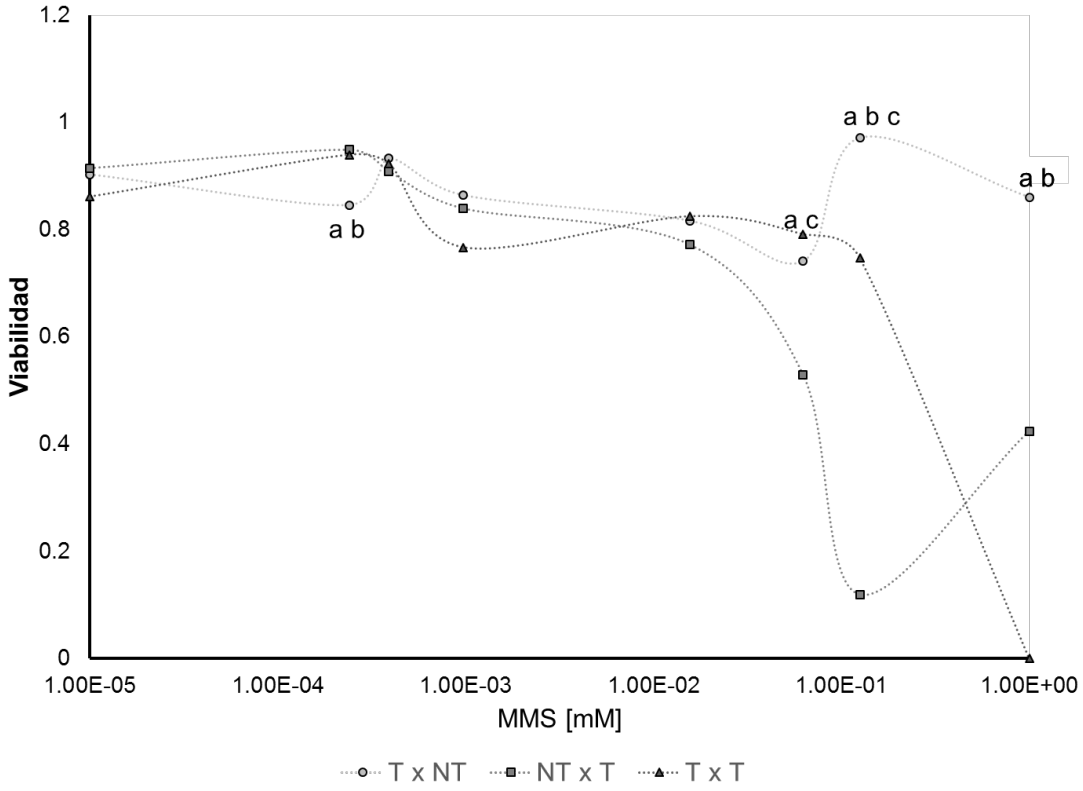
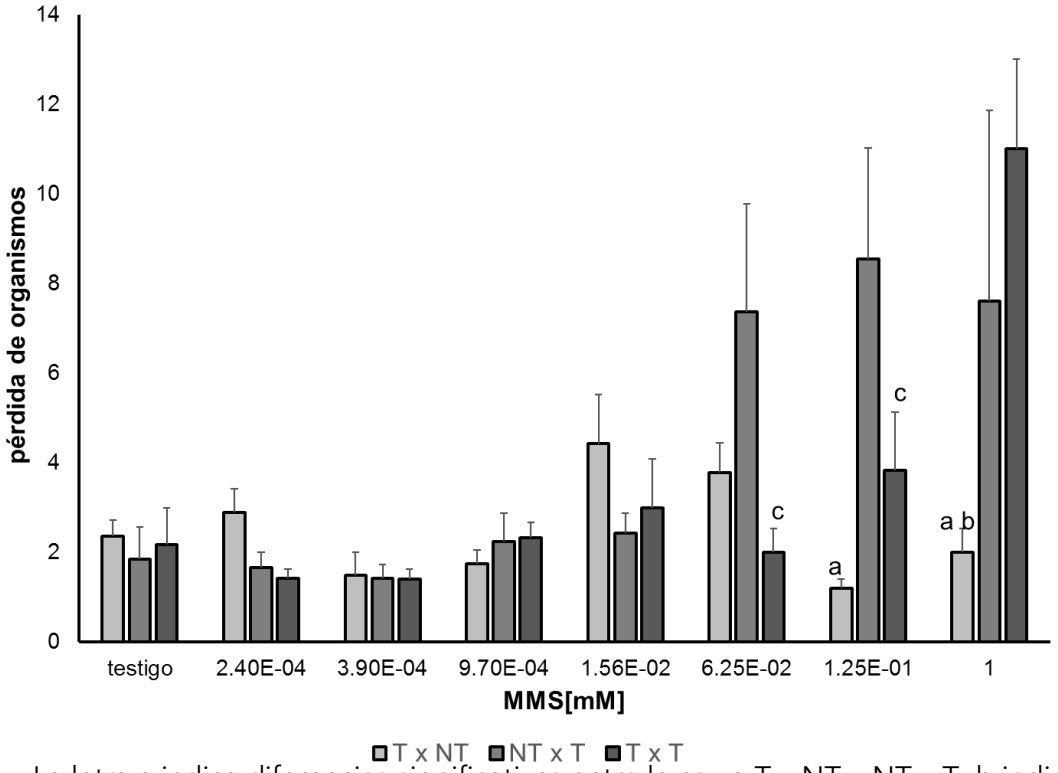


Fig. 7 Comparación del promedio de viabilidad para cada esquema de cruza.

En la figura 8 se compara el promedio del número de organismos no viables. En esta imagen se observa que la pérdida de organismos fue mayor en las concentraciones más altas de MMS cuando la progenie descendía de machos expuestos, que cuando los individuos provenían de la cruza en la que solo las hembras fueron expuestas.

Se encontraron diferencias significativas entre las cruzas (T x NT) y (NT x T) en las concentraciones más altas: 1.25E-1 mM y 1 mM ($F_{14,165}$=2.586, p=0.0021; q=0.0008; q=0.0228). También se obtuvieron diferencias entre las cruzas (T x NT) y (T x T) en la concentración más alta 1 mM ($F_{14,165}$=2.586, p=0.0021; q=0.0013). Entre las cruzas (NT x T) y (T x T) hubo diferencias significativas en las concentraciones 6.25E-2 mM y 1.25E-1 mM ($F_{14,165}$=2.586, p=0.0021; q=0.0102; q=0.0327).



La letra a indica diferencias significativas entre la cruza T x NT y NT x T; b indica diferencias significativas entre la cruza T x NT y T x T; c, indica diferencia significativas ente la cruza NT x T y T x T para la prueba de ANOVA de dos vías p=0.0021. De elaboración propia.

Fig. 8 Comparación de la pérdida de organismos durante el desarrollo huevo-adulto de los diferentes esquemas de cruza.

3. Discusión

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de dejar descendencia; para una reproducción exitosa, es fundamental la integridad biológica de los organismos (Williamson and Lehmann, 1996). Existe evidencia de que los contaminantes ambientales pueden afectar los procesos reproductivos regulares (Parodi *et al.*, 2015) y ocasionar trastornos de la reproducción, estos trastornos se han convertido en un problema de salud humana y ambiental y ponen en riesgo la preservación de algunas especies (EPA, 1996; VanDerOost, Porte-Visa and Van-den-Brink, 2005).

Las alteraciones, ocasionadas por agentes químicos o físicos, pueden afectar los sistemas reproductivos femenino y masculino en cualquier momento del ciclo de vida, la exposición a tóxicos durante las primeras etapas del desarrollo ocasiona alteraciones en la capacidad reproductiva posterior al momento de la exposición e incluso en las generaciones siguientes (EPA, 1996; Ferreira and Allard, 2015).En este trabajo se evaluó la capacidad reproductora de *D. melanogaster* hembras y machos expuestos a MMS en etapas tempranas (estadio larvario), para observar si existen diferencias dependiendo del progenitor expuesto.

1.Efecto tóxico y toxicidad reproductiva del MMS

A partir de la concentración 9.7E-4 mM, la sobrevivencia mostró un comportamiento lineal, siguiendo el modelo clásico de dosis - respuesta que asume que en las concentraciones mayores hay mayor efecto (Klaassen and .John, 2005), pues conforme incrementa la concentración de MMS, el promedio de adultos recobrados después del tratamiento en la etapa larvaria disminuye entre un 20% a 40 % en comparación con el testigo.

A diferencia de otros estudios, en los cuales el porcentaje de adultos emergidos de larvas alimentadas con aflatoxina B (Chinnici, Booker and Llewellyn, 1976), N-nitrosodimetilamina (Castro, 2010) presenta un efecto más adverso en los machos que en las hembras. En este estudio, la exposición a MMS afectó de la misma manera a hembras y machos, ya que la proporción sexual de los organismos recobrados se mantuvo en una proporción aproximada de 0.5, la cual corresponde a la probabilidad de tener un macho o una hembra de acuerdo a los mecanismos de determinación del sexo en *Drosophila* (Salz and Erickson, 2010).

Por lo tanto, el MMS es un compuesto que compromete la sobrevivencia de los individuos expuestos indistintamente del sexo que tenga, es decir, la toxicidad de dicho compuesto afecta de manera similar tanto a hembras como machos. Este efecto puede atribuirse a que el MMS tienen un mecanismo de acción directa (Wyatt and Pittman, 2006), además de que la organización morfológica y metabólica de las hembras y machos de *D. melanogaster* durante la tapa larvaria es muy similar (Clark, 1982).

A diferencia de la respuesta lineal observada en la toxicidad del MMS, en los diferentes biomarcadores utilizados para evaluar la capacidad reproductora, no se encontró una respuesta semejante, esto coincide con que la respuesta del efecto reprotóxico no es lineal (EPA, 1996), y con la respuesta no lineal observada en radiaciones y algunos compuestos en concentraciones bajas (Calabrese and Baldwin, 2003).

El efecto no lineal está basado en mecanismos homeostáticos, compensatorios o adaptativos que deben superarse antes de que un punto crítico se manifieste en una respuesta tóxica en este caso en las células y órganos del

sistema reproductor (Lovell, 2000; Calabrese and Baldwin, 2001).Con base en los resultados obtenidos, la concentración 9.7E-4 mM podría establecerse como un punto crítico en la respuesta biológica por la exposición de MMS.

Esto debido a que en los tres esquemas de cruza (T x NT), (NT x T) y (T x T) en esta concentración se obtuvo el menor número de huevos ovopositados y la menor cantidad de progenie adulta (Fig. 4), además de que la tendencia en estos biomarcadores antes y después de esta concentración fue diferente. También en la viabilidad de los tres esquemas de cruza, la tendencia se modificó antes y después de esta concentración.

.

2. ¿La capacidad reproductora de hembras y machos expuestos a MSS fue similar?

Actualmente se sabe que en los organismos con reproducción sexual existe una contribución diferencial entre las aportaciones de ambos progenitores, debido a que las células germinales de las hembras aportan proteínas, RNAs y organelos que en los gametos masculinos están ausentes (Greiner, Sobanski and Bock, 2015; Despic *et al.*, 2017).

A pesar de estas diferencias, en las consideraciones del foro de riesgo de la EPA, se indica que los efectos de los genotóxicos en los procesos reproductores de hembras y machos son similares y que en primera instancia se asume que un agente que afecte la función reproductiva en un sexo afectará al otro sexo, hasta que se demuestre lo contrario (EPA, 1996).

En este trabajo se obtuvieron resultados que evidencian que existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductora dependiendo de cuál de los progenitores fue expuesto. Los biomarcadores utilizados: frecuencia de ovoposición, número de huevos ovopositados, la cantidad de progenie adulta, y viabilidad se vieron altamente afectados en las cruzas que involucraban los progenitores machos (NT x T y T x T) mientras que los efectos aparentemente más leves se observaron en la cruza (T X NT).

La frecuencia de ovoposición indica el porcentaje de hembras que ovopositaron al menos un huevo, en las cruzas que involucraban la exposición del progenitor macho (NT x T) y (T x T) se encontró una disminución significativa en este marcador, es decir, muy pocas hembras pusieron huevos. Esto sugiere que independientemente de que las hembras sean expuestas o no, hay un factor proveniente de los machos tratados con MMS que contribuye a inhibir la puesta de huevos de las hembras.

En cambio, cuando las hembras son expuestas a MMS y los machos no, la frecuencia de ovoposición no disminuye significativamente, estos resultados no corresponden con nuestra hipótesis de que el mayor daño se esperaría observar

cuando la hembra es tratada debido al aporte citoplasmático (Dworkin and Dworkin-Rastl, 1990; Mousseau and Fox, 1998).

En un estudio ha encontrado disminución en la producción de huevos cuando los adultos de *D. melanogaster* fueron alimentados con 0.005% de aflatoxina (Matsumura and Knight, 1967), en cambio, el tratamiento con MMS no mostró diferencias en ningún esquema de cruza en el número promedio de huevos ovospositados. Sin embargo, se observaron tendencias diferentes entre los esquemas de cruza.

Como se discutió anteriormente, las cruzas (NT x T) y (T x T) tuvieron menor frecuencia de ovoposición, sin embargo, las pocas hembras que ovopositaron, mostraron una tendencia a poner una mayor cantidad de huevos. Esto significa que el tratamiento de los machos no sólo inhibió que algunas hembras pusieron huevos, sino que al mismo tiempo estimuló a algunas hembras a que liberaran una mayor cantidad de huevos.

En cambio, en la cruza (T X NT) hubo una mayor proporción de hembras que ovopositaron, pero el número de huevos que pusieron fue menor en todas las concentraciones. Esta tendencia puede ser un indicador de que existe un mecanismo en el que las hembras seleccionan los huevos que se encuentran en mejores condiciones, dado que esta tendencia no se encontró en las otras cruzas podría sugerirse que dicha selección ocurre en etapas muy tempranas durante la ovogénesis.

En otros estudios, la cantidad de progenie adulta proveniente de moscas expuestas durante el tercer estadio de larvas se ha visto afectada significativamente. Hembras alimentadas con aflatoxina B (674 ppb) mostraron disminución en el número de progenie adulta (Chinnici, Booker and Llewellyn, 1976), en machos alimentados con colchicina (1.53 E-05 mM y 1.56 E-02 mM) también se redujo la cantidad de progenie (Alonso, 2017); mientras que machos expuestos a azida de sodio aumentó la cantidad de progenie F_2 (Arroyo, 2014).

En este trabajo, la cantidad de adultos promedio no mostró diferencias significativas en ninguno de los esquemas de cruza, esto se debe en parte a que el tiempo de ovoposición fue de 8 horas, en comparación con los otros estudios en los que la ovoposición fue de 5 y 6 días. Además, en la cruza (NT x T) en las dos concentraciones más altas la progenie recobrada proviene exclusivamente de una pareja, lo que sugiere que hay otro proceso de selección, pues los organismos que se recobran solo provienen de un mínimo de parejas.

El biomarcador de la cantidad de adultos promedio no reflejó que estén perdiéndose organismos en la población, pero al evaluar la viabilidad se evidencia que el número de individuos que completa su desarrollo huevo-adulto es muy reducido en las concentraciones más altas de MMS principalmente en la progenie proveniente de las cruzas en que el progenitor macho fue expuesto.

Esta pérdida de organismos no se observó en las cruzas provenientes de hembras, estos resultados no coinciden con los resultados reportados en otros modelos en los que se han encontrado efectos reproductivos y el incremento de fetos vivos con malformaciones por la inyección intraperitoneal de MMS hembras adultas de *Mus musculus* antes y después de copular (Generoso *et al.*, 1991).

3..1 ¿Qué podría explicar las diferencias?

Si bien estos resultados muestran una respuesta diferencial entre hembras y machos se contraponen con lo esperado, pues se esperaría que la capacidad reproductora de las hembras expuestas se afectara más que la de los machos debido a que las hembras invierten más recursos citoplasmáticos, transcripcionales y proteicos en la producción de progenie (Mousseau and Fox, 1998).

Esta aparente contradicción pone en evidencia que la visión clásica en la que los machos solo son un vehículo para entregar la mitad del componente genético que formará al nuevo individuo es limitada (Crean and Bonduriansky, 2014). En los últimos años se ha demostrado que los machos también aportan proteínas y RNA que desempeñan un papel esencial en la formación de los nuevos individuos de manera indirecta pues ejercen sus efectos en todas las fases de la biología reproductiva de la hembra apareada (Gillott, 2003; Hosken and Hodgson, 2014).

La presencia de estos componentes masculinos puede modular diferentes procesos desde el momento en que el esperma se deposita en el tracto reproductivo hasta la deposición de huevos que incluyen protección de esperma, almacenamiento y activación, competición espermática, inducción de la refractariedad, la fecundidad, ovulación, oviposición y protección de huevos puestos por la hembra (Gillott, 2003; Adams and Ã, 2007).

En *Drosophila melanogaster* se han descrito tres componentes proteicos: ovulina (ACP26Aa), péptido sexual (SP) y DUPQ9B que se producen en la glándula accesoria y que se transmiten en el líquido seminal durante el apareamiento, los cuales están involucrados en la ovulación, ovoposición y viabilidad de los huevos (Kubli, 2003; Adams and Ã, 2007).

La inhibición de la ovoposición podría deberse a algunos de los componentes del líquido seminal, entre ellos podrían estar involucrados los péptidos ACP26A, SP y DUPQ9B, que de manera regular promueven la ovulación, ovoposición e incluso la viabilidad de los huevos (Heifetz *et al.*, 2000; Kubli, 2003) , la exposición a MMS podría modificar la estructura de estos péptidos o disminuir su cantidad alterando su función.

La disminución de la sobrevivencia fue igual para machos y hembras, si el MMS no afectara a las hembras se hubiese esperado encontrar una proporción mayor de hembras que de machos, lo cual no se observó en los resultados, pues mostraron una proporción alrededor de 0.5. Por lo tanto, deben existir algunos mecanismos que permitan a las hembras amortiguar el efecto de la exposición a MMS.

Uno de estos mecanismos podría implicar autorregulación de las hembras o a que el aporte del esperma y del líquido seminal de los machos no tratados es suficiente para estimular de manera regular la ovoposición.

4. Conclusión

Los resultados obtenidos evidencian que existe una respuesta diferencial en la capacidad reproductora estimada con la frecuencia de ovoposición, número de huevos y cantidad de progenie adulta, así como viabilidad y pérdida de la descendencia dependiendo del progenitor sometido a estrés genotóxico.

La respuesta diferencial es más evidente en las concentraciones más altas, los resultados para los biomarcadores estudiados señalan que existen al menos tres mecanismos que podrían explicar parcialmente las diferencias entre la respuesta de hembras tratadas, machos tratados o ambos progenitores:

- Selección individuos (hembras): evidenciado en la disminución de la frecuencia de ovoposición.
- Selección precigótica: disminución de la cantidad de huevos.
- Selección posticigótica; baja viabilidad e incremento de la pérdida de organismos durante el desarrollo.

La selección de hembras y posticigótica podría estar regulada por los componentes del esperma y el líquido seminal de los machos aportados a la hembra durante el apareamiento.

Agradecimientos

Posgrado Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Autónoma de México

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No.630455

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) proyecto IN229719.

Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental Banco de Moscas-Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos técnicos a la Dra. Adriana Muñoz Hernández

5. Referencias

Adams, E. M. and Ã, M. F. W. (2007) 'Seminal proteins but not sperm induce morphological changes in the Drosophila melanogaster female reproductive tract during sperm storage', *Journal of Insect Physiology*, 53, pp. 319–331. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.12.003.

Adams, M. *et al.* (2000) 'The genome sequence of Drosophila melanogaster', *Science*, 287(March), pp. 2185–2195. doi: 10.1126/science.287.5461.2185.

Allard, P. (2015) 'Emerging toxicity models from emerging scientists', *Toxicology Research*. Royal Society of Chemistry, 4(3), pp. 545–547. doi: 10.1039/C4TX00085D.

Alonso, T. (2017) *Pérdida cromosómica en dos generaciones sexuales sucesivas después de una única administración del citostático colchicina en machos de Drosophila melanogaster*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Arroyo, E. (2014) *Efecto recombinogénico de la azida de sodio en células germinales de Drosophila melanogaster*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Avanesian, A., Semnani, S. and Jafari, M. (2009) 'Can Drosophila melanogaster represent a model system for the detection of reproductive adverse drug reactions?', *Drug Discovery Today*, 14(15–16), pp. 761–766. doi: 10.1016/j.drudis.2009.05.010.

Baars, A. J. *et al.* (1977) 'The occurrence of cytochrome P450 and arly hydrocarbon hydroxylase activity in Drosophila malanogaster microsomes,and the importance of this metabolizing capcity for the screening of carcinogenic and mutagenic properties of foreign compounds', *Mutation research*, 44, pp. 257–267.

Beranek, D. (1990) 'Distribution of methyl and ethyl adducts following alkilation with monofunctional alkilating agents', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 231(1), pp. 11–30.

Calabrese, E. and Baldwin, L. (2001) 'Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology', *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(6), pp. 285–291.

Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2003) 'The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology', *Toxicological Sciences*, 71(2), pp. 246–250. doi: 10.1093/toxsci/71.2.246.

Castro, C. (2010) *La taurina modifica la toxicidad y genotoxicidad inducida por la NDMA (N-nitrosodimetilamina) en Drosophila melanogaster*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Chinnici, J. P., Booker, M. A. and Llewellyn, G. C. (1976) 'Effect of aflatoxin B1 on viability, growth, fertility, and crossing over in Drosophila melanogaster (Diptera)', *Journal of Invertebrate Pathology*, 27(2), pp. 255–258. doi: 10.1016/0022-2011(76)90154-3.

Clark, A. M. (1982) 'The use of laverl stages of Drosophila in screening for some naturally ocurring mutagens', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 92(1–2), pp. 89–97.

Crean, A. J. and Bonduriansky, R. (2014) 'What is a paternal effect?', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 29(10), pp. 554–559. doi: 10.1016/j.tree.2014.07.009.

Darroudi, F., Natarajan, A. T. and Lohman, P. H. M. (1989) 'Cytogenetical characterization of UV-sensitive repair-deficient CHO cell line 43-3B II. Induction of cell killing, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by 4NQO, mono- and bi-functional alkylating agents', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 212(2), pp. 103–112.

Despic, V. *et al.* (2017) 'Dynamic RNA-protein interactions underlie the zebrafish maternal-to-zygotic transition', *Genome Research*, 27(7), pp. 1184–1194. doi: 10.1101/gr.215954.116.

Dworkin, M. B. and Dworkin-Rastl, E. (1990) 'Functions of maternal mRNA in early development', *Molecular Reproduction and Development*, 26(3), pp. 261–297. doi: 10.1002/mrd.1080260310.

Eder, E., Deininger, C. and Wiedenmann, M. (1989) 'Methyl methenesulphonate (MMS) is clearly mutagenic in S. typhimurium strain TA1535; a comparison with strain TA100', *Mutation research*, 226, pp. 145–149.

EPA (1996) 'Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment', *Risk Asssesment Forum U.S.Environmental Protection Agency*, 61(October), pp. 56274–

56322.

Ferreira, D. W. and Allard, P. (2015) 'Models of germ cell development and their application for toxicity studies', *Environmental and Molecular Mutagenesis*. doi: 10.1002/em.21946.

De Flora (1981) 'Study of 106 organic and inorganic compounds in the Salmonella/microsome test', *Carcinogenesis*, 2, pp. 283–298.

Generoso, W. M. *et al.* (1991) 'Developmental response of zygotes exposed to similar mutagens', *Mutation research*, 250, pp. 439–446.

Gillott, C. (2003) 'Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior', *Annual Review of Entomology*, 48(1), pp. 163–184. doi: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112657.

Greiner, S., Sobanski, J. and Bock, R. (2015) 'Why are most organelle genomes transmitted maternally?', *BioEssays*, 37(1), pp. 80–94. doi: 10.1002/bies.201400110.

Gupta, S. C. *et al.* (2007) 'Adverse effect of organophosphate compounds, dichlorvos and chlorpyrifos in the reproductive tissues of transgenic Drosophila melanogaster: 70 kDa heat shock protein as a marker of cellular damage', *Toxicology*, 238, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.tox.2007.09.023.

Heifetz, Y. *et al.* (2000) 'The Drosophila seminal fluid protein Acp26Aa stimulates release of oocytes by the ovary', *Current Biology*, 10(2), pp. 99–102. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00288-8.

Hellmér, H. and Bolcsfoldi, G. (1992) 'An evaluation of the E.coli K12 uvrB/recA DNA repair host-mediated assay.II. In vivo results for 36 compounds tested in mouse', *Mutation research*, 272, pp. 161–173.

Hosken, D. J. and Hodgson, D. J. (2014) 'Why do sperm carry RNA? Relatedness, conflict, and control', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 29(8), pp. 451–455. doi: 10.1016/j.tree.2014.05.006.

IARC (1990) *IARC Monographs*, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals*.

Klaassen, C. D. and .John, W. (2005) *Casarett y Doull: Fundamentos de*

toxicología. España: McGraw-Hill Companies.

Klungland, A. *et al.* (1995) 'Spectrum of mutations induced by methyl and ethyl methanesulfonate at the hprt locus of normal and tag expressing Chinese hamster fibroblasts', *Carcinogenesis*, 16(6), pp. 1281–1285.

Kubli, E. (2003) 'Cellular and Molecular Life Sciences Sex-peptides : seminal peptides of the Drosophila male *', 60, pp. 1689–1704. doi: 10.1007/s00018-003-3052-5.

Lehmann, R. (2012) 'Germline stem cells: Origin and destiny', *Cell Stem Cell*. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.016.

Lindsley, D. L. and Zimm, G. (1992) *The genome of Drosophila melanogaster*. California.USA: Academic Press, INC.

Lovell, D. P. (2000) 'Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: Statistical models and study design', *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(1), pp. 87–95. doi: 10.1016/S1383-5718(99)00169-2.

Matsumura, F. and Knight, S. G. (1967) 'Toxicity and chemosterilizing activity of aflatoxin against insects', *Journal Econ.Entomol.*, 60, pp. 871–872.

Meza, M. (2015) *Caracterización de la fecundidad como un marcador de resistencia en la respuesta genotóxica inducida por el uretano en Drosophila melanogaster*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Moore, M. M. *et al.* (1989) 'Differential mutant quantitation at the mouse lymphoma tk and cho hgrt loci', *Mutagenesis*, 4(5), pp. 394–403.

Mousseau, T. A. and Fox, C. W. (1998) 'The adaptative significance of maternal effects', *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), pp. 403–407. doi: 10.1016/S0169-5347(98)01472-4.

Munzer, J. S. *et al.* (1988) 'Detection of DNA damage and repair by alkaline elution using human lymphocytes', *Mutation Research/DNA Repair Reports*, 194(2), pp. 101–108.

Natarajan, A. T. and Darroudi, F. (1991) 'Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens', *Mutagenesis*, 6(5),

pp. 399–403.

Nichols, C. D., Becnel, J. and Pandey, U. B. (2012) 'Methods to Assay Drosophila Behavior', *J. Vis. Exp*, (61), pp. 3795–103791. doi: 10.3791/3795.

Nöthiger, R. (1970) 'Sucrose density separation a method for colecting large numbers of Drsophila larvae', *Drosophila Information Service*, (February), p. 1970.

Parkash, R. and Miglani, G. S. (1976) 'Cytological Effects of Three Alkylating Agents in Drosophila', *Cytologia*, 41(March), pp. 639–643. doi: 10.1508/cytologia.41.639.

Parodi, D. *et al.* (2015) 'Reproductive toxicity and meiotic dysfunction following exposure to the pesticides Maneb, Diazinon and Fenarimol', *Toxicology Research*. Royal Society of Chemistry, 4(3), pp. 645–654. doi: 10.1039/c4tx00141a.

Peakall, D. B. (1994) 'The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction', *Ecotoxicology*, 3(3), pp. 157–160. doi: 10.1007/BF00117082.

Ramos-Morales, P. *et al.* (2001) 'Drosophila as a biomonitor of water pollution', in Butterworth, F., Ammara, G., and Gonsebatt, M. E. (eds) *Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental CHange 2*. New York: Kluwer Academmmmic/PlenumPublishers, pp. S120–S120. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T2C-3Y0S01X-K5/2/6e506529341242c0b4699aa485870608.

Salz, H. K. and Erickson, J. W. (2010) 'Sex determination in Drosophila: The view from the top', *Fly*, 4(1), pp. 60–70. doi: 10.4161/fly.4.1.11277.

Sellakumar, A. R., Snyder, C. A. and Albert, R. E. (1987) 'Inhalation carcinogenesis of various alkylating agents', *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 79, pp. 285–289.

Sina, J. F. *et al.* (1983) 'Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potencial', *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(5), pp. 357–391.

Singh, K., Kochar, E. and Prasad, N. G. (2015) 'Egg viability, mating frequency and male mating ability evolve in populations of drosophila melanogaster selected for resistance to cold shock', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0129992.

Slamenová, D. *et al.* (1990) 'Differences between survival, mutagenicity and DNA replication in MMS-and MNU-treated V79 hamster cells', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 228(1), pp. 97–103.

Snyder, C. A. *et al.* (1986) 'Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents', *Cancer Lett*, 33, pp. 175–181.

Sobels, F. H. (1973) '277 t h e advantages of drosophila for mutation studies*', 26, pp. 277–284.

Sobels, F. H. and Vogel, E. W. (1976) 'The capacity of Drosophila for detecting relevant genetic damage', *Mutation Research*, 41, pp. 95–105.

Stoner, G. *et al.* (1986) 'Comparasion of two routes of chemical administration on the lung adenoma response in strain AJ mice', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(1), pp. 19–31.

Trujillo, Y. (2015) *Evaluación del desempeño reproductivo de Drosophila melanogaster en relación con el daño genético*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Valencia, R. *et al.* (1985) 'Chemical mutagenesis testing in Drosophila III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program', *Environmental Mutagenesis*, 7(3), pp. 325–348.

VanDerOost, R., Porte-Visa, C. and Van-den-Brink, N. W. (2005) 'Biomarkers in environmental assessment', in den Besten, P. J. and Munawar, M. (eds) *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems Emerging Techniques, Trends, and Strategies*. 1st edn. New York: CRC PRESS Taylor and Francis Group, pp. 89–152. doi: 10.1201/9781420037500.ch3.

Vogel, E. W. (1987) 'Evalutaion of potential mammalian genotoxins using Drosophila: the need for a change in test strategy', *Mutagenesis*, 2(3), pp. 161–171.

Vogel, E. W. and Nivard, M. J. M. (1997) 'The response of germ cells to ethylene oxide, propylene oxide, propylene imine and methyl methanesulfonate is a matter of cell stage-related DNA repair', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29(2), pp. 124–135. doi: 10.1002/(SICI)1098-2280(1997)29:2<124::AID-EM3>3.0.CO;2-E.

Vogel, E. W. and Zijlstra, J. A. (1987) 'Somatic cell mutagenesis in Drosophila melanogaster in comparison with genetic damage in early germ-cell stages', *Mutation research*, 180, pp. 189–200.

Wakimoto, B. T., Lindsley, D. L. and Herrera, C. (2004) 'Toward a Comprehensive Genetic Analysis of Male Fertility in Drosophila melanogaster', 216(May), pp. 207–216.

Williamson, A. and Lehmann, R. (1996) 'Germ cell development in Drosophila', *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 12, pp. 365–91.

Wyatt, M. D. and Pittman, D. L. (2006) 'Methylating agents and DNA repair responses:methylated bases and sources of strand breaks', *Chem Res Toxicol*, 19(12), pp. 1580–1594. doi: 10.1021/tx060164e.Methylating.

Yauk, C. L. *et al.* (2013) 'Harnessing genomics to identify environmental determinants of heritable disease.', *Mutation research*. Elsevier B.V., 752(1), pp. 6–9. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.002.

Capítulo 28

ANOMALÍAS MACROSCÓPICAS POR EXPOSICIÓN A METALES PESADOS EN LARVAS DE ANFIBIOS ANUROS

David Ramiro Aguillón Gutiérrez*

*davidrag@ujed.mx

Resumen

Los anfibios son el grupo de vertebrados más amenazado en la actualidad. Entre los factores que han propiciado el declive y extinción de algunas poblaciones y especies de anfibios está la contaminación por metales pesados. Debido a procesos industriales y mineros, metales pesados como el plomo y hierro son arrojados al ambiente, llegando así a los cuerpos de agua donde se reproducen y habitan muchas especies de anfibios y otros organismos acuáticos. Las larvas de anfibios anuros son particularmente vulnerables a los impactos de esta contaminación química, pues el contacto con estos elementos tóxicos provoca la aparición de anomalías macroscópicas como la curvatura de la espina, ausencia de extremidades, desarrollo lento e incompleto y anomalías en piel, ojos, boca, branquias y órganos internos, afectando de manera significativa su supervivencia. En esta revisión se presentan algunos trabajos de investigación llevados a cabo en los últimos 25 años sobre anomalías macroscópicas por exposición a metales pesados en larvas de anfibios anuros, además se aborda el tema de las anomalías morfológicas, las generalidades de los anfibios anuros y de su etapa larvaria, la ecotoxicología de los metales pesados, la conservación de anfibios y su utilidad como bioindicadores, y se agrega un glosario de términos médicos y teratológicos. El estudio *in situ* de las anomalías por exposición a metales pesados en larvas de anfibios anuros puede ayudar a generar estrategias de conservación para este grupo biológico, mientras que su estudio ex situ, ofrece información valiosa acerca de la cinética y toxicología de los metales en los organismos.

Palabras clave: Anomalías, metales pesados, larvas, anfibios anuros

1) Anomalías morfológicas macroscópicas

En esta revisión se considera una anomalía macroscópica aquella desviación o cambio morfológico respecto de lo que es normal, que afecta una proporción considerable del cuerpo y que, por tanto, puede ser apreciable a simple vista o bien con ayuda de un estereoscopio.

Las anomalías a su vez pueden dividirse en malformaciones o deformaciones. Una malformación es cuando ocurre un error en la producción y evolución de caracteres morfológicos, y una deformación es cuando se altera la forma o proporción normal de una estructura morfológica. Sin embargo, en muchas ocasiones no es posible determinar si una anomalía es una malformación o deformación (Runnells et al., 1977; Smith y Jones, 1980; Blood y Studdert, 1993).

Las anomalías pueden tener diferentes causas, por ejemplo, factores genéticos (mutaciones, albinismo, cola bífida), factores ambientales (radiación ultravioleta, magnetismo, temperatura, depredación), agentes infecciosos (virus, bacterias, protozoarios, hongos, parásitos), exposición a contaminantes (interruptores endócrinos, biocidas, metales pesados), e incluso por factores desconocidos (anomalía P, síndrome de miembros débiles) (Aguillón-Gutiérrez, 2018a).

Se considera que, en una población silvestre de anfibios, el porcentaje de individuos con anomalías no debe sobrepasar el 2% (Ouellet, 2000), sin embargo, se han reportado poblaciones de anfibios con el 3.8% de individuos de *Neobatrachus centralis* con anomalías en Australia (Read y Tyler, 1990), con más del 5% en América, Europa y Asia (Johnson et al., 2001; Taylor et al., 2005; Bacon et al., 2006) y hasta con 18% en Rusia (Vershinin, 1989, Severtsova et al., 2012b), mientras que para México se reporta un 5.6% de individuos con anomalías en una población de *Dryophytes plicatus* (Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015).

Aunque en la mayoría de los estudios mencionados anteriormente las anomalías se encontraron en individuos adultos, las anomalías en la etapa larvaria afectan considerablemente la supervivencia de los organismos, ya que no podrán alimentarse adecuadamente en casos de anomalías orales, moverse para buscar su alimento o escapar de depredadores en caso de anomalías en extremidades, cola, espina u ojos o respirar normalmente en caso de anomalías en branquias, por lo que es poco probable que estos individuos lleguen a la etapa adulta (Zamaltdinov, 2003, Blaustein et al., 1997, Severtsova et al., 2012a, Aguillón-Gutiérrez, 2018a).

2) Ecotoxicología de los metales pesados

La ecotoxicología es la ciencia, resultado de la unión de la ecología y la toxicología, que se encarga del estudio de los efectos de sustancias químicas tóxicas sobre los seres vivos y de la interacción de estas sustancias con el ambiente físico (Truhaut, 1975). Dentro de las sustancias químicas tóxicas, se encuentran los metales pesados, y aunque no existe un consenso sobre la definición de este término, se consideran metales pesados aquellos que tienen una densidad mayor a 5 g/ml, o bien, aquellos que podrían causar daños en la salud de los organismos (Moreno-Sánchez y Devars, 1999). Ejemplos de metales pesados son el plomo (Pb), hierro (Fe), mercurio (Hg), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), arsénico (As) (metaloide), antimonio (Sb), níquel (Ni), zinc (Zn), cobre (Cu), plata (Ag), estaño (Sn), berilio (Be), bario (Ba), selenio (Se), manganeso (Mn), magnesio (Mg), talio (Tl), vanadio (V) y aluminio (Al).

Los metales pesados son ampliamente utilizados en procesos industriales, agrícolas y mineros, y millones de toneladas de ellos han sido arrojadas al ambiente (Tabla 1), llegando así al hábitat de los organismos (Moiseyenko, 2009).

Tabla 1. Cantidad de algunos metales pesados arrojados al ambiente a nivel mundial (Moiseyenko, 2009).

Metal	**Toneladas por año**
Manganeso	2,903,000
Hierro	1,925,000
Zinc	693,000
Cobre	229,000
Níquel	161,000
Plomo	119,000
Molibdeno	92,000
Cromo	63,000
Cadmio	43,000
Antimonio	22,200
Plata	3,900

Una vez que un metal se encuentra en la atmósfera, suelo, sedimento o agua, entra en contacto con los organismos (biodisponibilidad), los cuales lo adquieren por vía oral, respiratoria o cutánea, pudiendo llegar así a diferentes partes del cuerpo (bioconcentración y bioacumulación, términos de la ecotoxicología acuática que refieren a la transferencia de contaminantes del ambiente externo al organismo, en el caso de la bioconcentración por vías no dietéticas y en caso de la bioacumulación por vía dietética [Hoffman et al., 2003]) y además empieza a formar parte de las cadenas tróficas, moviéndose a través de ellas (biomagnificación) (Sparling et al., 2000).

Las larvas de anfibios anuros al buscar su alimento pueden adquirir por vía oral los metales pesados, al encontrarse estos en los sedimentos en caso de que los haya, luego el metal se va al intestino, donde se acumula en sus paredes y posteriormente puede movilizarse hacia otros órganos como pronefros, branquias, sistema nervioso, músculos, páncreas y principalmente al hígado (Sparling et al., 2000; Severtsova et al., 2013; Aguillón-Gutiérrez et al., 2018).

Actualmente, en Estados Unidos se practican dos tipos de bioensayos para determinar los efectos de contaminantes, entre ellos los metales pesados, en anfibios anuros en desarrollo, específicamente ranas del género *Xenopus*. Se trata de "Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus*" (FETAX) y el "*Xenopus* Metamorphosis Assay" (XEMA). Estos bioensayos permiten hacer predicciones sobre el riesgo de que un producto o sustancia química llegue al ambiente y ocasione anomalías durante el desarrollo de anfibios nativos o la muerte de los individuos (Opitz et al., 2005; Mouche et al., 2011, Hu et al., 2015).

3) Generalidades de los anfibios anuros

El orden Anura está representado por ranas y sapos. Anura significa "sin cola", lo cual es una característica de este grupo en la fase adulta. Las larvas son fitófagas y los adultos son carnívoros. La respiración puede ser branquial, pulmonar, cutánea y bucofaríngea. En cuanto a la reproducción, la mayoría presenta fertilización externa, colocando los huevecillos en el agua, aunque algunos los colocan en tierra. Actualmente se conocen 7025 especies de anuros (Frost, 2019), siendo el orden de anfibios más numeroso. Se distribuyen en todos los continentes exceptuando la Antártida (Halliday y Adler, 2007).

La mayoría de los anfibios pasan la primera parte de su vida en el agua (etapa embrionaria y larvaria) y después de la metamorfosis viven en la tierra, aunque generalmente cerca de cuerpos acuáticos, ya que procesos como la reproducción (cópula y ovoposición) se llevan a cabo en este medio. Los anfibios cumplen un importante rol ecológico, ya que a través de su alimentación ayudan a controlar poblaciones de insectos y otros invertebrados y a su vez son presa de otros animales, como murciélagos, serpientes y aves, formando así parte de las redes tróficas (Stebbins y Cohen, 1995).

Algunos estudios reportan que más del 40% de las especies de anfibios en el planeta sufren declives de sus poblaciones, siendo entre los vertebrados, el grupo más afectado (Stuart et al., 2004). No se puede atribuir este fenómeno a una sola causa, por lo que, se considera que el problema es multifactorial. Las principales causas de la pérdida de biodiversidad en general y particularmente en anfibios, son la pérdida de hábitat, urbanización y cambio de uso de suelo, contaminación química, lluvia ácida, contaminación auditiva, rayos ultravioleta, cambio climático y las especies introducidas (Blaustein y Wake, 1995; Ankley et al., 2000; Johnson et

al., 2002; Allentoft y O'Brien, 2010; Aguirre et al., 2012, Aguillón-Gutiérrez, 2018b,c).

Las razones de su vulnerabilidad son diversas, por ejemplo, los anfibios tienen una piel muy permeable que permite el paso de contaminantes al interior del organismo, y debido a que tienen un ciclo de vida que involucra ambientes tanto acuáticos como terrestres, si el agua, el sedimento, el suelo o el aire están contaminados o afectados, se interrumpe o altera su ciclo de vida, provocando la aparición de anomalías, enfermedades, declives poblacionales o la extinción (Sparling et al., 2010).

4) La etapa larvaria en anfibios anuros

Las larvas de anfibios anuros han sido relativamente poco estudiadas en investigaciones de campo, al menos en comparación con los anfibios adultos. Algunas de las razones son, por ejemplo, que es más difícil observar un renacuajo que un adulto, que el periodo de estadio larvario suele ser breve, y que la identificación de la especie a partir de la larva es más complicada. El término larva es muy general, en español también se le puede llamar renacuajo, y abarca desde algunas etapas de la organogénesis hasta el inicio de la metamorfosis. Históricamente, las larvas de anfibios han sido modelos clásicos en ciencias como la embriología y biología del desarrollo, la endocrinología y la bioquímica, la genética y la biología molecular, la ecología y en épocas más recientes de la ecofisiología y la ecotoxicología. Dentro de los vertebrados, los anfibios son los únicos que tienen una etapa larvaria como tal (no todas las especies presentan etapa larvaria), y en consecuencia una metamorfosis (exceptuando las especies neoténicas o pedomórficas, que son aquellas que mantienen características juveniles o larvarias durante toda su vida, como, por ejemplo, el ajolote de Xochimilco, *Ambystoma mexicanum*). Anatómicamente hay cambios importantes en la boca, pues en esta etapa comienza la alimentación activa (herbívoros en un inicio y después omnívoros), la cola se desarrolla para permitir el nado, las branquias se internalizan quedando cubiertas por el opérculo y se aprecia el espiráculo, y se desarrollan las extremidades posteriores en las cuales se separan los dedos. Fisiológicamente están activos, con sus respectivas limitantes, el sistema digestivo, el respiratorio, el circulatorio, el nervioso, el excretor y el musculoesquelético (presencia de condrocráneo). Ecológicamente la supervivencia de la larva depende de muchos factores, puesto que esta etapa se lleva a cabo en el agua, y dependerá del tipo de cuerpo de agua (permanente o temporal, agua corriente o estancada), así mismo como de la presencia de alimento, la interacción con depredadores, la competencia intra e interespecífica y de condiciones ambientales, climáticas, demográficas y antropogénicas. Debido a estos factores, una larva es más susceptible a sufrir alteraciones o anomalías morfológicas que un individuo adulto, de ahí la importancia de estudiar este fenómeno en las etapas tempranas del desarrollo. Puesto que la supervivencia de una larva de anfibio con anomalías morfológicas es

baja, puede resultar que, si se estudia la población de adultos de determinada especie, se detecten pocas anomalías o ninguna, obteniendo un sesgo en la información (Cogger y Zweifel, 1992; McDiarmind y Altig, 1999; Halliday y Adler, 2007; Aguillón-Gutiérrez, 2018a).

5) Anomalías macroscópicas por exposición a metales pesados en larvas de anfibios anuros

A continuación, se exponen algunas investigaciones llevadas a cabo durante los últimos 25 años tanto en campo como en laboratorio (biomonitoreo y bioensayo) en diferentes partes del mundo sobre anomalías macroscópicas por exposición a metales pesados en larvas de anfibios anuros de diversas especies. Cabe destacar que en México existen pocos trabajos de investigación publicados sobre este tema, por lo que es necesario considerar más especies y lugares del país para estudiar esta problemática. La tabla 2 muestra una síntesis de esta información, y la figura 1 muestra imágenes de larvas de la rana común europea (*Rana temporaria*) colectadas de sitios contaminados con metales pesados en la ciudad de Moscú, Rusia y en sus alrededores entre 2010 y 2012 por el autor de este capítulo. Las anomalías encontradas en estos individuos fueron anomalía en la pigmentación, que se aprecia en la parte del abdomen del individuo (Fig. 1B); curvatura de la espina hacia la parte ventral, de tal modo que la cola queda orientada hacia abajo (Fig. 1C); curvatura de la espina hacia la parte dorsal, de tal modo que la cola queda orientada hacia arriba (Fig. 1D); curvatura de la cola hacia la parte dorsal, donde se aprecia que la cola es proporcionalmente más pequeña que el tronco del individuo (Fig. 1E); anomalía cutánea, donde se puede apreciar que la piel se desprende a lo largo del cuerpo, aparte de que la larva presenta una curvatura lateral (Fig. 1F); curvatura de la parte anterior de la espina hacia la parte dorsal, donde inmediatamente después de la cabeza empieza la curvatura (Fig. 1G); bradigénesis y subdesarrollo de la parte cefálica, donde se observa que la cabeza no alcanzó a desarrollarse normalmente, el abdomen se muestra muy abultado y la cola presenta una desviación lateral (Fig. 1H); se muestra también una larva normal de *R. temporaria* (Fig. 1A).

En 1993, Hauptman et al., expuso larvas de la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) a Cloruro de Níquel (Ni^{2+}), encontrando anomalías oculares como microftalmia, hipopigmentación, hernias y quistes en la retina y el coroides, coloboma del iris y con menor frecuencia cataratas. La patogénesis de las lesiones oculares involucra displasia focal y difusa y pérdida del epitelio pigmentario de la retina, con distrofia de los segmentos exteriores de los fotorreceptores y protrusión de la neuroretina, además, se considera que el níquel induce embriotoxicidad.

Otro estudio realizado con larvas de *Xenopus laevis* expuestas a cloruro de níquel, cobalto y cadmio (Ni^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}) demostró que la exposición a estos metales ocasiona anomalías como despigmentación de la retina, diastematomielia,

escoliosis, cifosis, focomelia, deformidades sacro-pélvicas y de la extremidad posterior. Al realizar la necropsia de los ejemplares también se descubrió la presencia de displasia del corazón, del riñón, de los ovarios y del intestino (Plowman et al., 1994).

En el Río Savannah, en Carolina del Sur, Estados Unidos, se encontró que de un 2.9 a un 92.6% de larvas de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) sufren de anomalías en la cavidad oral como ausencia de algunos dientes y anomalías en las papilas labiales, impidiéndoles alimentarse del perifiton adecuadamente, además de reducir la tasa de crecimiento en los individuos afectados. Los sitios de colecta fueron cuerpos acuáticos contaminados con metales pesados como As, Cd, Cr, Cu y Se y cenizas de carbón (Rowe et al., 1996). En 1998, Burkhart et al., hicieron un estudio exhaustivo, en el cual tomaron muestras de agua de varios lagos de Minnesota, Estados Unidos, y vieron la capacidad de esta agua de generar anomalías en ojos, cara, cerebro, notocorda, cola e intestinos, además de edema, subdesarrollo general, hiperplasia, evisceración e hipognatia (mandíbula inferior subdesarrollada) en embriones y larvas de *Xenopus laevis*. Los análisis químicos del agua mostraron que contenía una gran cantidad de metales pesados (Al, Sb, As, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Mg, Hg, Ni, Se, Ag, Zn, Tl y V), además de otros metales como calcio (Ca), potasio (K) y sodio (Na), aunque los autores determinaron que los componentes químicos del agua pudieron haber causado una inmunosupresión en los organismos, dejándolos más susceptibles a otros factores como la radiación ultravioleta y enfermedades infecciosas, que también contribuyeron a la formación de anomalías.

La contaminación por plomo es un problema mundial, ya que el plomo es un metal natural, sin rol biológico conocido, y un contaminante muy común, del cual 4 millones de toneladas métricas se usan cada año para fabricar baterías, aleaciones, municiones, pigmentos, entre otras cosas, además, el plomo tiende a bioacumularse en el organismo de animales (incluyendo al ser humano) causando daños en el sistema nervioso, circulatorio, renal y reproductivo (Eisler, 2000).

En 2002, Berzins y Bundy realizaron un experimento para conocer la cinética del plomo en anfibios en desarrollo, para ello utilizaron larvas de *X. laevis*, las cuales pusieron en agua y sedimento contaminados con plomo (3.7 y 18.7, [5, 10x] µg/l respectivamente) durante cinco semanas. Encontraron que el plomo inhibe el desarrollo normal de los anfibios al bioacumularse en su organismo.

Otro estudio demostró que el contacto con plomo ocasiona anomalías esqueléticas en larvas de la rana leopardo del sur (*Lithobates sphenocephalus*), tales como acortamiento de huesos como el fémur y el húmero, escoliosis (desviaciones laterales de la columna), clinodactilia (dedos deformes o retorcidos), braquimelia y ectromelia. Las concentraciones de plomo con las que las larvas estuvieron en contacto fueron de 45, 75, 180, 540, 2360, 3940, 5520 y 7580 mg/kg en el sedimento y de 123, 227, 589, 1833, 8121, 13,579, 19,038 y 24,427 µg/L en el agua. Las larvas expuestas a una concentración de 3940 mg/kg o mayor, murieron

en un periodo de 2 a 5 días. El valor de LC_{50} para el plomo en sedimento fue de 3728 mg/kg. A una concentración de 2360 mg/kg todos los sobrevivientes mostraron una o más de las anomalías antes mencionadas (Sparling et al., 2006).

Aguillón-Gutiérrez (2012) reporta diversas anomalías en larvas de *Rana arvalis* que fueron expuestas a plomo y hierro (6 g/l cada metal) (Figura 2). Las anomalías registradas fueron ausencia de la extremidad posterior izquierda, ausencia de la extremidad anterior izquierda, intestinos fuera de la cavidad abdominal, curvatura en la base de la cola, curvatura en la parte media de la cola, curvatura de la espina en dirección ventral y curvatura de la espina en dirección dorsal. También fueron encontrados individuos con dos tipos de anomalías, por ejemplo, bradigénesis y anomalías cutáneas, anomalías en la pigmentación y anomalía cutánea, anomalía del eje axial y bradigénesis, anomalía del eje axial y anomalía cutánea y bradigénesis y edema. Los análisis histológicos mostraron que en las larvas con curvatura de la espina había destrucción o disminución del tamaño de las somitas.

En la ciudad de Moscú, Rusia, y en sus alrededores se analizaron larvas de *Rana temporaria* y de *R. arvalis* que se desarrollaron en ambientes contaminados por metales pesados. En ellas se encontraron una gama muy diversa de anomalías y diferentes combinaciones de éstas. Estas larvas presentaron curvatura de la espina, desarrollo lento, daños en la piel, edema, desordenes de la pigmentación y anomalías en agallas. Cabe mencionar que algunos individuos tuvieron varias anomalías, y en ocasiones no era posible distinguir cada una de ellas. Además, se practicaron análisis morfométricos los cuales arrojaron que aquellas larvas que habitaban lagos de zonas urbanas presentaban con mayor frecuencia anomalías como hipoplasia o tamaño desproporcionado en la cola (Severtsova et al., 2012b). Larvas de *Bufo bufo* y de *R. temporaria* que fueron puestas en contacto con plomo y hierro, mostraron una coloración gris y rojiza respectivamente en las vísceras, en particular del intestino, condición que puede ser observada macromorfológicamente. Aunado a ello, los análisis histoquímicos mostraron que el hierro se acumula en la pared intestinal y en el hígado (Severtsova et al., 2013). En el caso de larvas de *R. temporaria*, *R. arvalis* y *B. bufo* que igualmente fueron puestas en contacto con plomo y hierro, se observó que algunos individuos mostraron un desarrollo lento y en promedio alcanzaron un menor tamaño a los individuos del grupo control al estar en contacto con plomo, sin embargo, algunos individuos alcanzaron tamaños superiores al promedio cuando había exposición a hierro. No obstante, a nivel experimental, estos metales no alteraron la proporción de tamaños entre las estructuras y solamente afectaron el tamaño general de la larva (Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013). Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista (2015) realizaron un bioensayo en el cual colocaron larvas de la rana arborícola *Hyla plicata* (actualmente *Dryophytes plicatus*) en contacto con agua sin metales pesados (grupo control), donde la mayoría de los individuos resultaron sin anomalía alguna, y en contacto con agua con metales pesados (plomo y hierro a una concentración de 3.7 g/l cada metal) (grupos experimentales), donde se observaron las siguientes

anomalías en algunos de los individuos: curvatura de la espina, ausencia de extremidades, intestinos fuera de la cavidad abdominal, así como anomalías cutáneas y de la pigmentación (Figura 3).

El cromo es un metal pesado tóxico usado en la industria de la peletería, del cemento, de los pigmentos y de los preservadores de madera. Los efectos del cromo en animales incluyen retraso en el crecimiento y en el desarrollo, efectos hematológicos, histológicos, genotóxicos y la muerte. Larvas del sapo común asiático *Duttaphrynus melanostictus* que fueron expuestas a cromo hexavalente presentaron retraso en el crecimiento, cifosis (curvatura de la columna en un plano dorso-ventral) y escoliosis. Los niveles de cromo utilizados fueron 0.002, 0.02, 0.2, 1.0 y 2.0 mg/L. Posteriormente se realizó un análisis de genotoxicidad en el cual eritrocitos de esta especie fueron sometidos *in vitro* a niveles de cromo hexavalente de 0.0015, 0.003, 0.015, 0.03 y 0.15 mg/ L, y aún con las dosis más bajas, se demostró que había daños en el ADN (Fernando et al., 2016).

Tabla 2. Recopilación de información sobre anomalías macroscópicas ocasionadas por exposición a metales pesados en larvas de anfibios anuros.

ANOMALÍAS:	METALES:	ESPECIES:	FUENTES:
Microftalmia, hipopigmentación, hernias, quistes, cataratas, anomalías de pigmentación y coloboma de iris	Ni	*Xenopus laevis*	Hauptman et al., 1993
Diastematomielia, escoliosis, cifosis, focomelia, deformidades sacro-pélvicas y de la extremidad posterior	Ni, Cu y Cd	*Xenopus laevis*	Plowman et al., 1994
Ausencia de dientes y anomalías en papilas labiales	As, Cd, Cr, Cu y Se	*Lithobates catesbeianus*	Rowe et al., 1996
Anomalías en ojos, cara, cerebro, notocorda, cola e intestinos, además de edema, subdesarrollo general, hiperplasia, evisceración e hipognatia (mandíbula inferior subdesarrollada)	Al, Sb, As, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Mg, Hg, Ni, Se, Ag, Zn, Tl y V	*Xenopus laevis*	Burkhart et al., 1998
Bajo peso corporal y crecimiento retardado	Pb	*Xenopus laevis*	Berzins y Bundy, 2002
Acortamiento de huesos como el fémur y el húmero, escoliosis, clinodactilia, braquimelia y ectromelia	Pb	*Lithobates sphenocephalus*	Sparling et al., 2006
Ausencia de extremidades, intestinos fuera de la cavidad abdominal, curvatura en la base y en la parte media de la cola, curvatura de la espina	Pb y Fe	*Rana arvalis*	Aguillón-Gutiérrez, 2012
Curvatura de la espina, desarrollo lento, daños en la piel, edema, desordenes de la pigmentación y anomalías en agallas	Pb, Fe, Zn, Al,	*Rana temporaria* y *R. arvalis*	Severtsova et al., 2012b

Coloración gris y rojiza respectivamente de las vísceras, en particular del intestino	Pb y Fe	*Bufo bufo* y *R. temporaria*	Severtsova et al., 2013
Desarrollo lento/incompleto (bradigénesis)	Pb y Fe	*R. temporaria*, *R. arvalis* y *B. bufo*	Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013
Curvatura de la espina, ausencia de extremidades, intestinos fuera de la cavidad abdominal, anomalías cutáneas y de la pigmentación	Pb y Fe	*Dryophytes plicatus*	Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015
Retraso en el crecimiento, cifosis y escoliosis	Cr	*Duttaphrynus melanostictus*	Fernando et al., 2016

(Elaboración propia).

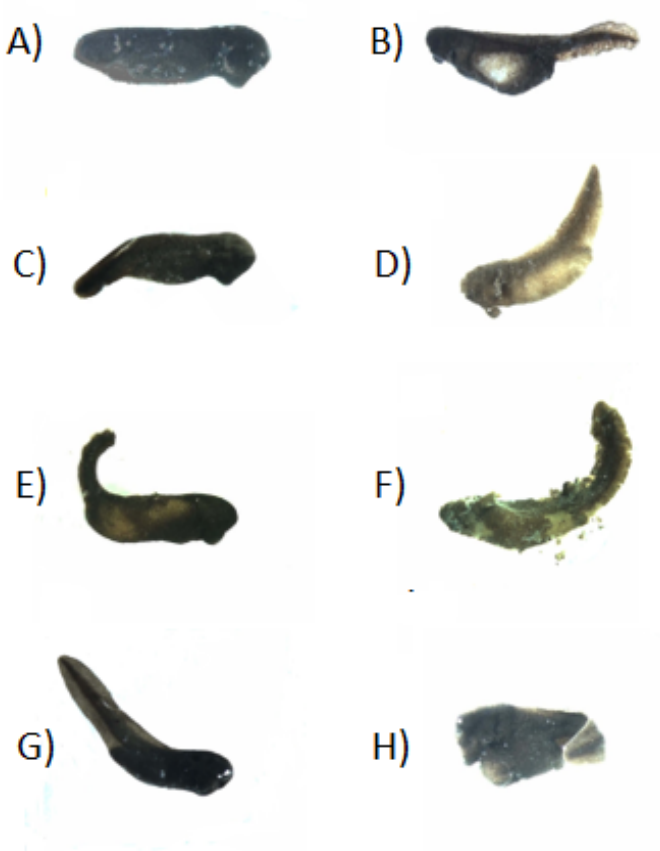


Figura 1. Anomalías en larvas de *Rana temporaria*. A) Normal; B) Anomalía en la pigmentación; C) Curvatura de la espina hacia la parte ventral; D) Curvatura de la espina hacia la parte dorsal; E) Curvatura de la cola hacia la parte dorsal; F)

Anomalía cutánea; G) Curvatura de la parte anterior de la espina hacia la parte dorsal; H) Bradigénesis y subdesarrollo de la parte cefálica. (Elaboración propia).

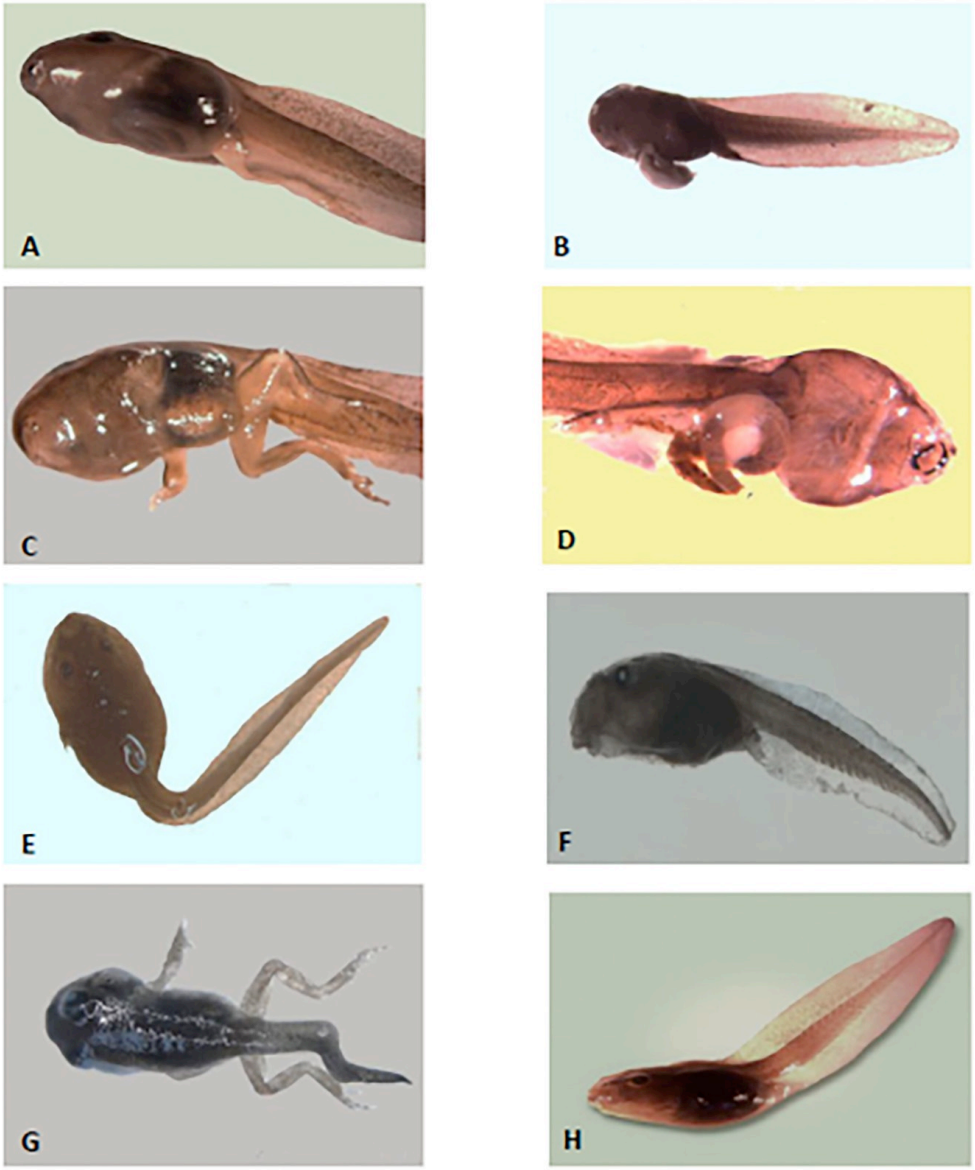


Figura 2. Anomalías en larvas de *Rana arvalis*. A, C) Ausencia de extremidades. B, D) Intestinos fuera de la cavidad abdominal. E, G) Curvatura lateral de la cola. F, H) Curvatura dorso-ventral de la espina (Tomado de Aguillón-Gutiérrez, 2012).

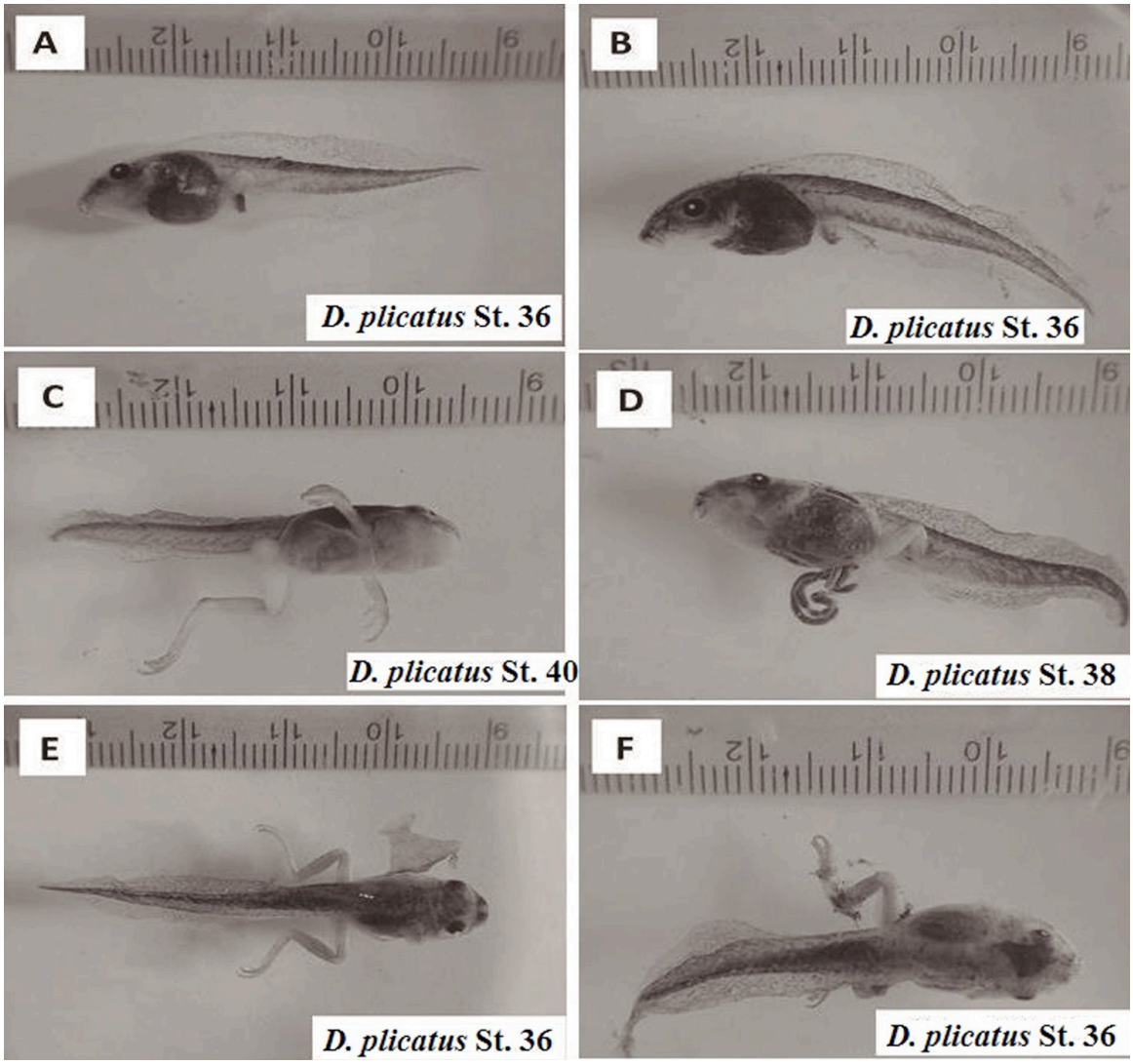


Figura 3. Anomalías en larvas de *Dryophytes plicatus*. A) Organismo normal. B) Curvatura de la espina dorsal. C) Ausencia de extremidad posterior derecha. D) Intestinos fuera de la cavidad abdominal. E) Anomalía cutánea. F) Anomalía en la pigmentación (Tomado de Aguillón-Gutiérrez y Ramírez-Bautista, 2015).

6) Los contaminantes y la conservación de anfibios

Si bien es sabido, que el alcance de los contaminantes como los metales pesados va más allá de las zonas donde fueron producidos o arrojados al ambiente, dependiendo de múltiples factores meteorológicos y biogeoquímicos, la principal afectación de estas sustancias xenobióticas para la biodiversidad se da en ambientes o ecosistemas artificiales o impactados, por ejemplo, en zonas urbanas, industriales, agrícolas o degradadas (Turk, et al., 1973; Adame-Romero y Salín-Pascual, 1993; Ondarza 1997, Orozco-Barrenetxea et al., 2004), por lo tanto, las estrategias de conservación deben estar enfocadas en el manejo de sustancias químicas tóxicas en este tipo de zonas. Se debería promover en México la

aplicación de técnicas similares a FETAX o XEMA mencionados anteriormente, ya sea con anfibios de laboratorio como la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*), con especies invasoras como la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) o bien con otros modelos biológicos como el pez cebra (*Danio rerio*), sobre todo, durante su desarrollo. Esto permitiría evaluar los posibles daños o efectos de nuevos productos químicos como fertilizantes, herbicidas, detergentes, fármacos, entre otros, en la biodiversidad.

Por su puesto, las empresas o fábricas deben asegurarse de que sus desechos no lleguen al ambiente, sino que sean destruidos o almacenados según las normas oficiales correspondientes (NOM-004-SEMARNAT-2002, NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, NOM-052-SEMARNAT-2005, NOM-161-SEMARNAT-2011). Las zonas agrícolas igualmente deberían aplicar con suma responsabilidad los fertilizantes y biocidas que pudieran ser nocivos para organismos que carecen de interés agrícola.

Mantener en zonas urbanas cuerpos de agua limpios y áreas verdes suficientemente grandes puede contribuir significativamente a conservar anfibios nativos de esas zonas.

Adicionalmente, el control de especies invasoras, el desarrollo sustentable, la investigación y divulgación científica, la planeación urbana, el ordenamiento ecológico, minimizar la contaminación química y auditiva, así como el comercio de fauna silvestre y la educación ambiental juegan igualmente un papel muy importante en la conservación no solamente de anfibios, si no de muchas otras especies o grupos biológicos (Enkerlin y Madero, 1997; Alfaro-Barbosa et al., 2002; Boada, 2003; Cruz-Elizalde et al., 2017; Aguillón-Gutiérrez, 2018b).

.

7) Los anfibios como bioindicadores

Un bioindicador es un organismo sensible a cambios ambientales y, por lo tanto, su ausencia o escasez señalan que existe algún factor que está modificando las condiciones normales del ambiente. Además de la valiosa información fisi-coquímica que se puede obtener en un ambiente determinado, la información biológica complementa de manera significativa el panorama de la calidad y salud ambiental (De la Lanza-Espino et al., 2000).

Los anfibios resultan excelentes bioindicadores por varias razones. En general un bioindicador debe cumplir con todas o algunas de las siguientes características: 1) las alteraciones sufridas por los cambios ambientales deben ser medibles a nivel morfológico, etológico o fisiológico, 2) el organismo debe estar lo suficientemente disperso en el área a estudiar, debe ser relativamente abundante y fácilmente detectable, 3) debe ser lo más sedentario posible para reflejar las condiciones locales, 4) debe tener un tamaño que permita el estudio de los tejidos, 5) debe tolerar los contaminantes en concentraciones similares a las observadas en el ambiente sin efectos letales, 6) debe sobrevivir fuera del medio natural, y 7) preferentemente no estar en conflicto taxonómico (De la Lanza-Espino et al., 2000).

Algunos anfibios anuros pueden cumplir la mayoría de estas propiedades y funcionar como bioindicadores, por ejemplo, *X. laevis* es sensible a pesticidas como el atrazine, tanto que un macho adulto en contacto con el producto puede convertirse en hembra, siendo un buen modelo para estudios endocrinológicos (Hayes et al., 2010). Otras ventajas de los anfibios es que en algunas especies se puede obtener un número muy representativo de individuos, por ejemplo, una hembra de *Rana temporaria* puede ovopositar hasta 4,500 huevecillos (Mattison, 2007). Es relativamente barato mantener a los anfibios en laboratorios, son fácilmente manipulables (no representan un daño para las personas), no requieren mucho espacio y en algunas especies, sus embriones y larvas son transparentes y suficientemente grandes para ser manipulados, lo que permite usarlos como bioindicadores prácticamente durante toda la ontogénesis. Una ventaja más en los anfibios es que son vertebrados, por lo que, las alteraciones o patologías que afecten su desarrollo por fenómenos adversos o contacto con sustancias tóxicas, pueden ser comparadas con el desarrollo humano, donde por restricciones bioéticas no es posible hacer experimentación en embriones o fetos (Aguillón-Gutiérrez, 2018b).

8) **Glosario de términos médicos y teratológicos***Langman 1976; Runnells et al., 1977; Smith y Jones, 1980; Blood y Studdert, 1993; Trigo-Tavera y Mateos-Poumián, 1993; Trigo-Tavera, 2006; Kumar et al., 2007; Pérez-Tamayo y López-Corella, 2007; Moore y Persaud, 2009).

Bradigénesis	Desarrollo lento o incompleto
Braquimelia	Acortamiento de las extremidades
Catarata	Opacidad del cristalino
Cifosis	Curvatura exagerada hacia delante de la espalda
Clinodactilia	Curvatura de los dedos
Coloboma	Ausencia parcial de un tejido ocular
Diastematomielia	División de la médula en dos hemimédulas
Displasia	Anomalía en el desarrollo de un tejido o de un órgano
Distrofia	Pérdida de volumen o de la función de un órgano o tejido
Ectromelia	Ausencia o subdesarrollo de extremidades
Edema	Acumulación de líquido en los tejidos
Escoliosis	Curvatura hacia los lados de la columna vertebral
Evisceración	Condición en que las vísceras quedan fuera de la cavidad
Focomelia	Ausencia de huesos y músculos en extremidades
Hernia	Protrusión de un órgano o tejido de su cavidad
Hiperplasia	Aumento anormal del tamaño de un órgano o tejido
Hipognatia	Desarrollo incompleto de la mandíbula inferior
Hipopigmentación	Disminución o ausencia de melanina epidérmica
Hipoplasia	Desarrollo incompleto de un órgano o tejido

Microftalmia	Tamaño pequeño en el globo ocular
Protrusión	Condición en que un órgano sale de su posición normal
Quiste	Bolsa membranosa que se forma anormalmente en un tejido

9. Conclusiones

La contaminación ambiental por metales pesados tiene efectos directos e indirectos sobre la biodiversidad, alterando los patrones naturales de la misma. Entre los organismos más afectados por estos elementos químicos se encuentran los anfibios, pues al tener una piel desnuda, desprovista de pelo, plumas o escamas, y por tener periodos de vida en el agua y en la tierra, son vulnerables a sus efectos, entre los que podemos mencionar a las anomalías morfológicas. Durante las etapas tempranas desarrollo, los animales, en este caso los anfibios, pueden alterar el curso normal de formación de una estructura, por lo tanto, en la etapa embrionaria y larvaria se presentan los periodos críticos del desarrollo, y es precisamente en estas etapas ontogenéticas donde las anomalías suelen presentarse con mayor frecuencia. Entre las anomalías macroscópicas más comunes que se han reportado en larvas de anfibios anuros, tanto en la naturaleza como a nivel experimental, están la curvatura de la espina y de extremidades o sus partes en diferentes planos, el desarrollo incompleto o lento, la ausencia de extremidades, el edema, anomalías oculares, orales, cutáneas, de la pigmentación, y la protrusión de órganos o tejidos. Especialmente, metales pesados como el plomo, el hierro, el níquel, el cromo, el cadmio y el mercurio, pueden bioconcentrarse, bioacumularse y biomagnificarse en los tejidos y órganos de los animales y a través de las cadenas tróficas de las que éstos forman parte, llegando así, incluso en algunos casos al ser humano, afectando seriamente su salud. La reglamentación y legislación ambiental son de vital importancia para la conservación de los anfibios, mantener los cuerpos de agua libres de contaminantes, le da a este grupo biológico y a muchos otros la oportunidad de seguir interactuando con otras especies, adaptarse a los cambios ambientales naturales y de evolucionar en el transcurso del tiempo hacia nuevas formas de vida. Los anfibios son excelentes bioindicadores, además, su utilidad para el ser humano desde el punto de vista ecológico y biomédico es incuestionable.

Es nuestra responsabilidad minimizar la presencia en el ambiente y los efectos de las sustancias químicas tóxicas y evitar que se siga extendiendo la crisis de biodiversidad que hoy día se vive.

10. Referencias

Adame-Romero, A.; Salín-Pascual, DA. (1993) *Contaminación ambiental*. Ciudad de México. Trillas.

Aguillón-Gutiérrez, DR. (2012). Investigación sobre la influencia de contaminación antropogénica en cuerpos acuáticos de desove en el desarrollo postembrionario de tres especies de anfibios anuros. Tesis de doctorado. Universidad Estatal de Moscú M. V. Lomonosov, Moscú, Rusia.

Aguillón-Gutiérrez, DR. (2018a). Anomalías macroscópicas en larvas de anfibios anuros. Revista Latinoamericana de Herpetología, *1*(1),8-21.

Aguillón-Gutiérrez, DR. (2018b). "Anfibios en ambientes antropizados", en: A. Ramírez-Bautista y R. Pineda-López *Ecología y conservación de fauna en ambientes antropizados* (373–390). Querétaro, México. REFAMA.

Aguillón-Gutiérrez DR. (2018c). "Introductory Chapter: General Features of Reptiles and Amphibians" en: Aguillón-Gutiérrez DR. *Reptiles and amphibians* (1-3). Croacia. Intech.

Aguillón-Gutiérrez, DR., Ramírez-Bautista A. (2015). Anomalías frecuentes en una población de *Hyla plicata* (Anura: Hylidae) expuesta a plomo y fierro durante el desarrollo postembrionario. Biología, ciencia y tecnología, *8*,515–529.

Aguillón-Gutiérrez, DR., Ramírez-Bautista A., Romo-Gómez C. (2018). Spectrochemical analysis of tissues of frog dryophytes plicatus tadpoles (amphibia: hylidae) developing under lead and iron pollution. Journal of Environmental Science and Management, *21*(1), 74-81.

Aguirre, AA.; Ostfeld, RS.; Daszak, P. (2012). *New directions in conservation medicine. Applied cases of ecological health*. Oxford. Oxford University Press.

Alfaro-Barbosa, JM; Limón-Rodríguez, B; Martínez-Turanzas, GA; Ramos-Granados, MM; Reyes-Amézcua, JM; y Tijerina-Medina, G. (2002). *Ciencias del ambiente*. Ciudad de México. Compañía Editorial Continental S. A.

Allentoft, ME., O'Brien, J. (2010). Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review. Diversity, *2*:47–71.

Ankley, GT., Tietge, JE., Holcombre, GH. DeFoe, DL., Diamond, SA., Jensen, KM., Degitz, SJ. (2000). Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of Rana pipiens. Canadian Journal of Zoology, *78*:1092-1100.

Bacon JP., Bacon, DW., Bacon, RL., Bacon, DJ. (2006). Deformities in cane toad (Bufo marinus) populations in Bermuda: Part I. Frequencies and distribution of abnormalities. Applied Herpetology, *3*,39-65.

Berzins, DW., Bundy, KJ. (2002). Bioaccumulation of lead in *Xenopus laevis* tadpoles
from water and sediment. Environment International, *28*,69–77.

Blaustein, AR., Kiesecker, JM., Chivers, DP., Anthony, RG. (1997). Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences, *94*,13735–13737.

Blaustein, AR., Wake, DB. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. Scientific American, *272*,52–57.

Blood, DC.; Studdert, VP. (1993). *Diccionario de veterinaria*. Madrid, España. Interamericana-McGraw-Hill.

Boada, M. (2003). "Educación ambiental", en Boada M. y VM. Toledo. *El planeta, nuestro cuerpo: La ecología, el ambientalismo y la crisis de la modernidad*. (98-106). Ciudad de México, México. Fondo de Cultura Económica.

Burkhart, JG., Helgen, JC., Fort, Gallagher, K., Bowers, DJ., Propst, D., Gernes, TL., Magner, MJ., Shelby, MD., Luciert, G. (1998). Induction of mortality and malformation in Xenopus laevis embryos by water sources, associated with field frog deformities. Environmental Health Perspectives, *106*,841–848.

Cogger, HG.; Zweifel, R.G. (1992). *Reptiles y anfibios*. Barcelona, España. Lunwerg.

Cruz-Elizalde, R., Ramírez-Bautista, A., Aguillón-Gutiérrez, DR., Magno-Benítez, I., Hernández-Austria, R. (2017). "Principales amenazas para la biodiversidad y perspectivas para su manejo y conservación en el estado de Hidalgo: El caso de los anfibios y reptiles", en: A. Ramírez-Bautista, A. Sánchez-González, G. Sánchez-Rojas, y C. Cuevas-Cardona. Biodiversidad del Estado de Hidalgo Tomo II (577–590). Hidalgo, México. UAEH.

De la Lanza-Espino, G.; Hernández-Pulido, S.; Carbajal-Pérez, JL. (2000). *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores).* Ciudad de México. Primera edición. Plaza y Valdés.

Eisler R. (2000). Handbook of chemical risk assessment health hazards to humans, plants and animals. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, *51*,458-466.

Enkerlin EC., Madero-Enkerlin, A. (1997). "Educación ambiental, investigación y participación de la comunidad", en EC. Enkerlin, G. Cano, RA. Garza y E. Voguel. Ciencia ambiental y desarrollo sostenible (607-626). México. Thomson.

Fernando, VA., Weerasena, J., Lakrai, GP., Perera, IC., Dangalle, CD., handunnetti, S., Premawansa, S., Wijesinghe. MR. (2016). Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. Aquatic Toxicology, *177*,98–105.

Frost, DR. (2019). "Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0." [en linea], disponible en http://research.amnh.org/herpetology/ amphibia/index.html. American Museum of Natural History, New York, Estados Unidos. [Consultado el 28 de enero de 2019].

Halliday, T.; Adler, C. (2007). *La gran enciclopedia de los anfibios y reptiles*. Madrid, España. Libsa.

Hauptman, O., Albert, DM., Plowman, M., Hopfer, S., Sunderman, W. (1993). Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis. Annals of Clinical and Laboratory Science, 23(6),397-406.

Hayes, TB., Falso, P., Gallipeau, S., Stice M. (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. Journal of Experimental Biology, *213*,921-933.

Hoffman DJ., Rattner BA., Burton GA., Cairns J. (2003). Handbook of ecotoxicology. 2a ed. Lewis publishers.

Hu, L., Zhu. J., Rotchell, JM., Wu, L., Gao, J., Shi, H. (2015). Use of the enhanced frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) to determine chemically-induced phenotypic effects. Science of The Total Environment, *508*,258-265.

Johnson, PTJ., Lunde, KB., Ritchie, EG., Reaser JK., Launer, AE. (2001). Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. Herpetologica, 57:336–352.

Johnson, PTJ., Lunde, KB., Thurman, EM., Ritchie, EG., Wray, SN., Sutherland, DR., Kapfer, J M., Frest, TJ., Bowerman, J., Blaustein, AR. (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. Ecological Monographs, *72*,151-168.

Kumar, V.; Abbas, AK.; Fausto, N. (2007). *Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*. Madrid, España. 7ª edición. Elsevier.

Langman, J. (1976). Embriología médica. Interamericana. Ciudad de México, México.

Mattison, C. (2007). *300 frogs*. China, Grange books.

McDiarmind, RW.; Altig; R. (1999). *Tadpoles. The biology of anuran larvae*. Chicago. USA.

Moiseyenko, TI. (2009). Moscú, Rusia *Ecotoxicología acuática*. Nauka. (En ruso).

Moore, KL.; Persaud, TVN. (1999). *Embriología clínica*. 6a edición. McGraw Hill-Interamericana. Ciudad de México, México.

Moreno-Sánchez, S., Devars, R. (1999). "Abundancia de los metales pesados en la biosfera" en: C. Cervantes, y R. Moreno-Sánchez. Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos (1–10) Ciudad de México, México. AGT.

Mouche, I., Malesic, L., Guillardeaux, O. (2011). FETAX assay for evaluation of developmental toxicity. Methods of Molecular Biology, *691*,257-269.

Ondarza, RN. (1997). *El impacto del hombre sobre la tierra*. Trillas., 179 pp. Ciudad de México, México

Opitz R., Bogi, C., Pickford, DB., Nentwig, G., Oehlmann, J., Tooi, O., Lutz I., Kloas, W. (2005). Description and initial evaluation of Xenopus metamorphosis assay for detection of thyroid system disrupting activities of environmental compounds. Environmental Toxicology and Chemistry, *24*,653-664.

Orozco-Barrenetxea, C.; Pérez-Serrano, A.; González-Delgado, MN.; Rodríguez-Vidal, FJ.; Alfayate–Blanco, JM. (2003). *Contaminación ambiental: Una visión desde la química*. Madrid, España. Thomson.

Ouellet M. (2000). "Amphibian deformities: current state of knowledge" en: DW. Sparling, G. Linder y CA.Bishop. Ecotoxicology of amphibians and reptiles (617-646). Pensacola, Florida, Estados Unidos. Technical publications series, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).

Pérez-Tamayo, R.; López-Corella, E. (2007). *Principios de patología*. 4ª edición. Ciudad de México, México. Panamericana.

Plowman, MC., Grbac-Ivankovic, S., Martin, J., Hopfer, SM., Sunderman, FW. (1994). Malformations persist after Metamorphosis of *Xenopus leavis* tadpoles exposed to Ni 2+, Co 2+, or Cd 2+ in FETAX assays. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, *14*, 135-144.

Read, JL., Tyler, MJ. (1990). The nature and incidence of post-axial skeletal abnormalities in the frog *Neobatrachus centralis* parker at Olympic Dam, South Australia. Transactions of the Royal Society of South Australia, *114*,213-217.

Rowe, CL., Kinney, OM., Fiori, AO., Congdon, JD. (1996). Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. Freshwater Biology, *36*,723–730.

Runnells, RA.; Monlux, WS.; Monlux, AW. (1977). *Principios de patología veterinaria: Anatomía patológica.* Ciudad de México, México. CECSA.

Severtsova, EA., Aguillón-Gutiérrez, DR. (2013). Postembryonic development of anurans in ponds littered with metal-containing refuse (simulation experiments). Biology Bulletin, *40*,738-747.

Severtsova, EA., Aguillón-Gutiérrez, DR., Severtsov, AS. (2012a). "Morphometry as a method of studying adaptive regulation of embryogenesis in polluted environments", en KI. Sato. Embryogenesis (555-572). Croacia. InTech.

Severtsova, EA., Aguillón-Gutiérrez, DR., Severtsov, AS. (2012b). Frequent anomalies in larvae of common and moor frogs in Moscow area and in the Suburbs of Moscow, Russia. Russian Journal of Herpetology, 19,337–348.

Severtsova, EA., Nikiforova, AI., y Aguillón-Gutiérrez, DR. (2013). Spectrochemical and histochemical analyses of tissues of grass frog and gray toad tadpoles developing under simulation of pollution by plumbum and ferrum. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 68,186–191.

Smith, HA.; Jones, TC. (1980). *Patología veterinaria*. Ciudad de México, México. UTEHA.

Sparling, DW.; Krest, S., Ortiz-Santaliestra, M. (2006). Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenocephala* tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, *51*,458–466.

Sparling, DW.; Linder, G.; Bishop, CA. (2000). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. New York, Estados Unidos. SETAC.

Sparling, DW.; Linder G.; Bishop CA.; Krest SK. (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles.* Segunda edición. New York, Estados Unidos. SETAC.

Stebbins, RC.; Cohen NW. (1995). *A natural history of amphibians*. Estados Unidos. Princeton University Press.

Stuart, SN., Chanson, JS., Cox, NA., Young, BE., Rodrigues, AS., Fischman DL., Waller, RW. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science *306*,1783–1786.

Taylor B., Skelly, D. Demarchis, LK., Slade, MD., Galusha D, Rabinowitz, PM. (2005). Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. Environmental Health Perspectives, *113*,1497-1501.

Trigo-Tavera, FJ.; (2006). *Patología sistémica veterinaria*. Ciudad de México, México. McGraw- Hill-Interamericana.

Trigo-Tavera, FJ.; Mateos-Poumián, A. (1993). *Patología general veterinaria*. 2ª edición. Ciudad de México, México. Interamericana-McGraw-Hill.

Truhaut, R. (1975) "Ecotoxicology. A new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods, and prospects", en AD. McIntyre y CF. Mills. Ecological toxicology research: effects of heavy metal and organohalogen compounds. New York, Estados Unidos. Plenium Press.

Turk, A.; Turk, J.; Wittes, J. (1973). Ecología, contaminación, medio ambiente Ciudad de México. Interamericana.

Vershinin, VL. (1989). Morphological abnormalities of amphibians of the urban environment. Russian Journal of Ecology, *3*,58–65.

Zamaletdinov RI. (2003). The morphological anomalies in urban populations of anurans (in the city of Kazan). Current Studies Herpetology, *2*,148-153.

Capítulo 29

EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL DEL CAUCE DEL RÍO BALSAS, REGION TIERRA CALIENTE DE GUERRERO.

Lubybed Escobar Sarabia[1]

Diana Pérez de Jesús[1*]

Francisco Zavala Hernández[1]

Maribel Ramírez Orozco[1]

[1] Academia de Biología, Instituto Tecnológico de Cd. Altamirano, Av. Pungarabato Pte. S/N Col. Morelos.

[+] diana_jesus@hotmail.com

Resumen

En los últimos quince años se ha registrado un alto grado de deterioro en el río Balsas, México, debido a los asentamientos humanos e industriales. El objetivo de este estudio fue evaluar la condición actual del río y establecer la relación entre los parámetros de la legislación vigente y las pruebas de toxicidad y mutagenicidad. Se determinaron parámetros de campo (color, olor, temperatura, CE, pH, OD), fisicoquímicos (SST, SDT, SSe, DBO5, DQO y GyA, Ntotal, Norg, Ptotal, Porg, ortofosfatos), metales pesados (As, Cd, Cu, Cr, Cr+6, Hg, Ni, Pb, Zn, Al, Fe, Mn), microbiológicos (coliformes fecales) con base en los límites máximos permisibles (LMP) en la NOM-001-ECOL-1996 y en los CE-CCA-001/89, análisis de toxicidad (*Vibrio fischeri, Daphnia magna*) y mutagenicidad (prueba de Ames con microsomas/*Salmonella typhimurium*), en época de sequía en nueve estaciones a lo largo de 85km. Los valores para OD, DBO5 y DQO fueron de 2-6, 11-270 y 22-1841mg·l-1, respectivamente. Los metales fueron detectados por debajo de los LMP en todas las estaciones, excepto en la estación 5 (0,002mg·l-1 de Hg) y la 8 (0,13mg·l-1 de Cr+6). Los coliformes fecales rebasaron los LMP en todas las estaciones. Los valores para *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* se encuentran en 2-28 y 1-4UT, y para la prueba de Ames entre 5 y 63RM, indicando toxicidad y mutagenicidad desde la estación 3 a la 9. Se registró contaminación alta según la legislación vigente y un riesgo para la salud pública de acuerdo a los parámetros toxicológicos y mutagénicos.

Palabras clave: Rio Balsas, Indicadores de calidad de agua, parámetros toxicológicos.

1. Introducción

La problemática ambiental del río Balsas es el resultado del deterioro producido por la expansión demográfica sostenida y el desarrollo económico de los estados de Puebla y Tlaxcala, que se asientan en 2429km^2 de extensión superficial de la subcuenca del Atoyac (Figura 1). Las actividades socioeconómicas de la zona son: alimenticia, textil, química, petroquímica, automotriz, papelera, bebidas, hierro y acero, farmacéutica, tenería, metalmecánica, siderúrgica y producción agrícola (INEGI, 2004). Estas actividades producen aproximadamente 55 descargas de aguas residuales directas e indirectas, 45 industriales y 10 municipales (CONAGUA, 2007b).En los últimos 14 años, diferentes estudios han caracterizado la calidad del agua del río Atoyac y de las zonas de impacto a su alrededor, determinando las condiciones y el riesgo que presentan las descargas depositadas en él. En 1995, Méndez *et al* reportó que la incorporación del agua residual procedente de Tlaxcala, San Martín Texmelucan, Moyotzingo y la Ciudad de Puebla al río provocó el incremento del contenido de sales solubles, metales pesados, detergentes y grasas en la zona. Posteriormente, Méndez *et al*. (2000) muestrearon suelos sometidos a riego por más de 30 años con aguas del río, revelando que el agua presentaba concentraciones de metales en el orden Fe>Pb>Mn>Cr>Cd, detectándolos en el suelo analizado. Silva *et al*. (2002) analizaron la calidad del agua de la región atlixquense, que incluye el río Nexapa, afluente del Atoyac, mostrando que se excedieron LMP para parámetros como DBO5, DQO, dureza, temperatura, nitrógeno amoniacal, pH, SS, turbiedad, Pb, Cr, Cd y Zn. Saldaña *et al*., (2002a), empleando pruebas de toxicidad en la evaluación de la calidad del agua del río Alseseca, que al igual que el Atoyac desemboca en la presa Manuel Ávila Camacho, encontraron un coeficiente de correlación alto entre parámetros fisicoquímicos y toxicológicos. Saldaña *et al*. (2002b) reportaron 522 descargas municipales e industriales en Estado de Puebla, que en su mayoría cumplió con los parámetros de la NOM-001-ECOL-1996 y resaltaron la importancia de incluir en la norma las pruebas de toxicidad con Photobacterium phosphoreum para evaluar sustancias tóxicas no detectadas por los análisis convencionales. En el estudio de viabilidad de uso acuícola de *Ciprinus carpio* en la Presa Manuel Ávila Camacho, Flores et al. (2004) demostraron que la concentración de metales pesados en el agua de la presa Valsequillo no rebasó el LMP para su uso en riego de cultivos, además de la ausencia de elementos tóxicos en el músculo de peces. Sin embargo, el grado de contaminación en el embalse de la presa lo hace no apto para consumo humano. Mangas et al. (2005) resaltaron la gravedad en que se encuentra la presa Valsequillo y discuten diversos intentos para rehabilitarla, cuyos logros han quedado al margen de las metas propuestas. Saldaña y Gómez (2006) incluyeron en su estudio un parámetro de toxicidad (*Vibrio fischeri* señalando que 17 de las 23 descargas analizadas no cumplen con la norma y 16 de ellas presentan toxicidad de 2-

1165unidades de toxicidad (UT); sin embargo, los parámetros de toxicidad no están incluidos en la norma mexicana. CONAGUA (2007a) reportó que las aguas residuales de los ríos Atoyac y Zahuapan rebasaron en 2005 los LMP de DBO5, DQO, metales y toxicológicos, proponiendo un acuerdo para el saneamiento de la presa Valsequillo con metas en tres etapas. Sin embargo, el nivel de contaminación en la presa sigue siendo alto, lo que demuestra la necesidad de disminuir el impacto de las descargas.

En América Latina existen estudios sobre construcción de índices de calidad en humedales tropicales en la costa sur de México (Escobedo Urías et al., 2011) y en la cuenca del Río Suquia (Córdoba, Argentina) donde Pesce y Wunderlin (2000) desarrollaron un índice mínimo de exitosa aplicación. El análisis cuali-cuantitativo del agua en América Latina y el Caribe tiene una particular importancia, dado que a pesar de contar con el 30% de los recursos hídricos del mundo la distribución de la población con respecto a estos recursos es irregular e inequitativa, ya que la mayor parte de las personas viven en áreas donde el agua, si existe, escasea y/o está contaminada. Por este motivo dentro

de los objetivos del milenio se encuentran el suministro de agua, el saneamiento y la gestión de los recursos hídricos (PNUMA, 2003). Por lo anterior se realizó un estudio un diagnóstico físico - químico y microbiológico del agua superficial en la cuenca del rio Balsas de la Región Tierra Caliente de Guerrero, donde se realizó un diagnóstico ambiental espacio temporal de la cuenca alta , enseguida se caracterizó las características físico - química y microbiológicamente de las aguas superficiales de la cuenca y se definieron los índices de calidad en sus distintos usos, así como la predicción de la dinámica de espacio temporal de los nutrientes utilizando SIG.

1.1 Fundamentación de la elección del área de estudio

La cuenca hidrográfica, es un sistema en el que se vinculan los procesos hidrológicos, geomorfológicos, industriales, edáficos y culturales, generándose procesos hidrometeorológicos como erosión, remociones en masa, inundaciones y crecidas torrenciales. Además, esta unidad territorial permite describir el impacto de la contaminación sólida y líquida, la degradación de los suelos producto del uso excesivo de los fertilizantes y agroquímicos y/o sobreexplotación de los recursos. Por este motivo el mal uso de los recursos naturales en las cuencas altas y medias repercutirá y será una amenaza para la población situada aguas abajo (agua potable, sistemas agro productivos, energéticos y de transporte), entre otros problemas producidos por el hombre los cuales deben ser resueltos tomando a la cuenca hidrográfica como una unidad territorial (Tapia, 2012). Esto motivó la realización del presente estudio para determinar el deterioro actual del cauce del río Balsas, región Tierra Caliente de Guerrero y establecer la relación entre los parámetros establecidos en la legislación vigente y las pruebas de toxicidad y mutagenicidad.

1.2 Área de Estudio

El Balsas avanza en dirección oeste por la parte norte del estado de Guerrero, un tramo en el que es llamado a veces río Mexcala. Recibe muchos afluentes no muy largos, de pequeños valles, como el río Amacuzac, que llega por la mano derecha desde Morelos. El valle del río es cruzado por el Puente Mezcala Solidaridad de la Autopista del Sol (95D) que comunica a la ciudad de Cuernavaca (en el estado de Morelos) con Acapulco, en la costa del estado de Guerrero.

Después el río llega a la cola del embalse de la presa de El Caracol, donde recibe por la derecha, al río San Juan. Sigue hacia el este su discurrir incorporando nuevos afluentes, como los ríos Yextla y El Aguacate y atravesando varias localidades, como San Miguel Totolapan, Ajuchitlán del Progreso y Tlapehuala. Bordea por el sur la Ciudad Altamirano, casi en la frontera entre Guerrero y Michoacán, que con 25.317 hab. en 2010 es la ciudad más importante en el curso medio del río y tras atravesar Coyuca de Catalán recibe por la derecha al río Cutzamala, justo en la frontera interestatal. A partir de aquí y hasta su desembocadura, el Balsas forma la frontera entre los estados de Guerrero (al sur) y Michoacán (al norte). En este largo tramo incorpora las aguas de los afluentes Placeres del Oro y Chiquito y pasa por la pequeña localidad de Zirándaro de los Chávez. Llega después el río a la larga cola del embalse de la presa del Infiernillo, y, en ese tramo embalsado, recibe al río Grande y al río Cupatitzio. Tras más de 70 km de tramo embalsado llega a la presa, en Infiernillo, y tras virar finalmente hacia el sur, sale de los valles montañosos interiores y emprende su último tramo, ya en la vertiente costera.. Las estaciones son 1) Cuahulotitlan, 2) Altamirano, 3) Morelita, 4) Coyuca 5) San Miguel Totolapan, 6) Ajuchitlan, 7) Zirandaro, 8) El Progreso y 9) Cutzamala.

2. Metodologia

En el año 2018, en época de estiaje, se tomaron muestras simples en un día normal de operación industrial para determinar cuantitativa y cualitativamente la contaminación producida. Las muestras se tomaron utilizando a) envases limpios y secos de plástico de 2 litros para análisis fisicoquímicos, b) envases de vidrio color ámbar de 500ml para metales pesados, c) envases de vidrio color ámbar de 1 litro para análisis de toxicidad (llenándose a contracorriente en el río), d) bolsas estériles de 100ml para el análisis microbiológico (se abrió la bolsa dentro del agua y se selló in situ). Los parámetros de campo se obtuvieron empleando un equipo multiparámetros YSI 556MPS. El caudal del río se midió con un molinete, en forma

simultánea con la toma de muestras. El manejo y la preservación de las muestras se realizaron con base en la NMX-AA-003-1980.

2.1 Parámetros determinados

Los parámetros estudiados se agruparon en cinco categorías: 1) De campo, tales como caudal del rio, materia flotante, color, olor, temperatura, CE, pH y OD; 2) Fisicoquímicos: 2A. sólidos suspendidos totales (SST), sólidos disueltos totales (SDT), sólidos sedimentables (SSe), demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), demanda química de oxígeno (DQO), grasas y aceites (GyA); 2B. nutrientes: nitrógeno total (NTotal), nitrógeno amoniacal (Namoniacal), nitrógeno orgánico (Norg), nitrógeno como nitritos y nitratos (Nnitritos +Nnitratos), nitrógeno nitritos (Nnitritos), fósforo total (Ptotal), fósforo orgánico (Porg) y ortofosfatos (Porto); 3) Metales pesados (As, Cd, Cu, Cr, Cr+6, Hg, Ni, Pb, Zn, Al, Fe y Mn); 4) Microbiológicos (coliformes fecales) y 5) Toxicidad (*Vibrio fischeri, Daphnia magna*) y Mutagenicidad (prueba de Ames) con dos cepas (TA98 y TA100), sin y con activación metabólica (-S9 y +S9). En las cuatro primeras categorías, para determinar la calidad del agua del río se tomó como referencia los límites máximos permisibles (LMP) establecidos en la NOM-001-ECOL-1996; así como los criterios ecológicos de calidad del agua (CE CCA-001/89) y La Ley Federal de Derechos de Agua (LFA, 2007). Los análisis de toxicidad y mutagenicidad se realizaron de acuerdo a las normas mexicanas (NMX-AA-112-1995SCFI) y (NMX-AA087-1995-SCFI) y a la (OECD-471, 1995).

3. Resultados

3.1 Parámetros de campo

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla I. La estación con el máximo caudal es la 8 (5686 l·s-1), mientras que la estación 1 presenta el caudal más bajo (273 l·s-1). La materia flotante, presente sólo en la estación 4, fue de tipo doméstico (botellas PET, plásticos y latas); la norma NOM-001-ECOL-1996 establece ausencia de materia flotante. En el color son evidentes los cambios a lo largo de los nueve sitios, iniciando con un color café en las estaciones 1 y 2, transformándose en azul en la estación 3, negro en las estaciones 4 a 8 para, finalmente terminar en gris en la estación 9. Las estaciones 1, 2 y 3 no presentan olor alguno, mientras que de la 4 a la 9 mostraron un olor a ácido sulfhídrico. La temperatura en el agua del río osciló entre 14 y 19°C entre las estaciones 1 y 9; los CE-CCA-001/89 establecen condiciones naturales de temperatura de más de 1,5^{0}C Los valores mínimos de conductividad eléctrica se presentaron en las estaciones 1 y 2 (213 y 250µS·cm-2), y

el valor máximo se registró en la estación 8 (945µS·cm-2). Los pH de 8 estaciones son similares (77,5), excepto la estación 3 con un pH de 8. Para los parámetros de color, olor, CE y pH no se han establecido LMP en la NOM-001-ECOL-1996 ni en los CE-CCA-001/89. La concentración máxima de OD se registró en la estación 2 (8,6mg·l-1), seguida por las estaciones 1, 7 y 6 (6,4; 6,1 y 5,9mg·l-1) y el valor mínimo (1,7mg·l-1) se localizó en la estación 9, encontrándose fuera de los CE-CCA-001/89.

Tabla I. Parametros de campo

Estación	Caudal (l.s)	MF	Color	Olor	T (°C)	CE (µS.cm²)	pH	LMP NOM-001-ECOL-1996	LMP NOM-001-ECOL-1996
1	273	NO	CAFE	NO	15	213	7.4	Temperatura= URA,UPU,PVA=40 °C	Temperatura =condic naturales +1.5°c
2	704	NO	CAFÉ	NO	14	250	7.7		
3	1228	NO	AZUL	NO	14	570	8.0		
4	1872	SI	NEGRO	SI(H2S)	14	610	7.3		
5	2208	NO	NEGRO	SI(H2S)	16	692	7.5	Materia flotante(MF) URA,UPU,PVA=au sente	Materia flotante = Desagrdable a la vista OD=5mg.l- i
6	4271	NO	NEGRO	SI(H2S)	18	905	7.6		
7	3883	NO	NEGRO	SI(H2S)	16	912	7.6		
8	5686	NO	NEGRO	SI(H2S)	16	945	7.5		
9	NR	NO	GRIS	SI(H2S)	19	769	7.0		

LMP: límite máximo permisible ,URA :uso riego agrícola , UPU :uso publico PVA: protección vida acuática NR: no realizado

3.2 Parámetros fisicoquímicos

En la Tabla II se muestran los valores de los parámetros SST, SDT, SSe, DBO5, DQO y GyA. El valor mínimo de SST se obtuvo en la estación 1 (8mg·l-1) y el máximo en la estación 7 (343mg·l-1). El LMP de SST para Uso de Riego Agrícola (URA) es rebasado en las estaciones 7, 8 y 9. En las estaciones 6 a 9 se sobrepasa el

LMP para Uso Público Urbano (UPU), mientras que para Protección de Vida Acuática (PVA) el LMP es excedido en todas las estaciones. Solamente se registró SDT (11mg·l-1), parámetro que no se incluye en la normativa vigente, en la estación 7. Para SSe todas las estaciones cumplen con los LMP establecidos para URA, UPU y PVA. Las concentraciones mínima y máxima de DBO5 se registraron en las estaciones 1 y 7 (11 y 270mg·l-1), siendo rebasado el LMP para URA en las estaciones 5 y 9; para UPU en las estaciones 5, 6 y 7; y para PVA en las estaciones 3 (Morelita) a la 9 (Cutzamala). (1841mg·l-1) en la estación 9, siendo rebasado el LMP establecido en la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua en las estaciones 3 a 9. El dato mínimo para GyA (15mg·l-1) fue en la estación 3 y el máximo (26mg·l-1) en las estaciones 5 y 8. Estas dos últimas estaciones no cumplen con el LMP establecido en la NOM-001-ECOL-1996. En la Tabla III se muestran los valores obtenidos para N y P en sus diferentes formas. La concentración mínima de Ntotal detectada en las estaciones 1 y 8 fue de 2471mg·l-1 y la máxima de 26551mg·l-1; ninguna de las estaciones cumple con los LMP para URA, UPU y PVA. El valor mínimo de Namoniacal registrado fue de 0,5mg·l-1 y el máximo El valor mínimo de DQO (22mg·l-1) se observó en la estación 1 y el máximo de 15400 en las estaciones 1 y 8, respectivamente; sólo la estación 1 cumple con el LMP establecido en los CECCA-001/89. Los LMP para Norg y para Nnitritos+Nnitratos no se contemplan en la legislación actual. El valor para Nnitritos en todas las estaciones está dentro del LMP de los CE-CCA-001/89. En cuanto al Ptotal el valor mínimo y el máximo, de 1,0 y 6,0mg·l-1 en las estaciones 2 y 8, cumplen con el LMP establecido en la NOM-001-ECOL-1996. Por otro lado, ninguna estación cumple con el LMP que marcan los CE-CCA-001/89. Se cuantificaron fosfatos orgánicos y ortofosfatos en todas las estaciones, aunque estos compuestos no se encuentran regulados por ninguna norma.

Tabla 2. Parámetros fisioquímicos tradicionales

Estación	SST mg-1^{-1}	SDT mg-1^{-1}	SSc m1-1^{-1}	DBO_5 mg-1^{-1}	DQO mg-1^{-1}	Grasas/aceites mg-1^{-1}	LMP NOM-001-ECOL-1996	LMP CE-CCA-001/89	LMP LFD-2008
1	64	<0.18	0.6	11	22	ND	SST, URU, UPU, PVA= 200, 125, 60mg-1^{-1}	Grasas y aceites = ausentes	DQO= 100mg-1^{-1}
2	70	<0.18	0.0	23	36	ND			
3	109	<0.18	0.0	87	189	15			
4	80	<0.18	0.7	88	157	24			
5	110	<0.18	0.6	259	357	26			
6	172	<0.18	0.7	157	314	22	Ssc, URA, UPU, PVA= 2ml-1^{-1}		
7	343	11	2	270	383	24			
8	240	<0.18	1	87	200	26			
9	240	<0.18	1	78	1841	NR	DBO, URA, UPU, PVA= 200, 150 y 60mg-1^{-1}		
							Grasas y aceites RA, UPU, PVA= 25mg-1^{-1}		

ND: no detectado, NR: no realizado

3.3 Metales

En la Tabla IV se muestran los metales cuantificados. Los valores de As y Cd se encuentran dentro del LMP de la NOM-001ECOL-1996. Se detectó Cr+6 en la estación 8 con una concentración 0,13mg·l-1, rebasando significativamente el LMP establecido en los CE-CCA-001/89. La existencia de Hg en todas las estaciones muestra concentraciones de 0,001mg·l-1 y cumple con la NOM-001ECOL-1996, excepto en la estación 5 (0,002mg·l-1) que rebasa el LMP de los CECCA-001/89. El Ni en todas las estaciones muestra concentraciones por debajo de la NOM-001-ECOL-1996 y no se le considera en los CE-CCA-001/89. El Fe y el Mn no se detectaron de la estación 1 a la 7, pero el Fe está presente en las estaciones 8 y 9 (0,53 y 0,51mg·l-1), mientras que el Mn solo se detectó en la estación 9 (0,52mg·l-1); para ninguno de ellos hay LMP en la NOM-001-ECOL-1996 ni en los CE-CCA-001/89.

Tabla 3. Parámetros relacionados con materia orgánica

NR: no realizado

Estación	N total	N amoniacal	N org	N-nitritos +N-nitratos	N-nitritos	P total	P org	P orto	LMP NOM-001-ECOL-1996 mg-1^{-1}	LMP CE-CCA-001/89 mg-1^{-1}
					mg-1^{-1}					
1	2471	0.5	1	1	0.09	1	0.3	0.3		
2	4223	0.9	1778	1	0.07	1	0.0	0.3		
3	15772	6952	8448	0.4	0.02	2	0.4	1.2	N_{total} URA,	
4	1686	9746	6864	1.3	0.03	2	0.2	1.4	UPU,	$N_{amoniacal}$ =
5	16531	5654	10296	0.6	0.02	4	0.2	2.2	PVA=	0.6
6	14480	8118	5962	0.4	0.02	3	0.8	2.0	60, 60, 25	
7	22420	11990	9900	0.5	0.03	5	0.5	2.9		Nitritos =
8	26551	15400	10670	0.5	0.02	6	0.9	1.5	P_{total} URA,	0.6
9	11660	9339	2321	NR	0.02	2	0.06	NR	UPU,	
									PVA=	P_{total}
									30, 30, 10	=0.05

Las concentraciones de Cu, Crtotal, Pb, Zn y Al detectadas estuvieron debajo del LMP de la NOM-001ECOL-1996 en todas las estaciones.

3.4 Microbiológicos

El valor mínimo y el máximo de coliformes fecales se registraron en las estaciones 2 y 7 (2,20E3 y 3,08E07NMP/100ml). Ninguna de las estaciones cumple con el LMP establecido en la NOM-001-ECOL-1996 (Tabla VI).

3.5Toxicológicos

Para evaluar los resultados de toxicidad con V. fischeri y D. magna (Tabla VI) se empleó la clasificación de toxicidad de acuerdo con Bulich (1982) y para la prueba de Ames los valores de razón de mutagenicidad (RM; Mortenmals, 2000). En las estaciones 1 y 2 no se detectó toxicidad con V. fischeri; en las estaciones 3 y 4 existe toxicidad con 3 y 2 unidades de toxicidad (UT), de las estaciones 5 a la 9 se registró niveles muy tóxicos (28-18UT) debido a la presencia de compuestos orgánicos. La estación 3 se mostró levemente tóxica con D. magna (1UT) y las

estaciones 4 a 9 resultaron tóxicas (24UT), debido probablemente a la presencia de compuestos inorgánicos del tipo metales y metaloides.

Tabla 4. Metales pesados y metaloides

ESTACIÓN	As	Cd	Cu	Cr	Cr^{16}	Hg $mg\text{-}1^{-1}$	Ni	Pb	Zn	Al	Fe	Mi	I.MP NOM-001-ECOL-1996 $mg\text{-}1^{-1}$	I.MP CE-CCA-001/89 $mg\text{-}1^{-1}$
1	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	0,002	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	As URA. UPU, PVA=0,2: 0,1: 0,1	As III= 0,2
2	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	0,001	0,017	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Cd URA, UPU, PVA= 0,2: 01: 0,1	
3	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	0,001	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Cu URA, UPU, PVA= 4,0; 4,0; 4,0	Cn= 0,0005
4	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	0,001	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Cr URA, UPU, PVA= 1,0; 0,5: 0,5	
5	<0,005	0,04	<0,05	<0,05	ND	0.002	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Hg URA, UPU UPVA= 0,01; 0,005; 0,005	Cr^{16}= 0,01
6	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	0,001	0,017	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Ni URA, UPU, PVA= 0,5; 0,2: 0,2	
7	0,01	0,05	<0,05	<0,05	ND	0.001	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	ND	ND	Pb URA, UPU PVA= 0,2; 0,1; 0,1	Hg= 0,001
8	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	0,13	<0,0005	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	0,53	ND	Zn URA, UPU, PVA= 10,0; 10,0; 10,0	
9	<0,005	<0,02	<0,05	<0,05	ND	<0,0005	<0,05	<0,10	<0,1	<5,0	0,51	0,52		

ND: no contable

Tabla 5. Parámetros microbiologicos, toxicologicos y mutagénicos

ESTACIÓN	Coliformes fecales NMP/100 ml	Vibrio fischeri CE_{50} (%) ___ ___ UT	Daphnia CE_{50} ___ ___ UT	magna (%)	CEPA -S9	TA98 +S9	CEPA -S9	TA100 +S9	LMP (NOM-001-ECOL-1996)	Clasif. De toxicidad (Bulich, 1982)
						RM				
1	2,64E03	TND	TND	TND	TND	-	-	-	Coliformes fecales	>4 Muy toxica
2	2,20E03	TND	TND	TND	TND	-	-	-	URA= 1000NMP/100ml	2-4 Toxica
3	2,64E06	33	3	82	1	6	-	-		1.33-1,99 Moderadamente tox.
4	2,64E06	40	2	53	2	5	-	-		<1,33 Levemente toxica
5	2,53E06	4	28	57	2	7	-	-	I.MP	Clasif. De mutagenecidad
6	2,64E06	17	6	63	2	63	-	-	(CE-CCA-001/89)	(mortenmals y Zeiger, 2000)
7	3,08E07	18	6	52	2	-	-	-		<2= negativo
8	2,53E06	5	19	24	4	13	5	-	Colif. Fec. <200NMP/100ml	>2= positivo
9	2,64E07	6	18	32	3	14	5	-		

TND tocidad no detectada, -: negativo

Prueba de Ames. En las estaciones 1, 2 y 7 no se detectó mutagenicidad (ND) con la cepa TA98 sin activación metabólica, pero sí en las estaciones 3, 4, 5, 6, 8 y 9 con valores de 6, 5, 7, 63, 13 y 14RM respectivamente, siendo significativamente más alta la estación 6. Con la cepa TA98 con activación metabólica no se registró mutagenicidad en las estaciones 1 a 7, pero sí se registró en las estaciones 8 y 9 con valores de 5RM (Tabla V). Empleando la cepa TA100 sin activación metabólica, en las estaciones 1 a 6 no se detectó mutagenicidad, pero las estaciones 7, 8 y 9 presentan valores mutagénicos de 5, 7 y 6RM. Empleando la misma cepa con activación metabólica no se detectó mutagenicidad en ninguna de las estaciones (Tabla V).

4. Discusión y conclusiones

El caudal del río Balsas se incrementa desde la primera medición en la estación 1 hasta la estación 6 en 15 veces, de 273 a 4271l·s-1, disminuyendo en la estación 7 a 3883l·s-1. En todo el afluente de donde nace hasta el cauce en la región Calentana podemos encontrar industrias, agricultura, ganadería, minerías,

basureros, drenajes, etc.; lo cual conlleva extracción de agua del río para sus procesos. El factor determinante para esta clasificación fue la cantidad de parámetros que sobrepasan los LMP de la legislación). La disminución del caudal en la estación 7 muestra la necesidad de limitar la extracción del recurso hídrico. Los parámetros fisicoquímicos fueron rebasados en todas las estaciones en el siguiente orden 1 <2 <4, 6 <3, 5, 9 <8 <7. Las estaciones 7 y 8 (Tablas III y IV) se destacan por los máximas valores de SST, SDT, SSe, DBO5, DQO, GyA, Ntotal, Namoniacal, Norg, Ptotal y Porg, mostrando el impacto de las descargas de origen industrial y municipal en el río, confirmando lo reportado por Valladares et al., (2005). Los metales detectados de menor a mayor concentración fueron: Hg (en estación 5) <As (en 7) <Ni (en 7) <Cd (en 7) <Cr6+ (en 8) <Mn (en 9) <Fe (en estación 8). La presencia de estos metales concuerda con los resultados de otros estudios concuerda (Silva et al., 2002; Méndez et al., 1995; Saldaña y Gómez, 2006; CONAGUA, 2007b; Navarro et al., 2007) El cambio de color en las estaciones 1 y 2 fue influenciado por la fuerza de la corriente, que arrastra partículas suspendidas que modifican el color natural; en la estación 3 el cambio se debe a la descarga textilera del teñido de telas, específicamente mezclilla. Los cambios subsecuentes se deben a las descargas de industrias procesadoras de alimentos, metalúrgicas, químicas y de colectores industriales, que imparten al agua un color negro de las estaciones 4 a 8. Estas descargas provocan también el surgimiento de olor a ácido sulfhídrico a partir de la estación 4, indicando aumento en la actividad biológica y contaminación industrial severa. La variación de temperatura de la estación 1 a la 9 fue de 4°C, aumento debido, probablemente, a procesos industriales que generan agua caliente que influye en la tasa de crecimiento biológico, en las reacciones químicas, en la solubilidad de los contaminantes y en el desarrollo de la biota. La conductividad eléctrica en la estación 3, donde inician las descargas industriales, se incrementa significativamente hasta la estación 8 disminuyendo en la 9. A mayor conductividad eléctrica, mayor es el contenido de sólidos disueltos en formas iónicas y provenientes de las descargas industriales. El valor de pH 8 registrado en la estación 3 se debe a las descargas municipales y a la actividad de procesos industriales (textil, químico y petroquímico). Algunas industrias utilizan procesos neutralizantes en sus descargas a base de bicarbonatos y carbonatos que justificarían el incremento del pH, específicamente en esta estación, pero ello no puede asegurarse. La estación 2 recibe descargas municipales, no obstante, tiene el nivel de OD más alto, indicando que posee capacidad para mantener vivos organismos aerobios y plantas. Las otras estaciones muestran niveles de OD dentro del límite establecido en los CE-CCA-001/89, por lo que el río cuenta con capacidad autodepurativa (Sperling, 2001). Sólo el valor de OD en la estación 9 está fuera de la norma, indicando contaminación en ese punto e imposibilitando la supervivencia de la biota (Iriondo y Mota, 2004). Los parámetros de campo muestran el estado tangible del río, las variaciones en el caudal y su velocidad, los cambios de color y olor muestran la magnitud de las descargas que lo impactan,

causantes de su deterioro. La estación 7 sobresale por sus valores altos de SST y SDT debido a partículas orgánicas (materia descompuesta y compuestos químicos) e inorgánicas (iones y moléculas disueltos en el agua, minerales, metales) en solución, que podrían interactuar con los agentes químicos y biológicos responsables de los cambios de color (negro) y olor (ácido sulfhídrico) antes discutidos, que pueden incrementar la toxicidad. La estación 7 también resalta por sus altos niveles de DBO5 y DQO (Guerra-Hernández et al., 2008), lo cual indica la insuficiencia de O2 necesario para degradar por medios biológicos y oxidar la materia orgánica por medios químicos (Sperling, 2001). La estación 9 muestra también un DQO alto debido a que es el reservorio de toda la materia orgánica que se vierte al río. Las estaciones 5 y 8 muestran valores de GyA elevados, debido a los procesos que se llevan a cabo en las industrias química, petroquímica, textil y farmacéutica, y descargas municipales. La grasa en aguas residuales interfiere con la vida acuática creando películas de materiales en flotación y afectando los procesos biológicos naturales del agua. El Ntotal (Norgánico y Namoniacal) está presente en exceso en todas las estaciones, debido a desechos domésticos, agrícolas e industriales. El Namoniacal está presente en el agua en forma de amonia libre (NH3) y del catión amonio (NH4+), indicando contaminación reciente en el cuerpo de agua y su efecto es nocivo para la fauna acuática (Jiménez, 2002). Las estaciones 1, 2 y 4 presentan alta concentración de Nnitritos+Nnitratos. Es probable que la presencia de bacterias inicie un proceso de desnitrificación llegando hasta la generación de N2 molecular. Otras fuentes importantes de nitrato son los fertilizantes, principalmente en época de lluvia (Jiménez, 2002). La presencia de Ptotal en todas las estaciones se debe al uso excesivo de fertilizantes, detergentes y a procesos de descargas industriales. Los Porg y los Porto son producto de las descargas de agua de acondicionamiento para tuberías, torres de enfriamiento, calentadores y calderas. Siendo considerados como parámetros críticos en la calidad del agua por su influencia en el proceso de eutrofización, no se encuentran regulados por ninguna norma. Los resultados obtenidos muestran los metales que se encuentran por debajo del límite de detección del equipo a niveles traza; éstos son Cu, Cr, Pb, Zn y Al, no representando peligro en el río. As, Cd, Ni, Fe y Mn están por debajo de los LMP de la normativa mencionada; sin embargo, su afluencia debe monitorearse continuamente para detectar su origen. La presencia de As, Cd y Ni se debe a descargas de empresas ubicadas en la estación 7, principalmente de tipo metalúrgica, química, automotriz y al uso de pesticidas, de acuerdo con Klaassen y Watkins (2001). El Cd puede ser generado por industrias de pinturas, plásticos, y los lodos de aguas domésticas y/o tratadas. El Ni presente en el río quizás proceda de plantas alimenticias, bebidas, tenería y textil. También se cuantificaron metales que no se incluyen en norma alguna, como Fe y Mn. El primero solo se detectó en la estación 8, y ambos en la 9. Estos elementos se combinan con la materia orgánica formando coloides de difícil sedimentación que aportan un olor desagradable y color indeseable, lo cual coincide con Helmut,

1991; Rainer, 1991. Por arriba de los LMP establecidos los metales detectados fueron Hg y Cr+6, en la estaciones 5 y 8 respectivamente. La presencia de Hg se debe a descargas de la industria textil, química, petroquímica y metalúrgica; no obstante no es posible asegurar que estas empresas hagan uso excesivo de Hg y/o sus derivados, lo que coincide con Klaassen y Watkins, 2001 y que sean responsables de su presencia en el río. La alta concentración de Hg puede derivar de cenizas dispersadas de volcanes (Popocatépetl) en el resto de las estaciones. La presencia de Cr+6 en la estación 9 puede deberse a descargas de tipo textil y otras como tenerías, galvanoplastias, metalúrgicas, producción de pigmentos y fertilizantes. El exceso de coliformes y la DBO5 en la estación 7 tienen un origen común de contaminación, que puede ser identificado en la Figura 2 con descargas de tipo municipal e industrial (alimenticia, bebidas, tenerías, petroquímica, química y otras). Los hallazgos con V. fischeri muestran toxicidad moderada en las estaciones 3 y 4, pero alta de la 5 a la 9, posiblemente debido a las concentraciones elevadas de Ntotal, quizá como resultado de la descomposición de la materia orgánica. El Namoniacal forma NH3 y NH4+ en el agua, elevando la toxicidad. La toxicidad también puede deberse a la presencia de compuestos orgánicos, como hidrocarburos poliaromáticos, herbicidas y pesticidas. Con D. magna se detectó toxicidad leve en la estación 3 (1UT); en las estaciones 4 a 9 se detectaron valores de 2 a 4UT, a pesar de que se registraron concentraciones traza de metales (Tabla VI). La prueba de Ames utiliza dos cepas, TA98 y TA100. La diferencia entre ellas es que la primera tiene una mutación frameshift y la otra una puntual en un par de bases (Takiya et al., 2003). Si las pruebas resultan positivas, existe un 99% de probabilidad de afectar la salud humana por carcinogénesis (Umbuzeiro et al., 2001; Takiya et al., 2003). Con la cepa TA98 -S9 se detectó mutagenicidad alta en la estación 6, mientras con TA98 +S9 en la estación 8. Por otro lado, con la cepa TA100 -S9 se registró mutagenicidad alta en la estación 8, pero no se detectó con la TA100 +S9. Los resultados de la prueba de Ames con S. typhimurium (TA98 y TA100 sin y con activación metabólica) sugieren la presencia de compuestos orgánicos (hidrocarburos poliarómaticos, pesticidas, emulsificantes, plastificantes, dispersantes) y compuestos volátiles orgánicos (benceno, tolueno, etc.), cuya presencia se deberá determinar en el río, lo cual coincide con Umbuzeiro et al., 2001; Takiya et al., 2003).

Los parámetros de campo indican el daño en el Río es causado por la contaminación debida a los asentamientos humanos y al desarrollo industrial al efectuar sus descargas en este cuerpo de agua, a pesar de haber dado un tratamiento previo a las mismas, lo cual resalta la necesidad de incluir pruebas de toxicidad y mutagenicidad en la legislación vigente. El grado de deterioro detectado con los parámetros de campo en las estaciones fue 1, 2 <3, 5 <4, 6, 7 <8, 9.. La contaminación microbiológica rebasa el LMP en todas las estaciones, destacándose la 7 y la 9 (Tabla VII), resultados que coinciden con los de Silva et al.,

(2002) quienes reportaron contaminación del río por drenajes municipales e industriales. Los resultados de los análisis toxicológicos y mutagénicos revelaron la presencia de compuestos tóxicos que no fueron detectados por los métodos de análisis convencionales de la estación 3 a la 9. V. fischeri registró toxicidad de menor a mayor concentración en las estaciones 4 <3 <7 <6 <9 <8 <5. D. magna, en orden de menor a mayor concentración, en las estaciones 3 <6 <5 <4 <7 <9 <8. La prueba de Ames detectó mutagenicidad de menor a mayor concentración en las estaciones 4 <3 <5 <8 <9 <6. Los resultados posiblemente se deban a la presencia de compuestos orgánicos (HPA's), que no fueron determinados en este trabajo por no estar incluidos en las normativas actuales y están siendo evaluados a raíz de los resultados toxicológicos y mutagénicos. La norma vigente se respeta y se pone en práctica; sin embargo, no es suficiente para determinar con mayor precisión el deterioro en la calidad del agua del río. En la medida en que este tipo de bioensayos sea accesible será una alternativa para un mejor monitoreo de las descargas, por lo cual se hace necesario cambiar la legislación vigente como un reto a corto plazo, con el fin de generar información para la toma de decisiones por las instancias pertinentes, en concordancia con Saldaña et al. (2002a, b) y CONAGUA (2007a, b). Por otro lado, se debe mejorar la eficiencia de las PTARs municipales e industriales, ya que esto permitiría contar con medidas de saneamiento especificas para los problemas detectados en este estudio, tales como el implemento de tratamientos avanzados, con nuevas tecnologías de clarificación biológica con enzimas u organismos inmovilizados (Salgado *et al.,* 2006; Núñez *et al.,* 2007); de desodorización, empleando reactores biológicos como biofiltros (Le Cloire *et al.,* 2001); de nanofiltración avanzada para eliminar SST (Adham *et al.,* 2006); de remoción de nutrientes por procesos de nitrificación-desnitrificación, remoción de amonio acuoso (Arriaga *et al.,* 2003), desgasificación del amoniaco, precipitación química, asimilación; de remoción de compuestos inorgánicos disueltos mediante electrodiálisis, intercambio iónico, ósmosis inversa y precipitación (Kabra *et al.,* 2004); eliminación de coliformes mediante radiación solar (Rizzo, 2009); y remoción de compuestos orgánicos disueltos por adsorción u oxidación química (Bubnov *et al.,* 2006).

Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico de Cd. Altamirano por la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

5. Referencias

Adham S, Chiue K, Lehman G, Mysore C, Clouet J (2006) Optimization of Membrane Treatment for Direct and Clarified Water Filtration. Report Series 91111F ISBN 9781843399674. AWWARF. Denver, CO, EEUU. 196 pp.

Arriaga ARE, Garcia LRA, Soto GGE (2003) A Peach stone activated carbon chemically modified to absorb aqueous ammonia. J. Chil. Chem. Soc. 48: 65-68.

Bubnov AG, Grinevich VI, Maslova ON (2006) Barrierdischarge plasma treatment of surface water to remove organic compounds. Rus. J. Appl. Chem. 79: 934-940.

Bulich AA (1982) A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Proc. Biochem. (March-April); 45-47.

CONAGUA (2007a) Estudio y Declaratoria de Clasificación de los Ríos Atoyac y Zahuapan. www.ccbalsas.org. mx/GruposConsejo/GrupoSegEvaluacion/ Presentaciones/ pres31sesion/6APresentacion_ RioAtoyac-Zahuapan.pdf

CONAGUA (2007b) Clasificación de Cuerpos de Agua Nacionales Río Atoyac y Zahuapan.www2.ine.gob.mx/ argas/pres_proname_ago2008_e_gutierrez. Pdf

Flores QR, Aceves-Capri S, Ramírez MI (2004) Viabilidad del Potencial Uso Acuícola de la Carpa Común (Cyprinus carpio) en la Presa Manuel Ávila Camacho, Puebla, México. www.tupublicas.com/ docs/04-03-2004-53-expocien.pdf.

Guerra-Hernández E, Balán-Hernández LL, Guerrero OR, Campos LLS (2008) Una mirada a los recursos hídricos en la zona alta de la subcuenca del Río Atoyac. Mem. VII Cong. Int., XIII Cong. Nac., III Reg. de Ciencias Ambientales. 4-6 Junio. Cd Obregón, México.

Helmut AH (1991) Iron. En Merian E (Ed.) Metals and their Compounds in the Environment. VCH. Nueva York, NY, EEUU. pp 945-958.

INEGI (2004) Anuario Estadístico. Puebla. Tomo I y II. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, México.

INEGI(2008)www.mapserver.
negi.org.mx/geografía/español/estados/endomex/
sombreado_riocfm?c=444&e=18

Iriondo A, Mota J (2004) Desarrollo de una red neuronal para estimar el oxígeno disuelto en el agua a partir de instrumentación de EDAR. XXV Jornadas de Automática. 8-10 de Septiembre. Universidad de Castilla la Mancha. Ciudad Real, España.

Jiménez CBE (2002) La contaminación ambiental en México. Cap. 2. La Contaminación del Agua. Limusa. México. pp. 33-315.

Kabra K, Chaudhary R, Sawhney RL (2004) Treatment of hazardous organic and inorganic compounds through aqueous-phase photocatalysis: A review. Indust. Eng. Chem. Res. 43: 7683-7696.

Klaasen CD, Watkins BJ (2001) Efectos tóxicos de metales. En Manual de Toxicología. Capítulo 23. McGraw–Hill. México. pp. 659-722.

Le Cloire P, Humeau P, Ramírez-López EM (2001) Biotreatments of odours: control and performance of biofilters and a bioscrubber. Water Sci. Technol. 44: 219-226.

Ley Federal de Derechos de Agua (2007) Reforma 35 www.diputados.gob.mx/Leyes Biblio/ ref/lfd/LFD_ref35_24dic07. pdf .

Mangas RE, Sánchez MM, Molina A, Hugo R, García-Flores LM, Muñoz-Gutiérrez I, Zumaquero RJL (2005) Análisis de las Políticas de Rehabilitación de Presas: El Caso de la "Presa de Valsequillo" en el Estado de Puebla. www. comunicacion.buap.mx/ ortajes_especiales/reportaje_especial_valsequillo.html

Méndez GT, Flores RA, Palacios MS (1995) Presencia de Pb, Cr, Co y Cd en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 030 Tecamachalco Estado de Puebla. Mem. XXVI Cong. Nac. Ciencia del Suelo. Cd. Victoria, México. p. 36.

Méndez GT, Rodríguez DL, Palacios M (2000) Impacto del riego con aguas contaminadas evaluadas a través de la presencia de metales pesados en suelos. Terra 18: 277-278.

Mortenmals K, Zeiger E (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mut. Res. 455: 29-60.

Navarro AE, Rincón C, Rosas E, Aguilar AP, Contreras S, Caso LR, Bayona JM, Velasco F, Sánchez A, Vázquez A, Martínez CT, Díaz M, Pérez A, Malajevich A, Cuellar I, Navarrete D, Cid S (2007) El agua en la Subcuenca del Nexapa, México: Necesidad de una gestión integral. Conferencia Latinoamericana de Saneamiento. 12-16 Noviembre. Cali, Colombia. Norma Mexicana NMXAA-003-1980 SCFI Aguas Residuales-Muestreo www. semarnat. gob.mx/leyesynormas/Normas%20Mexicanas%20vigentes/NMXAA-003-1980.pdf.

Norma Mexicana NMX-AA087-1995-SCFI Análisis de Agua-Evaluación de Toxicidad Aguda con Daphnia magna Status (CrustaceaCladocero)-Método de Prueba. www. semarnat.gob.mx/ leyesynormas/Normas%20 Mexicanas%20vigentes/ NMX-AA-087-1995.pdf.

Norma Mexicana NMX-AA-1121995-SCFI Análisis de Agua y Sedimentos-Evaluación de Toxicidad Aguda con Photobacterium phosphoreumMétodo de Prueba.www. .mx/leyesynormas/Normas%20Mexicanas%20vigentes/NMXAA-112-1995.pdf.

Norma Oficial Mexicana NOM001-ECOL-1996 Que Establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales. www. economia.gob.mx/work/normas/noms/1997/001-ecol. Pdf.

Núñez APN, Cruz SR, Folch MJL, Villegas E (2007) Degradación de los colorantes, remazol brilliant blue R y 4-phenylazoaniline con lacasas fúngicas libres e inmovilizadas. Mem. VII Cong. Nac. Biología Molecular y Celular de Hongos de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. 5-8 Nov. Guanajuato, México.

OECD (1995) Guidelines for testing of chemicals Genetic Toxicology: Salmonella typhimurium.Reverse. Mutat. Assay 471: 1-9.

Rainer SE (1991) Manganeso. En Merian E (Ed.) Metals and their Compounds in the Environment. VCH. Nueva York, NY, EEUU. Cap. II-19.

Rizzo L (2009) Inactivation and injury of total coliform bacteria after primary disinfection of drinking water by TiO2 photocatalysis. J. Haz. Mat. 164: 48-51.

Saldaña FP, Gómez BMA (2006) Caracterización de fuentes puntuales de contaminación en el río Atoyac, México. Mem. XXX Cong. Interam. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 26-30 Nov. Punta del Este, Uruguay.

Saldaña FP, Alcocer Y VH, Lerdo de Tejada BA, Gómez BMA (2002a) Calidad del Agua en Colectores de la Ciudad de Puebla y la Aplicación de Análisis de Toxicidad. XXVIII Cong. Interam. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 27-31 Oct. Cancún, México.

Saldaña, P, Lerdo de Tejada A, Gómez MA, López R (2002b) La importancia de incluir análisis de toxicidad en descargas industriales y municipales que afectan los cuerpos receptores. Cong. Nac. Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 17-20 Abr. Guanajuato, México.

Salgado J, Sandoval AM, Espinosa E, Dantán E, Silva S, Méndez M, Folch JL, Villegas E (2006) Purificación y caracterización de lacasas extracelulares de Pycnoporus sanguineus aplicadas al tratamiento de colorantes y evaluación toxicológica del proceso. Mem. V Cong. Int. y XI Cong. Nac. de Ciencias Ambientales. 7-9 de Junio. Oaxtepec, México.

Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) (1989) Acuerdo por el que se Establecen los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua CE-CCA-001/1989. Diario Oficial de la Federación del 2/12/1989. Tomo CDXXX, No 9. México.

Silva GSE, Muñoz OA, De la Isla de Bauer ML, Infante GS (2002) Contaminación ambiental en la región de Atlixco: 1 Agua. Terra 20: 243-251.

Sperling MV (2001) Princípios Básicos do Tratamento de Esgotos. 4ª ed. Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil. 211 pp.

Takiya T, Horie Y, Futo S, Matsumoto Y, Kawai K, Zuzuki T (2003) Rapid selection of nonhotspot mutants among hidD+ revertants of Salmonella typhimurium TA98 in Ames test by peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR clamping. J. Biosci. Bioeng. 96: 588-590.

Umbuzeiro A, Roubicek D, Sánchez P, Sato MZ (2001) The Salmonella mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. Mut. Res. 49: 119-126.

Valladares MR, Flores E, Navarro I (2005) Estudio de la calidad del agua residual que descarga al Río Atoyac: comunidades, ong, e investigadores unidos. II Encuentro participación de la mujer en la Ciencia. 19-20 Mayo. León, México.

Capítulo 30

CONCENTRACIONES DE METALES EN LA POBLACIÓN DE LA TORTUGA LORA *Lepidochelys kempii* QUE ANIDA EN EL SANTUARIO PLAYA DE RANCHO NUEVO, TAMAULIPAS, MÉXICO.

Alma Delia Nava Montes[1*]

Patricia Ramírez Romero[1]

[1] Laboratorio de Ecotoxicología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

*delianava@gmail.com

Resumen

La tortuga lora *Lepidochelys kempii* es una especie en riesgo con distribución restringida y, debido a sus hábitos migratorios, longevidad y estancias prolongadas en las áreas de forrajeo, son considerados como organismos bioindicadores del estado de salud del ecosistema marino donde habita. El Golfo de México ha sido impactado por actividades antropogénicas, motivo por el cual, es receptor de una diversidad de sustancias tóxicas que se liberan en sus aguas. Las poblaciones de tortugas marinas que habitan este ecosistema están expuestas a contaminantes, entre éstos los metales. El presente estudio determinó las concentraciones de metales potencialmente tóxicos en sangre de tortuga lora que anida en el Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, México, con el fin de contribuir a generar la línea base de elementos tóxicos en dicha especie. De un total de 11 metales analizados en 42 muestras de sangre de tortuga lora colectadas en el 2015, se detectaron cuatro con el siguiente patrón de concentraciones promedio Al > As > Ba > Hg, el resto de los metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y V) presentaron valores <LD. El mercurio obtuvo el mayor porcentaje de detección (60%) con una mediana de concentración de 68.75 ± 52.91 µg/kg Base Húmeda. Las concentraciones promedio obtenidas en este estudio para Al, As, Ba y Hg son los primeros valores de referencia registrados para la tortuga lora, excepto para el Hg. Cabe resaltar que, en México no existe una norma o guías que establezcan los niveles de probabilidad de efectos de metales en biota, principalmente para especies silvestres.

Palabras Clave: Lepidochelys kempii, tortuga lora, metales, Rancho Nuevo, Tamaulipas.

1. Introducción

Existen siete especies de tortugas marinas distribuidas a nivel global las cuáles, se encuentran en diferentes estados de conservación. De éstas, seis especies se distribuyen en México: *Chelonia mydas* (tortuga verde), *Caretta caretta* (tortuga caguama), *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina), *Lepidochelys kempii* (tortuga lora), *Eretmochelys imbricata* (tortuga carey) y *Dermochelys coriacea* (tortuga laúd) (CONANP, 2017). Estas ocupan diferentes nichos ecológicos en sistemas marinos estuarinos y se alimentan a través de forrajeo de distintos niveles tróficos; algunas especies cambian sus hábitos alimenticios a lo largo de su vida siendo, las especies que se encuentran en los niveles más altos de la cadena alimenticia, las que están más expuestas a altas concentraciones de metales (Cortés-Gómez et al., 2017). Su ciclo biológico las vuelve sujetos de estudio interesantes por desarrollarse en la interfase del medio marino y el terrestre. Durante la anidación (puesta de los huevos) es más fácil realizar estudios específicos de su fisiología y de la presencia de contaminantes en su sangre.

Las tortugas marinas han sido afectadas por diversos contaminantes marinos como residuos (urbanos, industriales y agrícolas), alquitranes y sustancias tóxicas como metales pesados y compuestos organoclorados (Storelli & Marcotrigiano, 2003). Los elementos potencialmente tóxicos (EPT), como algunos metales, son altamente persistentes en el ambiente, se bioacumulan a través de las cadenas alimenticias en los organismos y tienen la capacidad de afectar la salud de la vida silvestre. La respuesta de algunos grupos biológicos como los reptiles a la exposición de sustancias químicas ha sido poco estudiada en comparación con otros vertebrados y menos aún los efectos de los elementos tóxicos en las tortugas marinas (Perrault et al., 2017).

Los metales son elementos químicos que se encuentran en la naturaleza y están sujetos a los ciclos biogeoquímicos, los cuales determinan su presencia y concentración en los diferentes compartimentos ambientales: suelos, sedimentos, aguas subterráneas y superficiales, aire y biota. Sin embargo, las actividades antropogénicas pueden contribuir a incrementar estas concentraciones en el ambiente, su persistencia depende de las propiedades físicas y químicas del compuesto químico, lo cual determina su movilidad ambiental y biodisponibilidad (Moreno, M.D., 2003). La contaminación de los ecosistemas y la exposición a metales tóxicos, debido a actividades naturales y/o antropogénicas, constituye una preocupación social y científica. Aunque algunos de esos metales son micronutrientes esenciales para los organismos a bajas concentraciones, su presencia en exceso puede tener efectos adversos sobre la salud (Cuello, 2017).

La entrada de metales a los ambientes marinos es consecuencia de procesos naturales como la erosión y la lixiviación, y su disponibilidad se ve influenciada por el crecimiento urbano e industrial. La rápida expansión del desarrollo antropogénico costero significa que los hábitats críticos de forrajeo y desarrollo, de las tortugas marinas, a menudo ocurren cerca de ambientes altamente contaminados y urbanizados (da Silva et al., 2014). Aunque la contaminación costera está muy extendida, el impacto que esto tiene en vertebrados de vida larga como las tortugas marinas (Ej. *Chelonia mydas*) no está claro (Komoroske et al., 2011).

Las tortugas marinas se caracterizan por ser longevas, tener tasas altas de consumo diario, pocos mecanismos de desintoxicación desarrollados y permanecen por periodos largos de tiempo en las áreas de forrajeo, las cuales proliferan cercanas a fuentes de contaminación donde existen los nutrientes necesarios para su desarrollo, características que facilitan la bioacumulación de metales pesados en estas especies (Perrault et al., 2017; Ross et al., 2017).

Los elementos inorgánicos (Pb, Cd, Hg, Al, As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se y Zn) están presentes a nivel mundial en los sistemas acuáticos y su posible transferencia a las tortugas marinas puede ser una amenaza grave para su estado de salud (Cortés-Gómez et al., 2017).

Existen tres vías principales por las cuales los metales pueden ingresar a los organismos: ingestión de alimentos, consumo de agua y/o absorción por la piel. Estos contaminantes pueden entrar a los organismos marinos por la ingesta de alimento o la toma de agua, ingresando al torrente sanguíneo, moviéndose primeramente hacia el hígado donde se pueden bioacumular, a lo largo del tiempo, causando efectos letales o subletales para luego ir gradualmente a otros tejidos en otros órganos como los reproductivos, a menos que éstos sean eliminados vía excreción o desintoxicación. Los mecanismos de excreción pueden ser por acumulación de metales en el caparazón o a través del tracto digestivo o glándulas salivales; asimismo, las hembras pueden eliminar los metales a través de los huevos, los cuales traen una carga almacenada de contaminantes acumulados derivados de los alimentos ingeridos durante la formación de éstos (Al-Rawahy et al., 2007). Uno de los mecanismos de desintoxicación es la transformación del metilmercurio en formas menos tóxicas (Cuello, 2017).

La dieta, la fisiología y las concentraciones de contaminantes ambientales son factores que tienen un impacto en la acumulación de metales en los organismos marinos (Perrault et al., 2017; Ross et al., 2017), siendo la dieta la principal causa de la bioacumulación de metales en las tortugas marinas (Camacho et al., 2013; Camacho et al., 2014).

Algunos autores han coincidido en la selección de la matriz biológica sangre para medir contaminantes en tortugas marinas, como los metales, por ser un método relativamente sencillo, no dañino para los organismos y considerando que la sangre es un medio de intercambio y transporte de sustancias químicas entre los tejidos de éstos (Suzuki et al., 2012). Por su parte, Ley-Quiñónez et al. (2013) apoya también el uso de esta matriz (sangre) para determinar los niveles de contaminantes en tortugas marinas señalando que, puede existir una correlación entre los procesos de absorción, acumulación y circulación de metales con su biodisponibilidad y toxicidad, lo cual puede ser observado en la sangre y propone a estos organismos como centinelas para evaluar el estado de salud de los ecosistemas marinos (Ley-Quiñónez et al., 2013).

Las concentraciones de sustancias químicas en sangre representan una aproximación de la exposición reciente a contaminantes (Komoroske et al., 2011). Las tortugas marinas han sido consideradas como organismos indicadores del estado de salud de los ecosistemas marinos con el fin de desarrollar estrategias de conservación y programas de protección de estas especies debido a su longevidad, posición trófica y movilidad, lo cual permite la integración de contaminantes procedentes de diversas áreas (Cortés-Gómez et al., 2017; Sakai et al., 2000).

En las tortugas marinas se han medido contaminantes orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados (BPC) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), además de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como los metales, en diferentes matrices biológicas (huevos, hígado, riñón, sangre completa, plasma de sangre, caparazón, sistema reproductivo, músculo, entre otros) (Camacho et al., 2014; Páez-Osuna et al., 2010; Sakai et al., 2000; Swarthout et al., 2010).

La comprensión de los efectos de los contaminantes en las tortugas marinas ha tomado relevancia global (Perrault et al., 2017). En la literatura existen varios estudios realizados en las siete especies de tortugas marinas, que registran concentraciones de metales en distintas matrices biológicas. En una revisión realizada por Cortés-Gómez et al. (2017) se compilan los estudios publicados a nivel internacional sobre medición de contaminantes en todas las especies de tortugas marinas, clasificándolos por tipo de matriz biológica: grasa (13), músculo (28), riñón (27), hígado (33) y sangre (36), siendo ésta última la más estudiada.

A nivel mundial se han realizado los siguientes estudios sobre concentraciones de metales en sangre: 5 (*Lepidochelys olivacea*), 3 (*Lepidochelys kempii*), 10 (*Caretta caretta*), 11 (*Chelonia mydas*), 6 (*Dermochelys coriacea*), 4 (Eretmochelys imbricata) y uno (Natator depressus). Para la especie *Lepidochelys kempii* únicamente existen publicados tres estudios de análisis de metales en sangre, lo cual hace relevante el presente estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios sobre concentraciones de metales en sangre de tortugas marinas a nivel mundial.

Especie	Región	Referencia
Lepidochelys olivacea	Océano Pacífico, México. Golfo de California, México Océano Pacífico, México	Páez-Osuna et al., 2010, 2011; Páez-Osuna et al., 2010 Zavala-Norzagaray A.A. et al., 2014 Cortés-Gómez et al., 2014
Lepidochelys kempii	Golfo de México, EUA Atlántico, EUA y México Atlántico, EUA	Kenyon et al., 2001 Wang, 2005 Innis et al., 2008
Caretta caretta	Mediterráneo, Egipto Italia Cabo Verde Golfo de México, EUA Atlántico, EUA España Pacífico, México Atlántico, EUA Australia Noreste Mar Mediterráneo	Abdallah et al., 2011 Ancora et al., 2012 Camacho et al., 2013 Day, 2003 Deem et al., 2009 Jerez et al., 2010 Ley-Quiñónez et al., 2011 Register, 2011 Trocini, 2013 Yipel et al., 2017
Chelonia mydas	Pacífico, México Cabo Verde Brasil, Atlántico Australia Pacífico, EUA Pacífico, México Pacífico, México Pacífico central, EUA Brasil Australia Noreste Mar Mediterráneo	Aureoles, V. 2007 Camacho et al., 2014 da Silva et al., 2014 y 2016 van de Merwe et al., 2010 Komoroske et al., 2011 Labrada et al., 2011 Ley-Quiñónez et al., 2013 McFadden, et al., 2014 Setim Prioste et al., 2015 Villa et al., 2017 Yipel et al., 2017
Dermochelys coriacea	República de Gabon Guiana Francesa Atlántico, EUA Pacífico, EUA Atlántico, EUA	Deem et al., 2006 Guirlet and Girondot, 2008 Innis et al., 2008 Harris et al., 2011 Perrault et al., 2011; Perrault et al., 2013
Eretmochelys imbricata	Atlántico, Mar Adriático Cabo Verde Japón Irán	Bucchia et al., 2015 Camacho et al., 2014 Suzuki et al., 2012 Ehsanpour et al., 2014
Natator depressus	Australia	Ikonomopoulou et al., 2011

Fuente: Modificada de Cortés-Gómez, A.A., et al. (2017).

En una revisión de 95 estudios realizada por Ross et al. (2017) se registraron concentraciones de As, Cd, Hg, y Pb en distintas matrices biológicas de las siete especies que se distribuyen a nivel mundial. Las dos especies más estudiadas fueron *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*, estos estudios incluyeron análisis de hígado (20%), riñón (14%), músculo (13%), sangre (12%) y huevos (8.2%) (Ross et al., 2017). Estas especies tienen diferente distribución geográfica y son consumidas por el humano, por lo que el autor concluye que, debido a la presencia de estos metales y su acumulación en el organismo, existe un riesgo a la salud de los consumidores. Por su parte, Finlayson et al., (2016) realizó otra revisión en la literatura y de un total de 45 investigaciones, dos son referidas a concentraciones de contaminantes en *Lepidochelys kempii*: Innis et al. (2008) quienes analizaron Hg, Se. Cu y Zn y PCB, y Swarthout et al. (2010) quienes determinaron DDT, OC y PBDE.

Las especies más estudiadas a nivel mundial son *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*. (Cortés-Gómez et al., 2017; Ross et al., 2017). En lo referente a *Lepidochelys kempii*, objeto del presente estudio, existen pocos estudios sobre niveles de metales en sangre. En la literatura se encontraron tres investigaciones, una coincide con el área de estudio Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, México (Wang, 2005) y los otras dos corresponden a trabajos realizados en Cape Cod, Massachusetts (Innis et al., 2008) y en Florida (Kenyon et. al., 2001) en la porción norte del Golfo de México perteneciente a Estados Unidos de América (EUA).

Los estudios sobre contaminantes desarrollados en el Golfo de México hasta el presente indican que, las concentraciones de hidrocarburos y metales derivados del petróleo en los sedimentos marinos están restringidas a la plataforma continental frente a Tamaulipas (Ponce-Vélez et al., 2006), lo cual coincide con la localización del área de anidación de la tortuga lora objeto de este estudio.

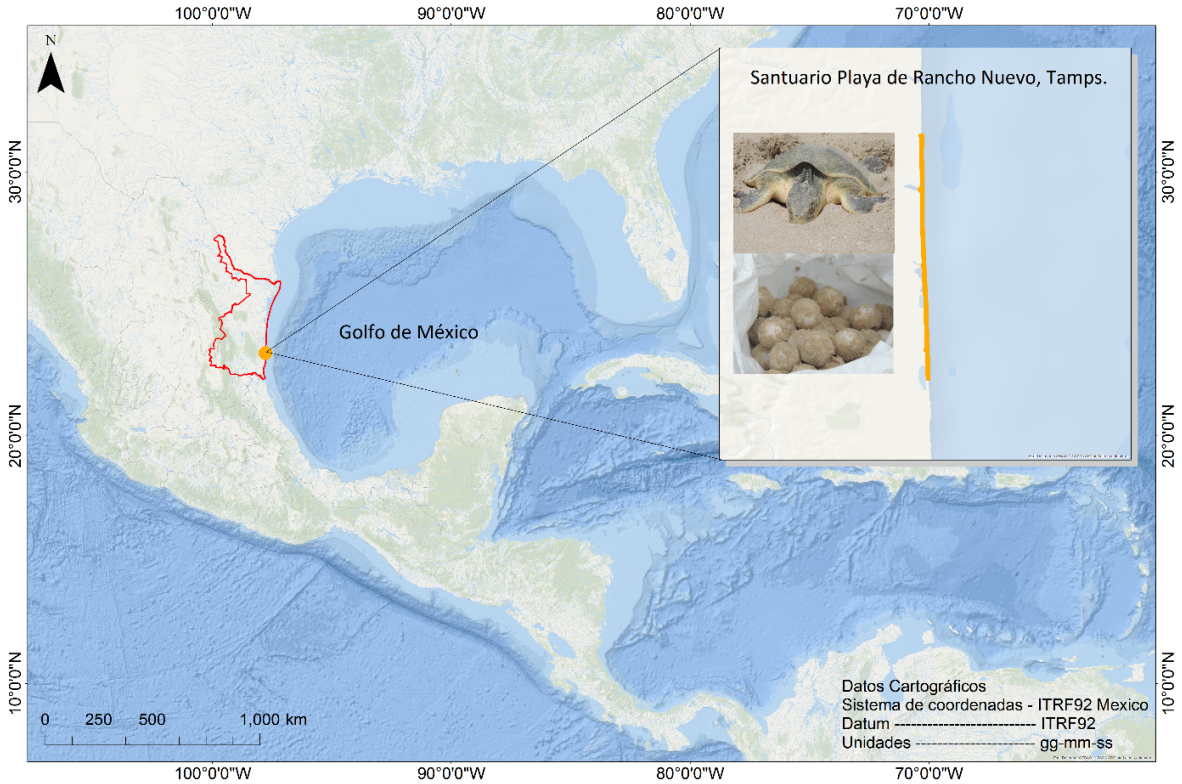
Con la presente investigación se generó información actualizada de línea base sobre la presencia de metales en sangre de la tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) que anida en el Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, especie incluida con la categoría de peligro en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres (D.O.F., 2010). Esta información es relevante dada la distribución restringida de la especie en el Golfo de México y puede ser útil para incluir, tanto en los programas de conservación y protección de la especie como en el plan local de contingencias sobre derrames de hidrocarburos y otras sustancias nocivas, acciones para mitigar la exposición de la población de tortuga lora a contaminantes, principalmente en las zonas de anidación y alimentación en la porción mexicana del Golfo de México.

2. Material y Métodos

2.1 Área de estudio

El área de estudio es el Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, México, localizado en los paralelos Norte 23°18'10" N, 97°45'40" W y Sur 23°10'00" N, 97°45'30" W (Fig. 1). Es una de las 13 ANP pertenecientes a la Región Planicie Costera y Golfo de México reconocidas a nivel mundial por su alto valor ambiental (CONANP, 2018); es sitio RAMSAR No. 1326 con fecha de designación del 27 de noviembre de 2003 (RAMSAR, 2019) y es el sitio preferente de anidación de la tortuga lora *Lepidochelys kempii* (CONANP, 2019).

Figura 1. Localización del área de estudio.



Fuente: De elaboración propia.

2.2 Muestreo

Se realizó un muestreo durante la temporada de anidación de la tortuga lora en las playas del Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, en el periodo comprendido de mayo a junio del 2015. Se llevaron a cabo recorridos de campo

diurnos en vehículos (cuatrimotos), tres veces al día, a lo largo de la playa de 30 Km de largo para la toma de muestras.

Se colectaron un total de 42 muestras de sangre (permiso de colecta científica No. SGPA/DGVS/04000/15, de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT) con apoyo del personal de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).

Las muestras de sangre se colectaron durante el desove de la tortuga lora y antes de su retorno al mar, una por organismo, mediante una punción en los senos cervicales dorsales (Owens y Ruiz, 1980). Con una aguja de calibre 20 se tomaron 6 ml de sangre en un tubo Vacutainer con heparina de litio para evitar la coagulación (Fig. 2). Las muestras de sangre fueron transportadas en hieleras al campamento tortuguero, entre 1-3 horas después de ser colectadas, y conservadas a 4°C hasta su posterior análisis en los Laboratorios Ambientales del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático en la Ciudad de México.

Fig. 2 Colecta de muestra de sangre en seno venoso dorsal con tubo Vacutainer.



Fuente: De elaboración propia.

Se realizó una evaluación física externa para anotar el estado de salud aparente de cada hembra y se tomaron las mediciones biométricas con una cinta métrica: largo curvo del caparazón (LCC) y ancho curvo del caparazón (ACC), y peso del organismo (Fig. 3)

Fig. 3 Mediciones morfométricas *in situ*.



Fuente: De elaboración propia.

2.3 Análisis de laboratorio

2.3.1 Determinación de metales en sangre.

El análisis de metales en sangre se realizó mediante el método EPA6010C Determinación de metales mediante plasma inductivo acoplado a espectrómetro de emisión atómica utilizando el equipo ICP-OES, previa digestión de las muestras en horno de microondas Multiwave 3000 marca Anton Paar. Se analizaron los siguientes metales: aluminio (Al), arsénico (As), bario (Ba), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), fierro (Fe), níquel (Ni), plomo (Pb) y vanadio (V).

La determinación de mercurio total (Hg) en sangre se realizó siguiendo el método EPA 7470 A Mercurio en residuo líquido (técnica de vapor frío) modificado. Se hizo una digestión de las muestras utilizando un horno de microondas "Multiwave 3000", marca Anton Paar posteriormente, se realizó una reducción de éstas en baño de agua con regulador de temperatura y se analizaron en el equipo FIMS-400 marca Perkin Elmer (Sistema de análisis de mercurio por inyección de flujo). Se utilizó el material de referencia para Hg total: 1946 Lake Superior Fish Tissue, NIST.

Se obtuvieron los Límites de Detección del Método (LDM) y los Límites de Cuantificación del Método (LCM) para cada analito (Tabla 2). Se utilizaron controles de

calidad para la validación del método y se obtuvo un porcentaje de recuperación > 90%:

Tabla 2. Límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) del método de análisis de metales.

Analito	Unidad	LDM	LCM
Al	(mg/Kg)	4.83	9.67
As	(mg/Kg)	1.71	10.26
Ba	(mg/Kg)	1.6	9.6
Cd	(mg/Kg)	1.48	10.35
Cr	(mg/Kg)	1.59	9.53
Cu	(mg/Kg)	2.38	9.52
Fe	(mg/Kg)	464.82	929.65
Hg	(µg/Kg)	50.7	101.4
Ni	(mg/Kg)	1.37	9.58
Pb	(mg/Kg)	2.34	10.3
V	(mg/Kg)	1.92	9.6

Fuente: De elaboración propia.

2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software STATISTICA Versión 10, Stat Soft, Inc. Se realizaron las pruebas de normalidad Kolmogorov – Smirnof & Lilliefors y Shapiro Wilk's – W para conocer si los datos presentaban una distribución normal. Se obtuvieron el promedio, la mediana, los rangos (máximo y mínimo) y la desviación estándar para los metales detectados. En el caso de los metales con más del 50% de datos detectados se sustituyeron los valores <LD por la mitad del LD de cada analito.

3. Resultados

3.1 Datos morfométricos

Los promedios de las mediciones morfométricas fueron los siguientes: Largo Curvo de Caparazón (LCC) 66.92 ± 2.42 cm; Ancho Curvo de Caparazón (ACC) 68.92 ± 2.80 cm y Peso 34.73 ± 3.45 Kg.

3.2 Metales

De un total de 11 metales analizados en 42 muestras de sangre de tortuga lora correspondientes al muestreo del 2015, se detectaron cuatro con el siguiente patrón de concentraciones promedio Al > As > Ba > Hg, el resto de los metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y V) presentaron valores <LD. Los porcentajes de detección obtenidos para cada elemento fueron los siguientes: Al (12%), As (26%), Ba (14%) y Hg (60%).

Las concentraciones de Al, As, Ba y Hg no presentaron una distribución normal. Los resultados de la estadística descriptiva, considerando únicamente los datos >LD para Al, As y Ba se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de metales en sangre de *Lepidochelys kempii*.

Metales	n	Promedio	Mediana	Min	Max	SD
Al µg/Kg	5	27,860.00	18,070.00	7,220.00	82,000.00	30,951.31
As µg/Kg	11	3,374.55	3,190.00	1,910.00	7,450.00	1,558.24
Ba µg/Kg	6	4,260.00	2,195.00	1,680.00	12,000.00	4,051.45
Hg µg/kg	42	71.60	68.75	25.35	260.50	51.91

Fuente: De elaboración propia.

En el caso del mercurio éste presentó el mayor porcentaje de detección (60%), una mediana de concentración de 68.75 ± 52.0 µg/kg BH, un rango de Max 260 µg/kg a Min 25.35 µg/kg y una desviación estándar de 51.91 µg/kg.

Se compararon las concentraciones registradas en este estudio con las reportadas por otros autores para la misma especie *Lepidochelys kempii* (Tabla 4). Así como con las concentraciones registradas a nivel mundial en tortugas marinas.

4. Discusión

En este trabajo se midieron las concentraciones de algunos metales en *Lepidochelys kempii* encontrándose que, Al, As y Ba Hg presentaron los mayores porcentajes de detección; sin embargo, únicamente los datos de Hg permitieron hacer un análisis estadístico.

Para comparar los resultados del presente trabajo con lo publicado en la literatura, se elaboró la tabla 4 en la que las concentraciones de los metales se expresan en µg/Kg. Así, se encontraron dos registros de concentraciones de metales en la población de tortuga lora que anidó en las costas de los Estados Unidos de América: (Innis et al., 2008), quien analizó cuatro metales en 16 juveniles de tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) procedentes de Cape Cod, Massachusetts, EUA, obteniendo los siguientes resultados: Hg (24 ± 9 µg/Kg BH) en sangre y Cu (690 ± 680 µg/Kg BH), Zn (2,290 ± 3,550 µg/Kg BH) y Se (490 ± 60 µg/Kg BH) en plasma, y Kenyon, *et al*. (2001), quien reportó Cu (520 µg/Kg BH), Hg (20 µg/Kg BH), Pb (10 µg/Kg BH) y Zn (7,500 µg/Kg BH) en tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) procedentes de Florida, EUA, colectadas entre 1994-1995 con las siguientes características morfométricas: ACC 22 cm, LCC 66 cm y n=106 (Tabla 4).

Asimismo, (Wang, 2005) reportó siete metales en sangre de tortugas lora (*Lepidochelys kempii*) colectadas en Rancho Nuevo, Tamaulipas; estos resultados son complementarios a los obtenidos en el presente trabajo, ya que corresponden exactamente al mismo sitio de muestreo y la misma especie objeto de estudio, quien reporta concentraciones promedio para Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de concentraciones promedio de metales en sangre de *Lepidochelys kempii*.

	Este estudio	Kenyon et al. (2001)	Wang (2005)	Innis et al (2008)
n	42	106	18	29
Matriz	Sangre	Sangre	Sangre	Sangre [a] Plasma [b]
Unidades	µg/kg (BH)	µg/Kg (BH)	µg/kg (BH)	µg/kg (BH)
	Playa de Rancho Nuevo, Tamps. MÉXICO	Florida, EUA	Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas. MÉXICO	Cape Cod, Massachusetts, EUA
Ag	NA	NA	12.9 ± 20.6	NA
Al	27,860 ± 30,951.31	NA	NA	NA
As	3,374.55 ± 1,558.24	NA	NA	NA
Ba	4,260 ± 4,051.45	NA	NA	NA
Cd	<LD	NA	14.9 ± 13.7	NA
Cr	<LD	NA	5.7 ± 8.7	NA
Cu	<LD	520	404 ± 94.0	690 ± 680[b]
Fe	<LD	NA	NA	NA
Hg	71.60 ± 51.91	20	68.6 ± 39.5	24 ± 9[a]

Pb	<LD	10	48.1 ± 24.2	NA
Zn	<LD	7,500	22,700 ± 12,600	2,290 ± 3,550[b]
Se	<LD	NA	NA	490 ± 60[b]
V	<LD	NA	NA	NA

Nota: 2015 (este estudio); >LD Menor al Límite de detección; NA No analizado; BH Base Húmeda. Fuente: De elaboración propia

En el presente trabajo no se analizó Ag, por lo que no se tienen datos para hacer una comparación con los resultados de (Wang, 2005), quien registró una concentración promedio para este elemento de 12.0 ± 20.6 µg/kg (BH) en 18 tortugas lora.

Para los metales Al (18,070 ± 30,951.31 µg/kg, BH), As (3,190 ± 1,558.24 µg/kg, BH) y Ba (2,195 ± 4,051.45 µg/kg, BH), los resultados del presente estudio son los primeros valores de referencia registrados para la tortuga lora *Lepidochelys kempii* que anida en el Santuario Paya de Racho Nuevo, Tamaulipas.

El arsénico es tóxico para varios órganos (Perrault et al., 2017). La mediana de concentración de As (3,190.00 ± 1,558.24 µg/Kg BH) para *Lepidochelys kempii* en este estudio es 5.5 veces más alta que la mediana de concentración (580 ± 850 µg/Kg BH) registrada por (Ross et al., 2017) para las tortugas marinas, principalmente de las especies *Caretta caretta* y *Chelonya mydas*, y 4.4 veces mayor la concentración promedio (3,374.55 µg/Kg BH) que la registrada por (Yipel et al., 2017) para *Caretta caretta* (770 ± 1,110 µg/Kg BH) y *Chelonia mydas* (<LD).

La concentración promedio de Al registrada para *Lepidochelys kempii* en este estudio (27,860 ± 30,951.31 µg/Kg BH) es mayor, por varios ordenes de magnitud, que las concentraciones registradas por (Yipel et al., 2017) para *Caretta caretta* (730 ± 580 µg/Kg BH) y *Chelonia mydas* (560 ± 500 µg/Kg BH), así como por Camacho et al. (2013 y 2014) para *Caretta caretta* (1,070±1,210 µg/Kg BH), *Eretmochelys imbricata* (780±290 µg/Kg BH) y *Chelonia mydas* (1,950 ± 2,350 µg/Kg BH).

En lo referente a Ba no se encontraron datos en la literatura para comparar la concentración registrada en el presente estudio.

En el caso de Fe y V, cuyas concentraciones registradas en el presente trabajo fueron <LD, no existen otros estudios en *Lepidochelys kempii* para establecer comparaciones. Sin embargo; Yipel et al. (2017) registró las siguientes concentraciones de Fe para *Caretta caretta* (12,520 ± 1,950 µg/Kg BH) y *Chelonia mydas* (4,740 ± 1,120 µg/Kg BH).

Las concentraciones registradas en el presente trabajo para Cd, Cr, Cu, Pb y Zn estuvieron por debajo del LD en todos los casos. Comparando estos resultados con los obtenidos por otros autores se tiene que, Wang (2005) registró las siguientes concentraciones (µg/Kg BH) para la misma especie muestreada en el mismo sitio de anidación durante el periodo 2000-2002: Cd (14.9 ± 13.7), Cr (5.7±8.7), Cu (404 ± 94.0), Pb (48.1 ± 24.2) y Zn (22,700 ± 12,600); Kenyon (2001) registró Cu (520 µg/Kg BH), Pb (10 µg/Kg BH) y Zn (7,500 µg/Kg BH) e (Innis et al., 2008) registró Cu (690 ± 680 µg/Kg BH) y Zn (2,290 ± 3,550 µg/Kg BH) (Tabla 4). Estos resultados muestran que, la población de *Lepidochelys kempii* estuvo expuesta a niveles más elevados de metales tanto en Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas (México) como en las zonas de Florida y Cape Cod, Massachusetts en EUA durante esos periodos.

El Se registró concentraciones <LD en el presente trabajo, mientras que, Innis et al. (2008) reportó, para este mismo elemento, 490 ± 60 µg/Kg BH en 29 tortugas lora colectadas en Cape Cod, Massachusetts, EUA, lo cual corrobora lo antes mencionado.

La concentración de Cd en este estudio fue menor al LD; sin embargo, Wang (2005) registró una concentración promedio de 14.9 ± 13.7 µg/Kg BH para *Lepidochelys kempii* y Ross et al. (2017) registró una mediana de concentración de 80± 90 µg/Kg BH para las tortugas marinas a nivel mundial, principalmente de las especies *Caretta caretta* y *Chelonya mydas*.

4.1 Mercurio

El Hg es un elemento químico que, a temperatura ambiente, es un metal líquido de color plateado. Se presenta en la naturaleza bajo diferentes modalidades, ya sea en forma metálica, de vapor o gas, combinado con otros elementos (como cloro, azufre y oxígeno) para formar sales inorgánicas, o bien formando compuestos orgánicos como el metilmercurio o el fenilmercurio, el mercurio inorgánico puede ser transformado en mercurio orgánico. El Hg también forma compuestos organometálicos caracterizados por la unión del Hg a uno o dos átomos de carbono. El Hg presenta poca afinidad con el oxígeno (Cuello, 2017).

En la atmósfera las emisiones de Hg son principalmente en forma elemental, las cuales pueden tener un origen de procesos naturales (volatilización del Hg desde medios acuáticos y marinos, la volatilización a partir de la vegetación, la liberación de materiales geológicos y las emisiones volcánicas) o antropogénicos (procesos industriales y fuentes de combustión con contenido variable de Hg, tanto en forma gaseosa como particulada). En este compartimento ambiental se presenta en su mayor

parte en forma de vapor metálico (Hg^{o}) con una permanencia entre horas y meses; en el suelo por ciertas condiciones, se favorece la formación de elementos inorgánicos (Hg^{+2}), los cuales se adhieren a las partículas y pueden formar complejos con la materia orgánica, lo cual limita su movilidad en el ambiente; en el agua, el mercurio llega como Hg^{+2} y metilmercurio ingresa a través de precipitaciones en concentraciones muy bajas. Estos compuestos pueden ser asimilados por los organismos presentes en el medio, precipitar bajo diversas formas químicas en los sedimentos o reducirse a vapor e incorporarse de nuevo a la atmósfera, estas transformaciones dependen de diversos factores medioambientales como la actividad microbiana, la temperatura, la disponibilidad de carbono orgánico, la presencia de partículas en suspensión, el oxígeno disuelto y el pH. Las condiciones físicas, químicas y biológicas de las aguas propician diferentes especies de Hg predominando los clorocomplejos en los estuarios y océanos (Cuello, 2017).

La toxicidad del mercurio depende de sus formas químicas (elemental, inorgánico y orgánico), en cuanto a las fuentes de exposición, en humanos, la más significativa es la dieta; el tiempo de vida media en sangre es alrededor de 60 días y en su forma elemental produce trastornos neurológicos y de comportamiento. El Hg inorgánico (Hg^{+2}) es el más tóxico capaz de absorberse en el tracto gastrointestinal y a través de la piel, acumulándose en otros órganos; los compuestos orgánicos se absorben por ingestión o inhalación de los vapores de Hg, el tiempo de vida media de estos compuestos es de 70 días. El metilmercurio es capaz de producir apoptosis (muerte celular) en los humanos y bioacumularse a través de las cadenas alimenticias (Cuello, 2017).

El mercurio es un potente neurotóxico causante de efectos en la reproducción, desarrollo y funciones hepáticas, inmunes, endócrinas y renales. Todas las especies de mercurio son tóxicas pero el mercurio, en su forma metilada (metil mercurio), es 100 veces más tóxico que en sus formas inorgánicas. Sus efectos en reptiles han sido poco estudiados a diferencia de otras especies de vida silvestre (Perrault et al., 2017).

Con respecto al Hg, comparando la concentración promedio obtenida en este estudio (Hg 71.60 ± 51.91 µg/kg BH) con los resultados de otros autores, se observó una concentración similar a la registrada por Wang (2005) en el mismo sitio (Hg 68.6±39.5 µg/kg BH), lo cual indica que, la población que llega a anidar a Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas., está expuesta a las mismas fuentes de contaminación, ya sea en las áreas de forrajeo o en el sitio de anidación. Asimismo, comparando la mediana de concentración (Hg 68.75 ± 51.91 µg/kg BH) obtenida en este estudio se observó que es 3.4 veces mayor que la registrada por Ross et al. (2017) para las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* localizadas alrededor del mundo (20 ± 20

µg/Kg BH). Si se considera que el tiempo de vida del Hg en la sangre de humanos es de alrededor de 60 días (Cuello, 2017) y la presencia en esta matriz biológica indica que hubo una exposición reciente a contaminantes entonces la población de *Lepidochelys kempii* está expuesta a Hg en las áreas de forrajeo y en el trayecto a su recorrido hacia la zona de anidación.

Páez-Osuna et al. (2011) determinó mercurio en huevos y sangre en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* que anida en las playas de Oaxaca, México. Las concentraciones más altas fueron encontradas en la yema (0.028 ± 0.010 µg/g BS), mientras que, las menores concentraciones promedio se registraron en albúmina (0.0010 ± 0.0009 µg/g) y sangre (0.0006 ± 0.0005 µg/g BS), y estimó una transferencia materna de Hg a las crías del 2.0±1.1%, medida a través de la tasa de excreción de este elemento vía los huevos que deposita durante la anidación. Estos datos no son comparables con el presente estudio, ya que no se reporta el porcentaje de humedad de las muestras, con lo que se podría estimar estas concentraciones en base húmeda. El mismo autor señala que, existe una correlación entre la concentración de Hg en la sangre y el tamaño, a mayor tamaño menos niveles de Hg en la sangre y que en esta matriz biológica se mide exposición reciente a contaminantes.

Las concentraciones promedio de Hg registradas por Innis et al. (2008) (24 µg/kg) y Kenyon et al. (2001) (20 µg/kg) presentan poca diferencia entre ellos; sin embargo, comparado con la concentración promedio de este estudio (Hg 71.60 ± 51.91 µg/kg BH) se observó que es 3 y 3.6 veces mayor, respectivamente. Estos resultados sugieren que las poblaciones de tortugas marinas que se alimentan en distintas zonas de forrajeo están expuestas a diversas fuentes de contaminación, por lo que registran diferentes cargas de metales en su organismo (Ross et al., 2017).

Los metales tóxicos como el arsénico, cadmio, plomo, mercurio, selenio y talio) son un grupo de contaminantes que se conoce provocan efectos en el desarrollo, la salud en general y el sistema inmunológico en los reptiles, incluso en concentraciones bajas. Los reptiles, incluidas las tortugas marinas, son susceptibles a la acumulación de elementos tóxicos debido a su larga vida, baja tasa metabólica y conversión altamente eficiente de presas en biomasa (Perrault et al., 2017).

Las concentraciones de elementos inorgánicos en sangre publicadas a la fecha varían dependiendo de las especies, localización, recursos, lugar o población objetivo, lo que confirma lo observado por Cortés-Gómez et al. (2017) en la revisión sobre concentraciones de metales en todas las especies de tortugas marinas a nivel mundial, quienes definen como ”elemento no esencial" aquellos con un alto riesgo de toxicidad en dosis bajas (Pb, Cd y Hg) y que no son necesarios para los procesos metabólicos de los organismos y como "elemento esencial" aquellos elementos traza

que son necesarios para la vida pero potencialmente tóxicos en altas concentraciones (Al, As, Cr , Cu, Fe, Mn, Ni, Se y Zn). La exposición a elementos esenciales y no esenciales puede ser elevada para las tortugas marinas verdes (*Chelonia mydas*) que se alimentan cerca de la costa, lo cual puede afectar su salud (Villa et al., 2017).

El Golfo de México es un ecosistema marino que ha sido perturbado a lo largo del tiempo, principalmente por diversas actividades antropogénicas que se desarrollan en sus litorales y mar profundo como son: la explotación petrolera, los derrames de crudo y petróleo no intencionales, los derrames de combustibles de embarcaciones, las descargas industriales y la deposición atmosférica. Éstas liberan al ambiente una gran cantidad de contaminantes que se acumulan en el océano lo que representa un riesgo real o potencial para las especies marinas por exposición a sustancias tóxicas durante sus diferentes etapas de vida.

En las áreas cercanas a las costas, se pueden elevar las concentraciones de un amplio rango de contaminantes, incluyendo metales y metaloides, y otros compuestos químicos debido a que éstas son objeto de impactos naturales y antropogénicos, tales como: inundaciones, escorrentías agrícolas e industriales, dragados y urbanización. En las áreas contaminadas, están presentes elementos como los metales, los cuales están enriquecidos en las aguas que las rodean, así como en las comunidades de pastos marinos y algas que ahí se desarrollan (Villa et al., 2017).

Lo anterior tiene relevancia considerando que, la tortuga lora *Lepidochelys kempii* es una especie migratoria, que habita el Golfo de México y Océano Atlántico durante las distintas etapas de su ciclo de vida y las principales áreas de forrajeo que utiliza, después del periodo de anidación, son: la parte norte cercana a Luisiana y Florida (< 68 m de profundidad; promedio 33.2 ± 25.3 km de la costa) y Playa de Rancho Nuevo, México Shaver et al. (2013). Las hembras de Playa de Rancho Nuevo suelen también ocupar las costas de la Península de Yucatán (NMFS-USFWS, 2015). En estas áreas de forrajeo, donde las tortugas marinas pasan gran parte de su tiempo, predominan los pastos marinos y poblaciones algales, y una gran variedad de especies faunísticas asociadas a estos ecosistemas.

Las diferentes cargas ambientales de metales en las áreas de forrajeo tienen un fuerte impacto sobre los niveles de bioacumulación de contaminantes en las tortugas marinas. Las poblaciones de tortugas marinas que se alimentan en diferentes zonas pueden entonces tener diferentes fuentes de contaminación, así como diferentes cargas de metales en su organismo (Ross et al., 2017).

Suzuki et al. (2012) encontró diferencias en las concentraciones de metales presentes en tres especies de tortugas marinas (*Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas* y *Caretta caretta*) registrando altas concentraciones de As y Pb, que atribuye al

tipo de alimentación ; lo que coincide con lo reportado por Ehsanpour et al. (2014), quien señala que la acumulación de metales en tortugas marinas (*Eretmochelys imbricata*) se debe principalmente a la entrada de contaminantes orgánicos e inorgánicos a través del alimento, sedimentos y agua, y reporta bajas concentraciones de metales en sangre, lo que supone que esta especie se alimenta principalmente de organismos de los niveles tróficos bajos o que, posiblemente las áreas de forrajeo o el hábitat de estas especies presenten un bajo grado de contaminación.

En México, Ley-Quiñónez et al. (2011), determinó concentraciones de metales (Zn>Se>Ni>Cu>Mn>Pb y Hg) en sangre de la tortuga marina *Caretta caretta* que anida en Puerto López Mateos, Baja California Sur, México, identificando zinc (41.89 $\mu g/g^{-1}$) y selenio (10.92 $\mu g/g^{-1}$) como los más relevantes. El mismo autor en el 2013 analizó las concentraciones de Zn, Cd, Ni, Cu, Mn y Se en sangre de tortuga negra (*Chelonia agasizi*) capturada en Canal del Infiernillo, Punta Chueca identificando la siguiente secuencia de concentraciones Zn>Se>Cu>Mn>Ni>Cd, de los cuales el Zn (63.58 $\mu g/g^{-1}$) y Se (7.66 $\mu g/g^{-1}$) fueron los más relevantes y el Cd (0.99 $\mu g/g^{-1}$) presentó los niveles más bajos. En su conclusión, atribuye estos resultados a la exposición las tortugas negras a contaminantes en las áreas de alimentación ubicadas en el Golfo de California.

La presencia de contaminantes, principalmente en las áreas de forrajeo y alimentación de las tortugas marinas, representan un riesgo potencial para la conservación de las especies que habitan en estos ambientes costeros contaminados (Komoroske et al., 2011). La exposición elevada a elementos traza puede estar afectando adversamente la salud de las tortugas que habitan zonas cercanas a las costas considerando que la concentración y la biodisponibilidad de estos elementos en los sedimentos costeros y plantas acuáticas puede variar en una escala regional dependiendo de la fuente local y las condiciones ambientales (Villa et al., 2017). En el presente trabajo se enfatiza la necesidad de realizar más estudios que documenten estos efectos a la salud de la población de *Lepidochelys kempii*, que contribuyan a mitigar su exposición a contaminantes, primordialmente en las áreas de forrajeo, alimentación y anidación considerando su importancia como especie endémica del Golfo de México. Cabe resaltar que, la afectación a la salud de las tortugas marinas puede tener importantes implicaciones para la conservación y el manejo de la especie (Perrault et al., 2017).

5. Conclusiones

Las concentraciones de Al (18,070.00 ± 30,951.31 µg/kg BH), As (3,190.00 ± 1,558.24 µg/kg BH) y Ba (2,195.00 ± 4,051.45 µg/kg BH) son los primeros valores de

referencia registrados para la tortuga lora *Lepidochelys kempii* que anida en el Santuario Paya de Racho Nuevo, Tamaulipas.

La mediana de concentración de Hg (68.75 ± 52 µg/kg BH) registrada en este estudio es similar a la reportada hace más de una década.

La población de *Lepidochelys kempii* muestra una exposición reciente a metales, la cual puede tener su origen en las áreas de forrajeo y en el trayecto hacia la zona de anidación en Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas.

Recomendaciones

Continuar con el monitoreo de niveles de metales en la sangre de la población de esta especie, utilizando un método no destructivo, para evaluar la exposición a contaminantes con fines de protección y conservación de esta especie en riesgo.

Incorporar a las investigaciones parámetros que evalúen los efectos en la salud de la población de la tortuga lora *Lepidochelys kempii*, así como la cuantificación de los niveles de metales en el alimento y el agua de las zonas de alimentación y anidación para identificar el posible origen de éstos y así contribuir a mitigar su exposición a los contaminantes, principalmente en las áreas de anidación y forrajeo en México.

Agradecimientos

A la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) por las facilidades y apoyo para la realización de los muestreos en las instalaciones del Santuario Playa de Rancho Nuevo, Tamaulipas, en especial al M. en C. Héctor Hugo Acosta Sánchez por su apoyo incondicional en los trabajos de campo.

A la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental perteneciente a la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por el otorgamiento de los permisos de colecta científica para el desarrollo de la investigación.

Al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático por el apoyo para el análisis de metales en los laboratorios ambientales.

6. Referencias

Abdallah, M.A.M., Abd-Allah, M.A.M. (2011). Bioaccumulation of toxic metals in Loggerhead turtles from Mediterranean Sea coast, Egypt. In: Ozhan, E. (Ed.), 10th International Conference on the Mediterranean Coastal, pp. 570e579. *Environment. MEDCOAST* 11, Rhodes, Greece.

Ancora, S., Casini, S., Bianchi, N., Fanello, E., Fossi, M.C., Leonzio, C. (2012). Non lethal samples for trace elements and porphyrins investigation, Mediterranean *C. caretta*. In: Workshop of Biology and Ecotoxicology of Large Marine Vertebrates: Potential Sentinels of Good Environmental Status of Marine Environment, Implication on European Marine Strategy Framework Directive, p. 38. Siena, Italy

Al-Rawahy, Salim H., Abdulaziz Y. Alkindy, Abdulkadir Elshafie, Mahmoud Ibrahim, Saif N. Al Bahry, Sultan S. Al Siyabi, Mohamed H. Mansour and Ali A. Al Kiyumi. (2007). Accumulation of Metals in the Egg Yolk and Liver of Hatchling of Green Turtles Chelonia mydas at Ras Al Hadd, Sultanate of Oman. *Journal of Biological Sciences*, *7*(6), 925–930. Retrieved from http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/jbs/2007/925-930.pdf

Aureoles, V. (2007). Concentración de metales pesados en la tortuga negra, Chelonia mydas en Baja California Sur. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste, S.C. Baja California, México. 109 pp. [En línea]. Disponible en: http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/466/aureoles_v.pdf?sequence=3

Bucchia, M., Camacho, M., Santos, M. R. D., Boada, L. D., Roncada, P., Mateo, R. Ortiz-Santaliestra, M., Rodríguez-Estival, J., Zumbado, M., Orós, J., Hernández-Hernández, E., García-Álvarez, N. & Luzardo, O. P. (2015). Plasma levels of pollutants are much higher in loggerhead turtle populations from the Adriatic Sea than in those from open waters (Eastern Atlantic Ocean). *Science of the Total Environment*, *523*, 161–169. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.047

Camacho, M., Orós, J., Boada, L. D., Zaccaroni, A., Silvi, M., Formigaro, C., López, P., Zumbado, M. & Luzardo, O. P. (2013). Potential adverse effects of inorganic pollutants on clinical parameters of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Results from a nesting colony from Cape Verde, West Africa. *Marine Environmental Research*, *92*, 15–22.

https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.08.002

Camacho, María, Boada, L. D., Orós, J., López, P., Zumbado, M., Almeida-González, M., & Luzardo, O. P. (2014). Monitoring organic and inorganic pollutants in juvenile live sea turtles: Results from a study of *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata* in Cape Verde. *Science of the Total Environment*, *481*(1), 303–310. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.051

CONANP (2017). México, hogar de seis especies de tortugas marinas del planeta. Blog Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. [En línea] Disponible en: https://www.gob.mx/conanp/articulos/mexico-hogar-de-seis-especies-de-tortugas-marinas-del-planeta?idiom=es

CONANP (2018). Región Planicie Costera y Golfo de México [En línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/conanp/documentos/region-planicie-costera-y-golfo-de-mexico

CONANP (2019). Ficha SIMEC Playa de Rancho Nuevo [En línea]. Disponible en: https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=143&reg=5

Cortés-Gómez, A. A., Fuentes-Mascorro, G., & Romero, D. (2014). Metals and metalloids in whole blood and tissues of Olive Ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) from La Escobilla Beach (Oaxaca, Mexico). *Marine Pollution Bulletin*, *89*(1–2), 367–375. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.09.035

Cortés-Gómez, A. A., Romero, D., & Girondot, M. (2017). The current situation of inorganic elements in marine turtles: A general review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, *229*, 567–585. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.077

Cuello, S. (2017). Biocumulación, toxicidad e interacción de metilmercurio y especies de selenio. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Analítica. Madrid, España. 275 pp. [En línea] Disponible en: https://eprints.ucm.es/42588/1/T38771.pdf

da Silva, C. C., Varela, A. S., Barcarolli, I. F., & Bianchini, A. (2014). Concentrations and distributions of metals in tissues of stranded green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the southern Atlantic coast of Brazil. *Science of the Total Environment*, *466–467*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.094

da Silva, C.C., Klein, R.D., Barcarolli, I.F., Bianchini, A. (2016). Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic*

Toxicology, *170*, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.007

Day, R.D. (2003). Mercury in Loggerhead Sea Turtles, *Caretta caretta*: Developing Monitoring Strategies, Investigating Factors Affecting Contamination, and Assessing Health Impacts. College of Charleston, South Carolina.

Deem, S.L., Dierenfeld, E.S., Sounguet, G.P., Alleman, A.R., Cray, C., Poppenga, R.H., Norton, T.M., Karesh, W.B. (2006). Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon. *J. Zoo Wildl. Med*. 37, 464e471. https://doi.org/10.1638/05-102.1

Deem, S.L., Norton, T.M., Mitchell, M., Segars, A., Alleman, A.R., Cray, C., Poppenga, R.H., Dodd, M., Karesh, W.B. (2009). Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *J. Wildl. Dis*. 45, 41e56. https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.41

D.O.F. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de diciembre del 2010.

Ehsanpour, M., Afkhami, M., Khoshnood, R., & Reich, K. J. (2014). Determination and maternal transfer of heavy metals (Cd, Cu, Zn, Pb and Hg) in the Hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*) from a nesting colony of Qeshm Island, Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *92*(6), 667–673. https://doi.org/10.1007/s00128-014-1244-3

Finlayson, K. A., Leusch, F. D. L., & van de Merwe, J. P. (2016). The current state and future directions of marine turtle toxicology research. *Environment International*, *94*, 113–123. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.013

Guirlet, E., Das, K., & Girondot, M. (2008). Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology*, *88*(4), 267–276. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.004

Harris, H.S., Benson, S.R., Gilardi, K.V., Poppenga, R.H., Work, T.M., Dutton, P.H., Mazet, J.A.K. (2011). Comparative health assessment of western pacific leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) foraging off the coast of California, 2005e2007. J. Wildl. Dis. 4, 321e337. https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.2.321

Ikonomopoulou, M. P., Olszowy, H., Limpus, C., Francis, R., & Whittier, J.

(2011). Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. *Marine Environmental Research*, *71*(1), 10–16. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.09.003

Innis, C., Tlusty, M., Perkins, C., Holladay, S., Merigo, C., & Weber, E. S. (2008). Trace Metal and Organochlorine Pesticide Concentrations in Cold-Stunned Juvenile Kemp's Ridley Turtles (*Lepidochelys kempii*) from Cape Cod, Massachusetts. *Chelonian Conservation and Biology*, *7*(2), 230–239. https://doi.org/10.2744/ccb-0707.1

Jerez, S., Motas, M., Cánovas, R. Á., Talavera, J., Almela, R. M., & del Río, A. B. (2010). Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta)* from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere*, *78*(3), 256–264. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.062

Kenyon, L. O., Landry Jr, A. M., & Gill, G. A. (2001). Trace Metal Concentrations in Blood of the Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*). *Chelonian Conservation and Biology,* 4(1), 128-135.

Komoroske, L. M., Lewison, R. L., Seminoff, J. A., Deheyn, D. D., & Dutton, P. H. (2011). Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere*, *84*(5), 544–552. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.023

Labrada-Martagón, V., Tenorio Rodríguez, P. A., Méndez-Rodríguez, L. C., & Zenteno-Savín, T. (2011). Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *154*(2), 65–75. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.006

Ley-Quiñónez, C. P., Zavala-Norzagaray, A. A., Réndon-Maldonado, J. G., Espinosa-Carreón, T. L., Canizales-Román, A., Escobedo-Urías, D. C., Leal-Acosta, M.L., Hart, C.E. & Aguirre, A. A. (2013). Selected heavy metals and selenium in the blood of black sea turtle (*Chelonia mydas agasiizzi*) from Sonora, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *91*(6), 645–651. https://doi.org/10.1007/s00128-013-1114-4

Ley-Quiñónez, C., Zavala-Norzagaray, A. A., Espinosa-Carreón, T. L., Peckham, H., Marquez-Herrera, C., Campos-Villegas, L., & Aguirre, A. A. (2011). Baseline heavy metals and metalloid values in blood of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, *62*(9), 1979–

1983. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.022

Moreno, M.D. (2003). Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw-Hill. 370 pp. 49.

McFadden, K. W., Gómez, A., Sterling, E. J., & Naro-Maciel, E. (2014). Potential impacts of historical disturbance on green turtle health in the unique & protected marine ecosystem of Palmyra Atoll (Central Pacific). *Marine Pollution Bulletin*, *89*(1–2), 160–167. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.012

NMFS-USFWS National Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service (2015). Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*) 5-year review: summary and evaluation. 62 pp. [En línea] Disponible en: https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/17048

Owens, D. W., & Ruiz, G. J. (1980). New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. Herpetologica: 17-20.

Páez-Osuna, F., Calderón-Campuzano, M. F., Soto-Jiménez, M. F., & Ruelas-Inzunza, J. R. (2010a). Lead in blood and eggs of the sea turtle, Lepidochelys olivacea, from the Eastern Pacific: Concentration, isotopic composition and maternal transfer. *Marine Pollution Bulletin*, *60*(3), 433–439. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.10.004

Páez-Osuna, Federico, Calderón-Campuzano, M. F., Soto-Jiménez, M. F., & Ruelas-Inzunza, J. R. (2010b). Trace Metals (Cd, Cu, Ni, and Zn) in Blood and Eggs of the Sea Turtle Lepidochelys olivacea from a Nesting Colony of Oaxaca, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *59*(4), 632–641. https://doi.org/10.1007/s00244-010-9516-3

Páez-Osuna, F., Calderón-Campuzano, M. F., Soto-Jiménez, M. F., & Ruelas-Inzunza, J. (2011). Mercury in blood and eggs of the sea turtle Lepidochelys olivacea from a nesting colony in Oaxaca, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, *62*(6), 1320–1323. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.004

Ponce-Vélez, G., Botello, A.V., Díaz-González, G. (2006). Organic and inorganic pollutants in marine sediments from northern and southern continental shelf of the Gulf of Mexico. Int. J. Environ. Pollut. 26 (1-3): 295-311.

Perrault, J. R., Miller, D. L., Garner, J., & Wyneken, J. (2013). Mercury and selenium concentrations in leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*): Population comparisons, implications for reproductive success, hazard quotients and directions for future research. *Science of the Total Environment*, *463–464*, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.067

Perrault, J. R., Stacy, N. I., Lehner, A. F., Poor, S. K., Buchweitz, J. P., & Walsh, C. J. (2017). Toxic elements and associations with hematology, plasma biochemistry, and protein electrophoresis in nesting loggerhead sea turtles (Caretta caretta) from Casey Key, Florida. *Environmental Pollution*, *231*, 1398–1411. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.001

Perrault, J., Wyneken, J., Thompson, L. J., Johnson, C., & Miller, D. L. (2011). Why are hatching and emergence success low? Mercury and selenium concentrations in nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) and their young in Florida. *Marine Pollution Bulletin*, *62*(8), 1671–1682. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.009

Register, A. L. (2011). *Effects of Heavy Metal Pollution on the Loggerhead Sea Turtle*. (School of Science and Technology. Loma Linda University). Retrieved from https://bidi.uam.mx:8889/docview/1268756477?pq-origsite=summon

Ross, D. A. N., Guzmán, H. M., Potvin, C., & van Hinsberg, V. J. (2017). A review of toxic metal contamination in marine turtle tissues and its implications for human health. *Regional Studies in Marine Science*, *15*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.06.003

Sakai, H., Saeki, K., Ichihashi, H., Suganuma, H., Tanabe, S., & Tatsukawa, R. (2000). Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of loggerhead turtle (Caretta caretta) and green turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, *40*(8), 701–709. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00008-4

Setim Prioste, F.E., de Oliveira Souza, V.C., Ramos Queiroz, M. (2015). Chemical element concentrations in the blood of green turtles (*Chelonia Mydas*) captured at fernando de noronha marine national park, Brazil. J. Environ. Anal. Toxicol. 05. https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000325

Shaver, D. J., Hart, K. M., Fujisaki, I., Rubio, C., Sartain, A. R., Peña, J., Burchfield, P.M., Garnez, D.G. & Ortiz, J. (2013). Foraging area fidelity for Kemp's ridleys in the Gulf of Mexico. *Ecology and Evolution*, *3*(7), 2002–2012. https://doi.org/10.1002/ece3.594

Storelli, M. M., & Marcotrigiano, G. O. (2003). Heavy metal residues in tissues of marine turtles. *Marine Pollution Bulletin*, *46*(4), 397–400. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00230-8

Suzuki, K., Noda, J., Yanagisawa, M., Kawazu, I., Sera, K., Fukui, D., Asakawa, M. & Yokota, H. (2012). Particle-induced X-ray emission analysis of

elements in plasma from wild and captive sea turtles (*Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*, and *Caretta caretta*) in Okinawa, Japan. *Biological Trace Element Research*, *148*(3), 302–308. https://doi.org/10.1007/s12011-012-9375-z

Swarthout, R. F., Keller, J. M., Peden-Adams, M., Landry, A. M., Fair, P. A., & Kucklick, J. R. (2010). Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (Chelonia mydas) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere*, *78*(6), 731–741. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.059

Trocini, S. (2013). Health assessment and hatching success of two Western Australian loggerhead turtle (*Caretta caretta*) populations (Murdoch University). Retrieved from http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/18114

van de Merwe, J. P., Hodge, M., Olszowy, H. A., Whittier, J. M., & Lee, S. Y. (2010). Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, *60*(4), 579–588. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.11.006

Villa, C. A., Flint, M., Bell, I., Hof, C., Limpus, C. J., & Gaus, C. (2017). Trace element reference intervals in the blood of healthy green sea turtles to evaluate exposure of coastal populations. *Environmental Pollution*, *220*, 1465–1476. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.085

Wang, H. (2005). Trace metal uptake and accumulation pathways in Kemp's ridley sea turtles *(Lepidochelis kempii*). Texas A&M University. Doctoral Thesis. 275 pp.

Yipel, M., Tekeli, İ. O., İşler, C. T., & Altuğ, M. E. (2017). Heavy metal distribution in blood, liver and kidneys of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Green (*Chelonia mydas*) sea turtles from the Northeast Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, *125*(1–2), 487–491. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.011

Zavala-Norzagaray, A. A., Ley-Quiñónez, C. P., Espinosa-Carreón, T. L., Canizalez-Román, A., Hart, C. E., & Aguirre, A. A. (2014). Trace elements in blood of sea turtles *Lepidochelys olivacea* in the gulf of California, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *93*(5), 536–541. https://doi.org/10.1007/s00128-014-1320-8

ISBN: 978-607-99510-0-9



Contribuciones Selectas en Ecotoxicología y Química Ambiental se terminó de editar en agosto de 2021, por la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental, A.C. (AMEQA). La coordinación editorial estuvo a cargo de Leobardo Gómez Olivan. Diseño de portada: Hariz Islas Flores/ Leopoldo I. Flores.