

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES NO DESTRUCTIVOS EN
SAPO GIGANTE (*Rhinella marina*) DE LA CUENCA BAJA DEL RÍO
COATZACOALCOS, VERACRUZ, MÉXICO**

PRESENTA:

BQ. OMAR CRUZ SANTIAGO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CÉSAR ARTURO ILIZALITURRI HERNÁNDEZ

ASESORES:

DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

DR. ISRAEL RAZO SOTO

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

NOVIEMBRE 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES NO DESTRUCTIVOS EN
SAPO GIGANTE (*Rhinella marina*) DE LA CUENCA BAJA DEL RÍO
COATZACOALCOS, VERACRUZ, MÉXICO**

PRESENTA:

BQ. OMAR CRUZ SANTIAGO

COMITÉ TUTELAR

DIRECTOR: Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández

ASESOR: Dr. José de Jesús Mejía Saavedra

ASESOR: Dr. Israel Razo Soto



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA
PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES NO DESTRUCTIVOS EN
SAPO GIGANTE (*Rhinella marina*) DE LA CUENCA BAJA DEL RÍO
COATZACOALCOS, VERACRUZ, MÉXICO**

PRESENTA:

BQ. OMAR CRUZ SANTIAGO

SINODALES

Presidente: Dr. César Arturo Ilizaliturri Hernández

Secretario: Dr. Israel Razo Soto

Vocal: Dra. Josefina Donaji González Mille

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**LABORATORIOS DE BIOMARCADORES Y ECOTOXICOLOGÍA
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA EN AMBIENTE Y
SALUD (CIAAS) DE LA FACULTAD DE MEDICINA-
COORDINACIÓN PARA LA INNOVACIÓN DE LA CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (CIACyT), UASLP**

CON FINANCIAMIENTO DE:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ A TRAVÉS DEL FONDO
DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (C12-FAI-03-67.67)
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA Y CONSEJO NACIONAL DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA (SEP-CONACYT-CIENCIA BÁSICA-178778)**

**AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-
TESIS**

Becario No. 333517

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO
ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD
(PNPC)**

DEDICATORIA

A mis padres por sus enseñanzas, consejos, pero sobre todo por su apoyo a lo largo de esta pequeña travesía. Gracias, los quiero.

A mi hermana, Vanesa, por su apoyo incondicional, por las aventuras que hemos pasado juntos, y por siempre ponerme como ejemplo para seguir adelante.

A la familia Casas Cervantes, de nueva cuenta, por todo su apoyo incondicional a lo largo de mi maestría.

A mi novia, Martha Patricia Casas, por no dejarme caer, por sus consejos, por estar siempre a mi lado. Gracias, te amo.

A todas las personas que contribuyeron en la realización de este logro, y de muchos otros más.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi director de tesis primeramente por haberme brindado su confianza a lo largo de la maestría, por ser un gran profesionista y ser una persona ejemplo para seguir adelante, pero sobre todo, por creer en mí desde el principio. Gracias por todo su apoyo y sus enseñanzas Dr. César A. Ilizaliturri, sin usted no hubiera sido posible este trabajo. De corazón, MUCHAS GRACIAS.

A los doctores Jesús Mejía Saavedra e Israel Razo, por sus consejos y asesoramiento en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Donaji González y el Dr. Guillermo Espinosa, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, sus consejos, sus enseñanzas; pero sobre todo, por confiar y creer en mí a lo largo de la maestría.

A la M. en C. María del Carmen Cuevas y sus alumnos por el apoyo brindado en el muestreo en Coatzacoalcos.

Al Dr. Iván Pérez-Maldonado y a la M. en C. Karen Palomo por su apoyo en el análisis con citometría de flujo.

A mis amigos del CIAAS-CIACyT: Carol, Romy, Ángel, Miguel, Octavio, Andrés y Eleno, por su amistad y apoyo.

A mis amigos Luis Jesús, Cinthia, Cynthia, Anallely, Claudia y Gil por su amistad y apoyo incondicional.

A los profesores y personal del PMPCA por sus enseñanzas y apoyo que contribuyeron a mi formación académica.

A los demás doctores (as), profesores (as) y compañeros del CIAAS-CIACyT por todos los momentos buenos que me hicieron pasar a lo largo de estos dos años.

Al Programa Multidisciplinario de Posgrados en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A la Coordinación para la Innovación de la Ciencia y la Tecnología (CIACyT), a la Facultad de Medicina y a la Universidad Veracruzana Campus Coatzacoalcos por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A todos los demás que contribuyeron a la realización de este trabajo. Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivo general.....	4
1.3 Objetivos específicos.....	5
ANTECEDENTES GENERALES	6
2.1 Sitio de Estudio.....	6
2.1.1 Ubicación	6
2.1.2 Clima	7
2.1.3 Hidrología.....	8
2.1.4 Tipos de suelo.....	8
2.1.5 Vegetación	8
2.1.6 Fauna.....	9
2.1.7 Principales actividades productivas del sitio de estudio.....	9
2.1.7.1 Actividades primarias.....	9
2.1.7.2 Actividades secundarias.....	10
2.1.7.3 Actividades terciarias.....	10
2.1.8 Problemática del sitio de estudio.....	12
2.2 Características importantes de los contaminantes registrados en el sitio de estudio	15
2.2.1 Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)	15
2.2.1.1 Bifenilos Policlorados (BPCs).....	16

2.2.1.2 Dioxinas.....	17
2.2.1.3 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)	18
2.2.2 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs).....	19
2.2.3 Metales pesados y metaloides	20
2.3 El biomonitorio en sitios contaminados.....	21
2.3.1 Los anfibios	23
2.3.1.1 Los anuros	24
2.3.1.1.1 El sapo gigante o de caña (<i>R. marina</i>).....	25
2.4 Uso de biomarcadores para evaluar la exposición y efectos de los contaminantes	26
2.4.1 Biomarcadores no destructivos	29
2.4.2 Respuestas biológicas consideradas como biomarcadores.....	30
2.4.2.1 Enzimas de Biotransformación de Fase II	30
2.4.2.1.1 Glutación S-transferasa (GST).....	31
2.4.2.2 Estrés oxidativo	33
2.4.2.2.1 Peroxidación lipídica (malondialdehído).....	33
2.4.2.3 Ácido delta aminolevulínico deshidratasa (δ -ALAD).....	34
2.4.2.4 Parámetros hematológicos	36
2.4.2.5 Enzimas estererasas	37
2.4.2.6 Factor de condición	38
2.4.2.7 Apoptosis.....	39
2.4.2.8 Perturbación endocrina.....	41
METODOLOGÍA.....	44
3.1 Selección de biomarcadores no destructivos (sangre completa o plasma) .	44
3.2 Identificación del sitio y estaciones de muestreo	44

3.2.1 Descripción de las estaciones de muestreo	45
3.3 Recolección de sapo gigante y toma de muestras	46
3.4 Determinación de biomarcadores	47
3.4.1 Glutación S-Transferasa (GST)	47
3.4.2 Peroxidación lipídica medida como malondialdehído (MDA)	48
3.4.3 Butirilcolinesterasa (BChE)	49
3.4.4 Actividad δ -ALAD	50
3.4.5 Determinación de Hb y cálculo de CHCM	51
3.4.6 Cálculo del factor de condición (FC)	52
3.4.7 Porcentaje de apoptosis por citometría de flujo	52
3.4.8 Cuantificación de la proteína VTG como fósforo proteico lábil álcali (ALP)	53
3.5 Análisis estadístico	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
4.1 Actividad Glutación S-transferasa (GST).....	55
4.2 Peroxidación lipídica.....	57
4.3 Ácido 5-aminolevulínico dehidratasa (δ -ALAD)	59
4.4 Parámetros hematológicos: CHCM.....	61
4.5 Butirilcolinesterasa (BChE)	63
4.6 Factor de condición (FC)	66
4.7 Apoptosis	68
4.8 Vitelogenina	70
4.9 Asociaciones entre biomarcadores.....	72
4.10 Sobre los biomarcadores.....	77
CONCLUSIONES.....	82

LIMITACIONES	85
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	110
ANEXO A. Preparación de soluciones para la determinación de cada biomarcador.....	111
A.1 Preparación de soluciones para la determinación de GST en microplaca de 96 pocillos	111
A.2 Preparación de soluciones para la determinación de MDA con el kit NWLSS	112
A.3 Preparación de soluciones para la determinación de BChE en microplaca de 96 pocillos	113
A.4 Preparación de soluciones para la determinación de ALAD	114
A.5 Preparación de soluciones para la determinación de VTG	115
A.6 Preparación de soluciones para determinación de ciclo celular en paquete eritrocitario de sapos gigantes	116
ANEXO B. Implementación de biomarcadores (BChE y GST) en el laboratorio	117
B.1 Implementación de BChE	117
B.2 Implementación de GST	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE LOS ANEXOS	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, Veracruz, México .	7
Figura 2. Sapo gigante o de caña (<i>R. marina</i>).....	26
Figura 3. Relación entre la condición fisiológica de un organismo y su estado salud (gráfica superior), y su vínculo con la intensidad de respuesta de biomarcadores y la concentración del contaminante (gráfica inferior) al que está expuesto. Una de las ventajas de una batería de biomarcadores.....	28
Figura 4. Proceso de biotransformación de xenobióticos por enzimas.....	31
Figura 5. Ejemplo de una de las reacciones de conjugación por parte de GST hacia un epóxido.	32
Figura 6. Explicación del proceso peroxidación lipídica inducida por xenobióticos	34
Figura 7. Sitios donde el Pb puede afectar la biosíntesis del grupo hemo, incluyendo la inhibición de δ -ALAD.	35
Figura 8. Ejemplo de inducción de apoptosis por p,p'-DDE (metabolito del DDT).41	
Figura 9. Inducción de la producción y secreción de proteína VTG mediante compuesto estrogénicos.....	43
Figura 10. Sitios de muestreo de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos.	45
Figura 11. Actividad GST en plasma de sapo gigante.....	55
Figura 12. Presencia de MDA en plasma de <i>R. marina</i>	57
Figura 13. Actividad δ -ALAD en sangre completa de sapo gigante.....	60
Figura 14. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) en sapo gigante	62
Figura 15. Actividad BChE en plasma de sapo gigante.....	64
Figura 16. Factor de condición (FC) presentado en sapos gigantes.	66
Figura 17. Porcentaje de apoptosis presentado en eritrocitos de sapos gigantes..	68
Figura 18. Concentración de VTG plasmática en sapos gigantes.....	71
Figura 19. Correlación entre la actividad BChE y apoptosis de sapo gigante (<i>R. marina</i>) de la zona alta y la zona baja de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos. 73	

Figura 20. Correlación entre la actividad de GST y porcentaje de apoptosis en sapos gigantes de la zona alta de la cuenca del Río Coatzacoalcos.	75
Figura 21. Correlación entre la actividad GST y MDA, GST y δ -ALAD, en sapos gigantes de la zona baja y de la zona alta	76
Figura 22. Elección de método para determinación de BChE en plasma de <i>R. marina</i>	117
Figura 23. Primer diseño experimental para la implementación de BChE en plasma de sapo gigante.	118
Figura 24. Segundo diseño experimental para la implementación de BChE en plasma de sapo gigante	119
Figura 25. Actividad BChE en plasma de sangre completa expuesta a malatión comercial.	119
Figura 26. Elección de técnica ideal para determinación de actividad de GST en plasma de sapo gigante.	120
Figura 27. Implementación de BChE y GST en sangre de sapo gigante	121
Figura 28. Actividad GST en plasma de sangre completa expuesta a malatión comercial	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Industrias localizadas y sus emisiones hasta 2013 en municipios de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos (SEMARNAT, RETC, 2013)	10
Tabla 2. Contaminantes registrados en el Río Coatzacoalcos.	13
Tabla 3. Efectos de los contaminantes del sitio en fauna acuática y terrestre	14

RESUMEN

En este estudio se determinó la actividad de biomarcadores no destructivos (glutación s-transferasa –GST-, malondialdehído –MDA-, ácido aminolevulínico deshidratasa - δ -ALAD-, parámetros hematológicos –HCM-, butirilcolinesterasa –BChE-, apoptosis, factor de condición –FC- y vitelogenina –VTG-) en sapos gigantes (*R. marina*) de dos zonas (alta y baja) de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos para compararlos con organismos de referencia (sapos mantenidos en laboratorio). De cada estación de muestreo de las zonas se colectaron de 4 a 10 sapos gigantes, a los cuales se les tomó peso, talla y muestra sanguínea (plasma, paquete eritrocitario). Posteriormente, en estas muestras biológicas se determinaron los biomarcadores no destructivos la mayoría por métodos de espectrofotometría UV-Visible y con lector de microplacas, solamente apoptosis se determinó por citometría de flujo en el paquete eritrocitario. Los sapos gigantes residentes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos mostraron un aumento de actividad GST y BChE 1.4 veces más comparado con los organismos de laboratorio. En cuanto a la peroxidación lipídica reportada como MDA se encontró una menor presencia de este compuesto (2.3 veces menor) en los organismos de la zona alta comparado con los de referencia y de la zona baja. Se encontró un porcentaje de inhibición de δ -ALAD de un 60 a 65% en los anfibios de Coatzacoalcos. Se obtuvo también una disminución de 1.4 veces en el FC de los sapos residentes de la zona baja comparado con el de los de la zona alta. La apoptosis en eritrocitos se presentó 10.7 veces y 33.3 veces más en los organismos residentes de la zona alta y baja, respectivamente, en comparación a los de laboratorio. En cuanto a VTG, se encontraron concentraciones similares de esta proteína entre sapos hembras (referencia) y sapos machos (Coatzacoalcos). Finalmente, las correlaciones entre biomarcadores confirmaron que la utilización de una batería estos es útil para el caso de monitoreo o evaluaciones de riesgo ecológico, debido a que algunos biomarcadores pueden estar relacionados entre sí, y, a su vez, pueden estar cumpliendo otras funciones para regular o equilibrar la homeostasis de los organismos.

ABSTRACT

In this study the activity of nondestructive biomarkers (glutathione S-transferase -GST-, malondialdehyde -MDA-, aminolevulinic acid dehydratase - δ -ALAD-, hematological parameters -HCM-, butyrylcholinesterase -BChE-, apoptosis, condition factor -FC- and vitellogenin -VTG-) was determined in giant toads (*R. marina*) in two areas of the lower basin of the Coatzacoalcos River to compare with reference organisms (toads maintained in the laboratory). Of each sampling station areas were collected from 4 to 10 giant toads, to which they were taken weight, height and blood samples (plasma, erythrocyte package). Subsequently, in these biological samples most of nondestructive biomarkers were determined by methods of UV-Visible spectrophotometry and microplate reader, only apoptosis was determined by flow cytometry in the erythrocyte package. Residents giant toads of lower Coatzacoalcos River basin showed an increase of GST activity and BChE activity of 1.4 times compared with laboratory organisms. As for lipid peroxidation MDA reported as a smaller presence of this compound (2.3 fold) in organismos of the upper area compared to baseline. A percentage of 60 to 65% inhibition of δ -ALAD found in Coatzacoalcos amphibians. A decrease of 1.4 times in the FC of toads residents of the lower zone. Apoptosis in erythrocytes showed 10.7 times and 33.3 times more in toads of Coatzacoalcos river basin (upper and lower zone respectively), compared to the laboratory. As for VTG, similar concentrations of this protein among female toads (reference) and male toads (Coatzacoalcos) found. Finally, correlations between biomarkers confirmed that the use of a battery of these is good in monitoring or ecological risk assessments, because some biomarkers may be interrelated, and, in turn, may be performing other functions like a regulate or balance the homeostasis of organisms.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de riesgo ecológico, la evaluación integrada de riesgos y el monitoreo ambiental son herramientas útiles para determinar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos en los niveles de organización biológica de la biota así como en los humanos, como consecuencia de la exposición a contaminantes en un sitio o ecosistemas determinados (Ruíz-Saucedo, 2006; Sutter II, 2007). Este tipo de evaluaciones, a lo largo de los años, se han basado en los análisis químicos de las muestras recolectadas de aire, suelo o agua (evaluación ambiental), así como medición de los niveles subletales acumulados y efectos de los xenobióticos (biomarcadores) en organismos centinelas (biomonitoreo) (Root, 1990; Ilizaliturri *et al.*, 2009).

Una de las partes más importantes de este tipo de evaluaciones es la utilización de biomarcadores. Por lo tanto, las mediciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y de comportamiento son considerados biomarcadores para utilizarse en la evaluación de la exposición o de los efectos a contaminantes en organismos biomonitores (Capo-Martí, 2007). En México, se han utilizado biomarcadores en diferentes evaluaciones de riesgo o monitoreos ambientales como por ejemplo; para evaluar el efecto de jales mineros en biota (Jasso-Pineda *et al.*, 2007; Espinosa-Reyes *et al.*, 2010a), para evaluar el efecto a la exposición a contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y metales pesados (Pb) en Coatzacoalcos (Espinosa-Reyes *et al.*, 2010b, González-Mille *et al.*, 2013, Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013) y en ríos de Jalisco (Mejía-Saavedra, 2014). Sin embargo, en estas evaluaciones solo se ha utilizado un tipo de respuesta o efecto en los organismos. Diversos autores señalan distintas ventajas al utilizar un enfoque con múltiples biomarcadores (es decir una batería) en el monitoreo biológico, por ejemplo; se podrían conjuntar en un índice que a su vez proveería un mayor entendimiento de los efectos en los organismos y priorizar los sitios más afectados en una región contaminada para finalmente proponer la contención o mitigación de la contaminación (Depledge, 1994; Beliaeff y Burgeot, 2002; Broeg y Lehtonen, 2006; Roméo y Giambérini, 2013).

Así mismo, en algunas evaluaciones o monitoreos ambientales se han utilizado biomarcadores destructivos, es decir, se ha requerido el sacrificio de organismos, lo cual en otros sitios no puede realizarse debido al estatus de protección de la fauna o por términos de bioética. Los biomarcadores no destructivos tienen una serie de ventajas contra los destructivos. Aunque, ambos cumplen la función de demostrar la exposición y efectos de los contaminantes. La diferencia radica en que los primeros no requieren el sacrificio del organismo, sólo se toman muestras biológicas como sangre, orina o biopsias de tejido; y además, se pueden utilizar por temporadas con el mismo biomonitor y recolectarse un mayor número de muestras (Fossi y Leonzio, 1994). Por lo cual una batería de biomarcadores no destructivos en un biomonitor bien definida podría proveer suficiente información para complementar las evaluaciones de riesgo o monitoreos ambientales para un mayor peso de evidencia y la posterior toma de decisiones en torno a los sitios contaminados.

El objetivo de esta investigación fue evaluar una batería de biomarcadores no destructivos en un biomonitor de la región de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, Veracruz, uno de los sitios más afectados por la contaminación. Para posteriormente, proponer esta batería de biomarcadores como una herramienta para complementar las evaluaciones de riesgo o monitoreos ambientales en diferentes escenarios de contaminación en México.

1.1 Justificación

En México existen diferentes tipos de sitios contaminados, de los cuales algunos no han sido evaluados en cuestión de los efectos de los contaminantes hacia la biota o incluso hasta los seres humanos. Aunado a esto, en materia ambiental existen muy pocas normas en nuestro país en cuanto a algunos contaminantes como COPs, HAPs, BPCs o metales pesados. Por lo cual es importante iniciar con un acercamiento de sus efectos en organismos, de la mano de la utilización de biomarcadores.

Uno de los sitios donde se tiene un mayor registro de contaminación es la región de la cuenca baja Coatzacoalcos (Veracruz). Considerada como una de las

regiones más contaminados de México debido a las actividades industriales e urbanización que han contribuido al deterioro de los ecosistemas que se encuentran en esta región (Vázquez-Botello y Páez, 1987; Bozada-Robles y Bejarano-González, 2006); a tal grado que, en las matrices ambientales como el agua, suelo, aire o sedimento, e incluso en seres humanos y fauna se ha detectado la presencia de contaminantes como compuestos orgánicos persistentes (COPs), compuestos orgánicos volátiles o metales pesados, entre otros (Stringer *et al.* 2001; Blake, 2005; Riojas-Rodríguez *et al.* 2008; Espinosa-Reyes *et al.*, 2013; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013). Algunos de estos contaminantes se han asociado a efectos genotóxicos o enzimáticos en organismos acuáticos y terrestres (Espinosa-Reyes *et al.*, 2010b; González-Mille *et al.*, 2010; Gonzalez-Mille *et al.*, 2013; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013). Por lo cual, se eligió este sitio para probar la batería de biomarcadores en un organismo biomonitor.

Dentro de los organismos más afectados por los contaminantes en Coatzacoalcos, se encuentran los anfibios; un grupo de vertebrados que representan el eslabón entre la vida en el medio acuático y la adaptación a la vida terrestre (Samaniego-Herrera *et al.*, 2007). Este ciclo de vida complejo y sus características como: tamaño, su fisiología, metabolismo y su piel altamente permeable hacen a los anfibios especialmente susceptibles a la degradación del ambiente (Wells, 2007), por lo cual, han sido considerados como indicadores o biomonitores de la calidad ambiental (Sparling *et al.*, 2010). Diferentes estudios han propuesto a la contaminación ambiental como uno de los factores o cofactores en el declive mundial de los anfibios que se ha presentado desde hace más de una década (Linder *et al.*, 2003; Sparling *et al.*, 2010). El sapo gigante o de caña (*R. marina*) es un anfibio anuro de distribución nativa en México y Centroamérica, un organismo omnívoro y oportunista (Zug y Zug, 1979) y con características fisiológicas como un alto índice somático lipídico; por lo que puede integrar diferentes vías de exposición a contaminantes (González-Mille *et al.*, 2013; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013). Esta especie ha sido utilizada como biomonitor en la evaluación de la contaminación del aire (Dohm *et al.*, 2008), enfermedades

infecciosas (Zupanovic *et al.*, 1998), plaguicidas organoclorados (Linzey *et al.*, 2003) y perturbadores endocrinos (McCoy *et al.*, 2008). En México ha sido utilizado como biomonitor de exposición a Pb (Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013) y contaminantes orgánicos persistentes (González-Mille *et al.*, 2013), ambos en la cuenca del Río Coatzacoalcos. Sin embargo, en las anteriores investigaciones solo se ha utilizado la medición de un solo tipo de cambio o efecto a nivel bioquímico en la especie. Como resultado de ser un buen biomonitor, y susceptible a la contaminación, *R. marina* fue el organismo ideal para ser utilizado en la integración de una batería de biomarcadores de exposición o efecto.

El uso de múltiples biomarcadores pueden ser de utilidad en el monitoreo de sitios contaminados, porque pueden ser correlacionados entre sí, e integrase en un índice donde pueda establecerse el grado de riesgo que los contaminantes puedan tener a la salud de los organismos (Beliaeff y Burgeot, 2002; Broeg y Lehtonen, 2006; Roméo y Giambérini, 2013), y, dado que estos biomarcadores al ser no destructivos y medidos en fluidos biológicos pueden extrapolarse para ser usados en otras especies de vertebrados (hasta en peligro de extinción o bajo protección especial de ecosistemas similares al del sapo gigante). Así mismo, es de suma importancia crear una batería de biomarcadores dada la existencia de diferentes escenarios de contaminación a lo largo del país, y aplicarla en un organismo que tenga una amplia distribución como el sapo gigante, para añadir un mayor peso de evidencia en evaluaciones de riesgo ecológico o monitoreo ambiental para priorizar los sitios en una región contaminada y así tomar las decisiones adecuadas en cuanto a su remediación o mitigación.

1.2 Objetivo general

Determinar la actividad de biomarcadores no destructivos (glutación s-transferasa, malondioaldehído, ALAD, parámetros hematológicos, butirilcolinesterasa, apoptosis, factor de condición y vitelogenina) en sapos gigantes (*R. marina*) de dos zonas de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos. De tal manera que estos biomarcadores puedan ser utilizados en el monitoreo y evaluación de riesgo ecológico de sitios contaminados.

1.3 Objetivos específicos

- Llevar a cabo el muestreo biológico de sapos gigantes en dos zonas consideradas como zona alta y baja.
- Determinar los biomarcadores no destructivos en plasma o sangre completa de sapo gigante de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos y comparar contra una referencia.
- Relacionar la variación de los biomarcadores con los contaminantes registrados en la región en estudios previos.

ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Sitio de Estudio

2.1.1 Ubicación

La cuenca del Río Coatzacoalcos se encuentra localizada en la Región Hidrológica No. 29, ubicada en la denominada Llanura Costera del Golfo de México limitada al sur por la Sierra Madre del Sur y al norte por la Cuenca del Río Papaloapan. Tiene un área total de 23 956 km², representando el 1.2% de la superficie total de la República Mexicana. Comprende territorialmente 32 municipios, 9 pertenecientes al Estado de Oaxaca y 23 a Veracruz (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales -SEMARNAT- y Comisión Nacional del Agua -CONAGUA-, 2014).

De acuerdo a Baruch-Velázquez (2010) la cuenca del Río Coatzacoalcos se divide en tres componentes funcionales:

- Cuenca Alta: con una altitud que va desde los 1001 a 3200 metros sobre el nivel del mar, y se localiza entre la Sierra Atravesada, los Chimalapas de la selva Zoque y Sierra Mixe en la Sierra Madre del Sur, en el estado de Oaxaca.
- Cuenca Media: con una altitud de 151 a 1000 msnm, localizada en la parte del Volcán de San Martín Pajapan en la Sierra Volcánica de los Tuxtla y la Llanura Costera del Golfo Sur. Entre los límites de los estados de Oaxaca y Veracruz.
- Cuenca Baja: con una altitud que va de los 0 a 150 msnm y localizada sobre la Llanura Costera del Golfo Sur. El cual recorre diferentes municipios de Veracruz.

La cuenca baja del Río Coatzacoalcos se ubica entre los paralelos 17°39'54" y 18°21'30" de la latitud norte y los meridianos 94°03'23" y 94°54'37" de longitud oeste (Figura 1). Tiene una superficie de 4 681.63 km². Comprende 21 municipios entre los cuales figuran Acayucán, Agua Dulce, Chinameca, Coatzacoalcos, Cosoleacaque, Hidalgotitlán, Ixhuatlán del Sureste, Jáltipan, Las Choapas, Mecayapan, Minatitlán, Moloacán, Nanchital de Lázaro Cárdenas,

Olutla, Oteapan, Pajapan, Sayula de Alemán, Soconusco, Soteapan, Texistepec y Zaragoza (Secretaría de Desarrollo Social -SEDESOL-, s.f.)

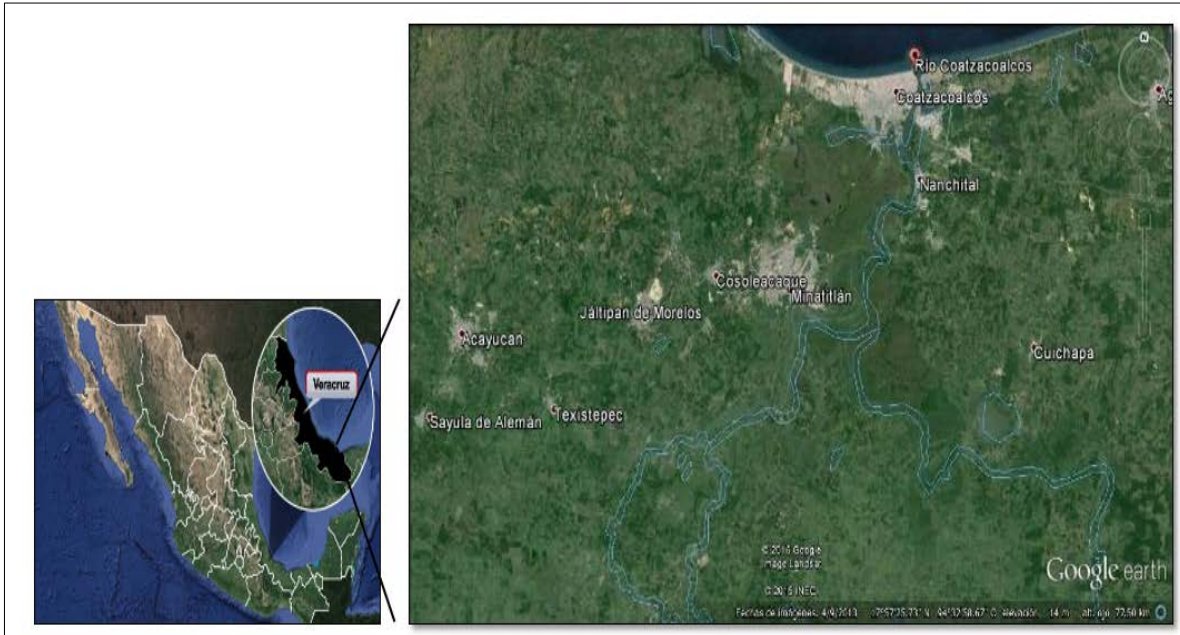


Figura 1. Ubicación de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, Veracruz, México (Fuente: Google Earth, 2015)

2.1.2 Clima

La cuenca baja del Río Coatzacoalcos cuenta los siguientes climas (Baruch-Velázquez, 2010):

- Am (f)(i) g. Cálido-húmedo con un porcentaje de lluvia invernal mayor al de 10.2% de la anual, con poca oscilación térmica (5-7°C), el mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano
- Am (i) g. Cálido-húmedo con lluvias en verano, porcentaje de lluvia invernal entre 5-10.2 % de la anual, con poca oscilación térmica (5-7°C).

Cuenta con una temperatura estacional de 22-26°C, y los vientos dominantes son en dirección noreste y sureste. Se presentan tres estaciones diferenciadas: nortes (Enero), secas (Abril) y lluvias (Agosto-Septiembre) (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad -CONABIO-, 2015).

2.1.3 Hidrología

El Río Coatzacoalcos recibe tres afluentes principales: Río Coachapa que entra a la cuenca 5 km arriba del municipio de Minatitlán; el Río Uxpanapa que entra en el cauce principal 3 km debajo de Minatitlán. Por su margen izquierdo recibe al Río Calzadas que se une a 4 km de su desembocadura. En la cuenca baja en el área de Hidalgotitlán se encuentran cuatro islas: Tacamichapa, Yegüero, Tacoteno y Pajaritos. Se encuentra un canal que comunica con la dársena de Pajaritos, a 3 km de la desembocadura del río, cuyas condiciones naturales se modificaron para convertirse en una dársena de atraque de barcos petroleros (Baruch-Velázquez, 2010).

2.1.4 Tipos de suelo

De acuerdo a Sommer *et al.* (2010) los tipos de suelos que se encuentran en la cuenca baja son arenosoles (suelos arenosos, con textura gruesa, alta permeabilidad y baja capacidad de almacenaje de agua y nutrientes, susceptibles a erosión), gleysoles (suelos propios de humedales o terrenos pantanosos, saturados de agua por temporada y alta materia orgánica), cambisoles (suelos con contenidos de arcilla, materia orgánica y carbonatos), luvisoles y acrisoles (con un contenido mayor de arcillas en el subsuelo, ácidos, intemperizados).

2.1.5 Vegetación

La región del Río Coatzacoalcos, en su parte baja, comprende desde comunidades vegetales hasta asociaciones secundarias de plantas llamadas acahuales y pastizales. Estos ambientes vegetales que están presentes en la región es influenciada por los cambios en el sistema hidrodinámico del propio río y sus afluentes, donde a su vez la vegetación es de vital importancia como hábitat, refugio y fuente de alimentación de las especies animales, sitio de almacenamiento y purificación del agua. Dada la diversidad de ecosistemas en esta región la vegetación se clasifica en: dunas, vegetación acuática y subacuática, tular, popal, ciperal, manglar, vegetación riparia, selva alta

perennifolia, selva mediana perennifolia, jimbal, tasistal, encinar, acahuales y pastizal (Carmona y Hernández, 2010; CONABIO, 2015).

2.1.6 Fauna

La presencia de ambientes tropicales en esta región predice la existencia de una alta riqueza de fauna. La diversidad de la fauna de la región se ha estimado en 56 especies de anfibios y reptiles (lo cual corresponde al 40% para el estado de Veracruz), 116 especies de aves (16.5% de la avifauna reportada para el estado) y 60 especies de mamíferos (10% del total estatal). De esta riqueza de vertebrados se identifican dos anfibios, 12 reptiles, 14 aves y dos mamíferos en alguna categoría de riesgo, de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001. Los sitios identificados hasta ahora con mayor diversidad de fauna se localizan en las zonas de Minatitlán y Cosoleacaque, donde se encuentra una gran proporción de manglar. A lo largo de la cuenca de Coatzacoalcos se encuentran humedales donde se han identificado especies de reptiles como el caimán (*Claudius angustus*), pochitoque (*Kinosternon leucostomum*) o como el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*); aves, como el pato silvestre (*Cairina moschata*) y el halcón aplomado (*Falco femoralis*); mamíferos, como la nutria (*Lontra longicaudis*) o el jaguarundi (*Herpailurus jaguarondi*); y anfibios, como la cecilia (*Dermophis mexicanus*), la rana *Lithobates berlandieri* o el sapo gigante (*R. marina*). Algunas de estas especies se encuentran incluidas en la NOM-059-SEMARNAT-2001 (Morales-Mávila y Suárez-Domínguez, 2010).

2.1.7 Principales actividades productivas del sitio de estudio

2.1.7.1 Actividades primarias

En la cuenca se desarrollan actividades agrícolas (de temporal y/o de riego), el cultivo de pastos y desarrollo de pastos inducidos (SEMARNAT y CONAGUA, 2014). Los principales cultivos que se producen son maíz, arroz, chile, pepino, hortalizas, caña de azúcar, sorgo, frijol, cítricos, entre otros (INEGI, 2009; Mendoza-Cantú *et al.*, 2010).

Se práctica en la región la ganadería de bovinos, con un doble propósito: la producción de leche y de carne, además de ovino, caprino, porcino y gallináceas abarcando extensiones de tierra de municipios como Minatitlán y parte de Coatzacoalcos (INEGI, 2009).

2.1.7.2 Actividades secundarias

En ocho localidades alrededor de la cuenca del río se realizan este tipo de actividades, como son la industria extractiva (petróleo y gas), de la construcción y de la transformación (Mendoza-Cantú *et al.*, 2010).

Hasta 2013, se contaban con diferentes industrias dedicadas a la producción de alimentos, químicos o petrolera en la región de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos en diferentes municipios que lo componen (Tabla 1). Cada una de estas producen y emiten contaminantes hacia los ecosistemas de la cuenca (SEMARNAT, 2013).

2.1.7.3 Actividades terciarias

De acuerdo a la función principal se desarrollan actividades terciarias, entre las que destacan el comercio, los servicios, el transporte y la administración pública. Ocupan una superficie aproximada de 114.75 km². Algunos municipios que conforma la región de la cuenca baja como Ixhuatlán del Sureste, Coatzacoalcos, Minatitlán, Cosoleacaque, Nanchital y Agua Dulce se dedican al sector terciario (INEGI, 2009; Mendoza-Cantú *et al.*, 2010).

Tabla 1. Industrias localizadas y sus emisiones hasta 2013 en municipios de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos (SEMARNAT, RETC, 2013)

Nombre	Sector	Municipio	Emisiones
PEMEX Exploración y Producción: Estación Provisional de separación RABASA	Petróleo y Petroquímica	Agua Dulce	Hg, Pb (compuestos), Cd, Cr (compuestos), Ni, As y cianuro orgánico en agua CO ₂ en aire

Nombre	Sector	Municipio	Emisiones
Ciarant México S.A. de C. V.	Química (producción de sustancias químicas a partir de mezclas)	Coatzacoalcos	Cianuro inorgánico y orgánico, Hg, Pb, Cd, As, Ni, Cr en suelo, CO ₂ en aire.
Grupo CELANESE S. de R.L. de C.V.	Petróleo y química (fabricación de petroquímicos secundarios, almacenaje)	Coatzacoalcos	CO ₂ y acetaldehído en aire, Bifenilos Policlorados (BPCs), Ni, Cd, Pb, Hg, Cr, As, Asbesto, benceno en suelo
Industrias derivadas del Etileno	Petróleo y química (producción de petroquímicos)	Coatzacoalcos	NO, CO ₂ , Benceno, Formaldehído, 1,2-Diclorobenceno, Metano, compuestos de Pb, Hg, Cr, Cd, Ni, As en aire. Pb, Hg, Cr, Cd, Ni, As, benceno, cianuros en suelo.
Industria química del Istmo S.A. de C.V.	Química (producción de gases industriales)	Coatzacoalcos	Pb, Hg, Cr, Cd, Ni, As y compuestos en suelo
MEXICHEM derivados, S.A. de C.V. Planta Coatzacoalcos	Química (producción de ácidos, sales y bases orgánicos)	Coatzacoalcos	CO ₂ , Hexafluoruro de Azufre, Tetrafluoruro de Carbono y compuestos de Cd, Ni, Cr tanto en aire como en suelo.
OXITENO MEXICO S.A. de C.V.	Química (fabricación de productos químicos para aseo general)	Coatzacoalcos	CO ₂ en aire, Fenoles, As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb en suelo
PEMEX Petroquímica Complejos Cangrejera, Morelos, Pajaritos	Petróleo y petroquímica (producción de petroquímicos secundarios)	Coatzacoalcos	CO ₂ , Dioxinas, Furanos, Metano, 1,2-Dicloroetano, Cloruro de Vinilo en aire, As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y compuestos, cianuros en suelo
PEMEX gas y petroquímica básica	Petróleo y petroquímica (almacenaje, producción y distribución derivados del petróleo)	Coatzacoalcos	CO ₂ en aire, asbesto, As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y sus compuestos en aire y suelo.
DARK Resinas Américas México S.A. de C.V.	Química (producción de polietilentereftalato)	Cosoleacaque	Pb (compuestos), acetaldehído, dioxanos, CO ₂ en aire

Nombre	Sector	Municipio	Emisiones
FEFERMEX S.A. de C.V.	Química (producción de sustancias químicas a partir de mezclas)	Cosoleacaque	As, Cd, Cr, Hg, Pb, Ni y compuestos en suelos
PEMEX Petroquímica Complejo Cosoleacaque	Petróleo y petroquímica (producción de petroquímicos secundarios)	Cosoleacaque	Acroleínas, CO ₂ , Benceno y metano en aire, As, Cr, Hg, Ni, Pb y compuestos en suelo
Tereftalatos Mexicanos S.A. de C.V.	Química (elaboración, venta de ácido tereftálico purificado y sus derivados)	Cosoleacaque	CO ₂ , NO en aire, Cianuros, Cd y Ni en suelo
Arkema México S.A. de C.V.	Química (producción de productos químicos orgánicos básicos)	Ixhuatlán del Sureste	As, Cd, Cr, Hg, Pb y Ni en suelo
PEMEX Gas y petroquímica básica sector ductos Minatitlán, PEMEX refinación Refinería General Lázaro Cárdenas, PEMEX Almacenamiento y Distribución	Petróleo y petroquímica (transportes de ductos, refinación del petróleo, almacenamiento y distribución de derivados, transporte de hidrocarburos)	Minatitlán	CO ₂ , Acetaldehído, Formaldehído, Acroleína, benceno, Metano, compuestos de As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb en aire. En suelo y agua benceno, As, Cd, Cr, Hg, Ni y Pb.
Soluciones Químicas para el Campo y la Industria, S.A. de C.V.	Química (producción de fertilizantes químicos)	Minatitlán	CO ₂ y NO en aire, As, Cd, Cr, Hg, Ni y Pb en agua

Fuente: SEMARNAT, 2013

2.1.8 Problemática del sitio de estudio

La región de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos ha tenido un acelerado crecimiento urbano e industrial en las últimas décadas. Se ha considerado el Río Coatzacoalcos como el más contaminado de México (Stringer *et al.*, 2001; Vázquez-Botello *et al.*, 2004; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013). En la zona se ha desarrollado un conjunto industrial químico, petroquímico y de derivados más grande y concentrado de toda América Latina. Instalaciones como la Refinería “Lázaro Cárdenas”, complejos petroquímicos Cosoleacaque, Pajaritos, Cangrejera y Morelos; Azufrera Panamericana e industrias como Fenoquímica, Tereftalatos Mexicanos, Gunos y Fertilizantes de México, Resistol y Celanese Mexicana

constituyen solo algunas empresas productivas y de emisión de contaminantes (Bozada-Robles y Bejarano-González, 2006).

La contaminación ha sido histórica desde que se iniciaron las obras de exploración y refinación petrolera a principios del siglo XX hasta la industrialización, desarrollo agropecuario y crecimiento urbano en la actualidad, causando un rápido deterioro de los ecosistemas que allí se encuentran (Bozada-Robles y Bejarano-González, 2006).

Actualmente dentro de los municipios que conforman la cuenca baja del Río Coatzacoalcos se encuentran establecidas diversas industrias que podrían contribuir a la emisión de contaminantes (Tabla 1) (SEMARNAT, 2013). Diversas investigaciones en esta región han demostrado la presencia de metales pesados (Stringer *et al.*, 2001; Vázquez-Botello *et al.*, 2004; Rosales-Hoz y Carranza-Edwards, 2005; Pelallo-Martínez *et al.*, 2011; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013), hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) (Sánchez-Guerra *et al.*, 2012), compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Riojas-Rodríguez *et al.*, 2008), compuestos polibromados (Blake, 2005; Espinosa-Reyes *et al.*, 2012) y otros compuestos orgánicos persistentes (COPs) (Espinosa-Reyes *et al.*, 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Contaminantes registrados en el Río Coatzacoalcos.

Contaminante	Matriz	Autores
Metales pesados (Cd, Cu Hg, Zn, Pb)	Sedimento, agua, suelo. Sangre de anfibios, reptiles y humanos.	Stringer <i>et al.</i> , 2001; Vázquez-Botello, 2004; Rosales y Carranza, 2005; Pellalo-Martínez <i>et al.</i> , 2011, Ilizaliturri-Hernández <i>et al.</i> , 2013.
Compuestos bromados	Suelo Fauna acuática	Blake, 2005, Espinosa-Reyes <i>et al.</i> , 2012
Compuestos orgánicos persistentes (DDT, bifenilos policlorados -BPCs-, Lindano, hexaclorociclobenceno)	Suelo, sedimento, agua, fauna acuática y terrestre (peces, reptiles y anfibios)	Stringer <i>et al.</i> , 2001; Espinosa-Reyes <i>et al.</i> , 2012, González-Mille <i>et al.</i> , 2010.
Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs)	Orina de infantes	Sánchez-Guerra <i>et al.</i> 2012.
Compuestos orgánicos volátiles	Agua, suelo, sedimento	Riojas-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008.

Aunado a esto empresas anteriormente establecidas también pudieron contribuir a las emisiones de contaminantes, tal es el caso de Tetraetilo de México (TEMSA) que en su momento produjo Tetraetilo de Plomo, un antidetonante que se le adicionó a la gasolina (Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013).

Tabla 3. Efectos de los contaminantes del sitio en fauna acuática y terrestre

Especie	Contaminante	Efecto	Autor
<i>Eisena</i> spp. (lombriz de tierra)	COPs	Daño al ADN	Espinosa-Reyes <i>et al.</i> , 2010b, González-Mille <i>et al.</i> , 2010, González-Mille <i>et al.</i> , 2013.
<i>R. marina</i> (sapo gigante)			
Peces (<i>Centropomus parallelus</i> , <i>Mugil cephalus</i> , <i>Eugerres axillaris</i> , <i>Oreochromis</i> sp, and <i>Ariopsis felis</i>)			
<i>R. marina</i> (sapo gigante)	Plomo	Inhibición de ácido 5-aminolevulínico dehidratasa (ALAD)	Ilizaliturri-Hernández <i>et al.</i> , 2013

Por otra parte, se han registrado concentraciones de dicloro difenil tricloroetano (DDT) y sus metabolitos como el DDE, en el Río Coatzacoalcos. La presencia de estos compuestos se puede deber a que la región de Coatzacoalcos es una zona endémica de paludismo, y a pesar de ser prohibido en México desde el año 2000, en estudios recientes se han registrado concentraciones en sedimentos del río (Espinosa-Reyes *et al.*, 2013). A la par también se ha evidenciado la presencia de concentraciones de COPs, metales pesados como el plomo, BPCs, PBDEs en sangre y tejidos de fauna acuática (peces e invertebrados acuáticos), fauna terrestre (iguanas, lombrices y cangrejos) y fauna de humedales (sapo gigante, tortugas, cocodrilos). Algunos de estos contaminantes se han asociado a daño al ADN (genotóxico) e inhibición del ácido delta aminolevulínico, enzima importante para la síntesis del grupo hemo

(Espinosa-Reyes *et al.*, 2010b, 2012; González-Mille *et al.*, 2010; González-Mille *et al.*, 2013; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013) (Tabla 3).

2.2 Características importantes de los contaminantes registrados en el sitio de estudio

2.2.1 Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

Son compuestos orgánicos, algunos de origen natural, pero la mayoría de origen antropogénico que resisten la fotólisis, degradación química y biológica. Su característica principal es que presentan un alto coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) lo cual les confiere la propiedad de ser muy solubles en lípidos, resultando en una bioacumulación en tejidos con alto contenido graso de los seres vivos. Estas propiedades de persistencia y semivolatilidad han hecho que se encuentren a lo largo de todas las regiones del mundo, incluso en regiones donde no existan fuentes locales, explicando así su alto rango de transporte. Se ha registrado la presencia de COPs a gran escala; desde sedimentos y suelos hasta tejidos grasos de peces o animales terrestres, e incluso en la leche materna de los humanos. Son biomagnificables, es decir aumentan su concentración a lo largo de la cadena trófica. Estudios de laboratorio demuestran que pueden ser perturbadores endocrinos, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos (Walker, 2009). Dentro de las regulaciones a nivel internacional para estos compuestos, se creó el Tratado de Estocolmo, el cual inicialmente prohibía el uso y producción de 12 compuestos. En los cuales se incluían plaguicidas, compuestos de origen antropogénico y productos formados de manera no intencionada. Plaguicidas como aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, mirex, toxafeno, hexaclorobenceno (HCB); químicos o subproductos industriales como Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs), Bifenilos Policlorados (BPCs), dibenzo-para-dioxinas policloradas (DDPCs) y dibenzofuranos Policlorados (DFPCs) formaban parte de los compuestos iniciales. Sin embargo, en los últimos años se han añadido más compuestos entre los cuales se encuentran clordecona, hexaclorociclohexano (HCH, lindano), éteres polibromodifenilos

(PBDEs), hexabromodifenilos y compuestos perfluorooctanosulfónicos (PFOs) (Cumanova *et al.*, 2008).

Estos compuestos se almacenan en el tejido graso de los organismos, y pueden ser excretados a través de las vías biliares y urinarias, así como en la leche materna. Se ha evidenciado que el DDT tiene diferentes efectos tóxicos en distintos modelos animales. Los organoclorados también pueden interactuar con receptores endocrinos como los estrógenos y los andrógenos (perturbación endocrina) (Walker, 2014).

2.2.1.1 Bifenilos Policlorados (BPCs)

Estos compuestos forman parte del grupo de halogenados aromáticos que han sido identificados en diversas matrices ambientales. Son compuestos industriales químicos, no se encuentran naturalmente en el ambiente. Son producto de la actividad antropogénica. Eran producidos por la cloración de bifenilos y cada producto formado es nombrado conforme al porcentaje de cloración (por peso). Fueron producidos por diversas compañías, por lo cual los BPCs podían tener diferentes características fisicoquímicas, en parte gracias a su grado de cloración, las cuales contribuían a sus diversas aplicaciones. Fueron utilizados como diluyentes orgánicos, plastificantes, plaguicidas, adhesivos, agentes de reducción de polvo, retardantes de flama, fluidos de transferencia de calor, fluidos dieléctricos para transformadores y capacitores, lubricantes hidráulicos y selladores (Safe, 1994; Walker, 2009).

Debido a estos diferentes usos, estos compuestos han podido acumularse en el medio ambiente, por lo cual han sido restringidos mediante normas en diferentes países a lo largo de los últimos años. Existen más de 209 congéneres de BPCs. Son compuestos muy estables, con una reactividad química baja, densidad alta, y muy resistentes al fuego además de ser muy lipofílicos, que han contribuido a problemas ambientales (Walker, 2014). Una vez introducidos en el medio ambiente, dadas sus propiedades, los BPCs se degradan lentamente, se someten a ciclos y son transportados junto con varios componentes al ecosistema global. Más aún, dada su lipofilicidad, estos compuestos se pueden bioacumular y

biomagnificar a través de los diferentes niveles tróficos, afectando la cadena alimenticia. Diferentes estudios han demostrado la presencia de estos compuestos en el aire, agua, sedimentos, y en tejidos de animales salvajes (Safe, 1994).

Los efectos toxicológicos de los BPCs a los organismos se encuentran bien documentados (Sibley y Hanson, 2011). Estudios en animales han evidenciado que estos compuestos pueden tener efectos teratogénicos (Ceci *et al.*, 1974; Marks *et al.*, 1981), mutagénicos y carcinogénicos (Safe, 1989), inmunotóxicos (Thomas y Hinsdill, 1978), efectos hepatotóxicos así como efectos de perturbación endocrina (alteración del sistema reproductivo) (Sibley y Hanson, 2011). En vertebrados el efecto toxicológico puede llegar a ser mediado por el receptor arilo hidrocarburo (AhR). En anfibios se ha demostrado la presencia de estos compuestos y su asociación a efectos como alteraciones enzimáticas y del sistema endocrino (Sibley y Hanson, 2011).

2.2.1.2 Dioxinas

Las policlorodibenzodioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF) (catalogadas comúnmente como dioxinas) son moléculas planares con una estructura compuesta por dos anillos de benceno unidos por un puente de oxígeno. No son producidas industrialmente y no tienen ninguna aplicación comercial. Sin embargo, hay diferentes maneras para que estos compuestos se formen y se liberen al medio ambiente. Dentro de sus principales fuentes están los procesos de fundición de metales, la producción de clorofenoles y herbicidas, durante procesos industriales como en la producción de papel, incineración de residuos municipales, pero, sobre todo, la quema de combustibles fósiles (Chopra y Schrenk, 2011; Walker, 2014).

Las dioxinas comúnmente no son solubles en agua, pero sí en grasas por su alto K_{ow} . El metabolismo de estos compuestos es lento en mamíferos. Las dioxinas más cloradas son muy lipofílicas y biológicamente estables, por lo cual pueden atravesar toda la cadena trófica. Los vertebrados muestran una tendencia a bioacumular estos compuestos mayoritariamente en el hígado y en tejidos grasos. Debido a su alta persistencia pueden transportarse alrededor del mundo

uniéndose a partículas de aerosoles, haciendo que se puedan detectar en fluidos biológicos de humanos, animales y muestras ambientales en regiones polares (Walker, 2009; Chopra y Schrenk, 2011).

Dentro de los efectos toxicológicos de las dioxinas, se ha demostrado que al igual que los BPCs pueden tener efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos, inmunotóxicos y hepatotóxicos. Las dioxinas también pueden tener efectos neurotóxicos en mamíferos y peces. Uno de los principales efectos que tienen las dioxinas a altas dosis en animales es la pérdida de peso. Se ha observado en diferentes especies efectos en el sistema hormonal, pueden ser perturbadores endocrinos debido a que pueden mimetizar los estrógenos, así como interferir en la señalética hormonal. También se ha demostrado que pueden alterar las funciones y desarrollo de órganos reproductivos en reptiles y peces, así como alterar el comportamiento social en aves (Mandal, 2005; Sibley y Hanson, 2011). En anfibios se reportan efectos en el desarrollo y crecimiento, mortalidad de huevos y efectos en la metamorfosis (Collier *et al.* 2008; Sparling *et al.*, 2010).

2.2.1.3 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Son hidrocarburos que se convierten en volátiles (forma gaseosa) a temperatura ambiente, en los que se incluyen una variedad de sustancias químicas, las cuales pueden tener efectos a la salud a largo y corto plazo. Los COVs son contaminantes del aire en ambientes no industriales. Se clasifican según su punto de ebullición: muy volátiles, volátiles, semivolátiles y compuestos orgánicos asociados a partículas de materia orgánica. Pueden formar parte de reacciones en la troposfera y estratosfera, lo cual puede contribuir a la formación de smog y al efecto invernadero en la estratosfera (Molhave, 1991; European Trade Union Institute -ETUI-, 2012).

Los COVs son liberados durante los procesos de combustión de combustibles y quema de carbón, madera, gas natural, solventes, pinturas, adhesivos, plásticos y aditivos de procesos industriales. Algunos ejemplos de compuestos orgánicos volátiles pueden ser el propano, butano, cloruro de metilo,

formaldehído, tolueno, acetona, etanol, plaguicidas como organoclorados y BPCs (US Environmental Protection Agency -EPA-, 2016).

Estos compuestos son de importancia debido a que pueden tener diferentes efectos a la salud de la fauna y del humano, además de que por su baja solubilidad y su afinidad a partículas pueden ser transportados a lo largo del globo terrestre. Debido a que entre estos se encuentran compuestos organoclorados los efectos toxicológicos en fauna pueden ser desde inmunológicos hasta genotóxicos. Dentro de los principales efectos están los daños al tracto respiratorio, alergias, disminución de la función de los pulmones y alteración del sistema nervioso central (Brasher y Wolff, 2004; EPA, 2016).

2.2.2 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAPs)

Son compuestos formados por carbono e hidrógeno dispuestos en forma de dos o más anillos de benceno fusionados en arreglos lineales, angulares, o de racimo que pueden o no tener grupos unidos o sustituidos a uno o más anillos. Siendo los de mayor preocupación ambiental los HAPs que varían de un peso molecular de 128.16 (ej. Naftaleno) a 300.36 (ej. coroneno). Los HAP de mayor peso molecular son relativamente inmóviles debido a su gran volumen molecular y a su extrema baja volatilidad y solubilidad. Con el aumento del peso molecular, la solubilidad acuosa disminuye, y el punto de fusión, ebullición y el log Kow (coeficiente de partición octanol/agua) aumenta, lo cual sugiere una mayor solubilidad en grasas, una disminución en la resistencia a la oxidación y reducción, y una disminución de la presión de vapor. En consecuencia, los HAPs con diferente peso molecular pueden variar sustancialmente su comportamiento, distribución en el medio ambiente y sus efectos a nivel biológico (Eisler, 1987).

Los HAPs son ubicuos en la naturaleza debido a la síntesis por las plantas terrestres y microorganismos, actividad volcánica. Sin embargo, las cantidades formadas por procesos naturales son relativamente menores si se compara con las producidas por los incendios forestales y las fuentes antropogénicas. Las últimas están asociadas con la producción de coque en la industria del hierro y acero, craqueo catalítico del petróleo, la fabricación de carbón negro, los procesos

de formación de la brea a partir del alquitrán, producción del asfalto, incineraciones industriales, quemas a cielo abierto y las emisiones de los motores de combustión interna utilizados en el transporte (Eisler, 1987; Walker, 2009).

Numerosas investigaciones han evidenciado los efectos toxicológicos de los HAPs en organismos tanto vertebrados como invertebrados. La mayoría de estos compuestos tiene propiedades mutagénicas y carcinogénicas, afectando los organismos de los ecosistemas hasta los seres humanos. Una de las formas más comunes de exposición a HAPs es por los derrames accidentales de petróleo. Dentro de los principales efectos a organismos marinos es la narcosis. También pueden formar aductos de ADN, así como inducir inmunosupresión y afectar la actividad estrogénica en diferentes organismos. En anfibios, los HAPs, pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las larvas. Así también, se tiene evidencia de que pueden afectar su respiración, inducir alteraciones eritrocitarias y cambios en la piel. Por último, la toxicidad que los HAPs presentan es consecuencia de su transformación en productos más reactivos dado por los procesos químicos o bioquímicos (Albers, 1995; Walker, 2009; Sibley y Hanson, 2011).

2.2.3 Metales pesados y metaloides

Los metales pesados y metaloides están constituidos por elementos de transición y post-transición incluyendo algunos metaloides como el arsénico y selenio. Se presentan en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presentan diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua. Pueden encontrarse naturalmente en la corteza terrestre, y de igual manera, ser incorporados naturalmente en procesos biológicos como componentes estructurales o de proteínas. Ejemplos de estos elementos pueden ser: arsénico, cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo. Estos se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades antropogénicas. Las actividades como la extracción minera, el refinamiento de productos mineros o la industria pueden contribuir a su emisión. Un desbalance en las concentraciones ambientales puede ocasionar efectos en los ecosistemas (Mann *et al.*, 2011). La contaminación por

metales puede derivar en diversos efectos a la salud y al ambiente, dependiendo del elemento en particular. Por ejemplo; el Hg puede ser biotransformado en los sedimentos a metilmercurio, y de esta manera se convierte en un compuesto persistente que se biomagnifica a lo largo de las cadenas tróficas teniendo efectos tóxicos tanto para la biota como para el ser humano. Dentro de los efectos tóxicos de los metales pesados se pueden mencionar que son teratogénicos, mutagénicos e incluso carcinogénicos (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático - INECC-, 2009; Mann *et al.*, 2011).

2.3 El biomonitoreo en sitios contaminados

Un monitoreo ambiental se basa en los análisis químicos de las muestras recolectadas de aire, suelo o agua. Sin embargo, la detección de fuentes de contaminación intermitentes depende en gran medida del tiempo y lugar del muestreo. Esta limitación es particularmente importante para los contaminantes atmosféricos y acuáticos, donde ocasionalmente, las emisiones pueden ser rápidamente dispersadas (Root, 1990). Mientras que en el suelo los contaminantes pueden ser arrastrados por la lluvia. Algunos compuestos químicos son tan potentes que una sola exposición a pequeñas cantidades puede ser dañina (Capo-Martí, 2007). Un monitoreo constante podría resultar logísticamente difícil y económicamente inviable, especialmente en áreas silvestres de difícil acceso (Root, 1990).

La evaluación de riesgo ecológico es una herramienta útil para determinar la probabilidad de que se produzcan efectos adversos en los niveles de organización biológica de la biota como consecuencia de la exposición a contaminantes en un sitio o ecosistemas determinados (Ruíz-Saucedo, 2006; Sutter II, 2007). Este tipo de evaluaciones, a lo largo de los años, se han basado en los análisis químicos de las muestras recolectadas de aire, suelo o agua (evaluación ambiental), así como medición de los niveles subletales acumulados y efectos de los xenobióticos (biomarcadores) en organismos centinelas (biomonitoreo) (Root, 1990; Ilizaliturri, 2009).

Los organismos centinelas son aquellos en los que su existencia, sus características, su funcionamiento y sus reacciones, dependen del medio en que se desarrollan, y cambian al modificarse las condiciones ambientales. Son sensibles a los cambios ambientales y reaccionan ante estos, generando estímulos específicos, provocando respuestas que dan información de los cambios ocurridos y su nivel de intensidad. Bajo esta definición, los organismos centinelas se pueden clasificar dentro de la cuantificación de la respuesta como (Capo-Martí, 2007):

- Bioindicadores en sentido estricto: aquellos que, con su presencia, ausencia o abundancia, indican los efectos de un factor ambiental de forma cualitativa. Pueden ser positivos, por su presencia o abundancia, o negativos, por su ausencia.
- Biomonitores: especies que evidencian la presencia de contaminantes o perturbaciones tanto cualitativamente o cuantitativamente, dado que sus reacciones son de alguna manera proporcionales al grado de contaminación o perturbación, o porque acumulan los contaminantes y estos pueden llegar a cuantificarse en el organismo.

Para que un organismo sea considerado un biomonitor de la contaminación debe tener las siguientes características (Fossi y Leonzio, 1994; Sparling *et al.*, 2010):

- Mostrar tolerancia a efectos letales o reproductivos de los contaminantes, de modo que pueda coexistir con los contaminantes en concentraciones bajas a moderadas.
- La especie debe ser propensa a acumular el contaminante en una relación positiva con las concentraciones del ambiente
- Deberá ser suficientemente sedentaria de modo que los individuos serán la muestra de la misma zona en la que se expusieron
- La especie tendrá una distribución lo suficientemente amplia como para permitir comparaciones en diferentes regiones

- Debe ser lo suficientemente común y abundante para permitir su recolección o manipulación sin preocupación de alterar la supervivencia de su población. Las especies en peligro de extinción o amenazadas por lo general no son adecuadas.
- El animal deberá tener el tamaño del cuerpo lo suficientemente grande para extraer y medir los residuos o los cambios fisiológicos. En la actualidad ya se encuentran métodos que implican el uso de microlitros o cantidad de sub-gramos de muestra.

2.3.1 Los anfibios

Los anfibios son un grupo de vertebrados que representan el eslabón entre la vida en el medio acuático y la adaptación a la vida terrestre. Algunas especies de anfibios reúnen todas las características de un biomonitor, otras especies pueden satisfacer sólo alguno de los criterios y son menos adecuados como animales de estudio (Venturino *et al.*, 2003; Samaniego *et al.*, 2007). Son un componente crítico en las comunidades acuáticas y terrestres, por lo tanto, los factores antropogénicos que afecten negativamente a los anfibios pueden influir en el ecosistema entero. Este grupo de vertebrados ocupa diferentes nichos tróficos desde planctívoros hasta carnívoros, y sirven como abundantes presas para la vida silvestre. La fisiología ecotérmica de los anfibios les permite explotar los recursos energéticos en situaciones adversas, por lo tanto, sirven como enlaces críticos entre los niveles tróficos más altos y más bajos dentro de una comunidad. Además, poseen características importantes que los hacen muy sensibles a las perturbaciones del ecosistema, comparado con otros organismos. Su piel permeable, la cual es crítica por el cambio de gases y la osmoregulación, los hace particularmente sensibles a los cambios de condiciones hídricas, así como a los contaminantes y ciertas enfermedades de la piel. La dependencia de muchos anfibios a su ciclo de vida (hábitat acuático y terrestre) los coloca en doble riesgo, debido a que una perturbación de la calidad o disponibilidad de su hábitat, puede

interrumpir su correcto desarrollo y, además, afectar a las poblaciones (Duellman y Trueb, 1994; Samaniego *et al.*, 2007).

El ciclo de vida complejo de la mayoría de los anfibios los hace susceptibles a diferentes rutas de exposición a contaminantes ambientales. La absorción de químicos puede comenzar rápidamente después de la deposición de los huevos, debido al movimiento del agua dentro de la cápsula de los huevos. Como larvas y renacuajos, la absorción de productos químicos en el agua a través de la piel permeable es una importante ruta de exposición. La piel continúa teniendo un papel importante en la absorción de contaminantes en los anfibios adultos como resultado de su función continua como una superficie respiratoria, que junto con los pulmones proporcionan rutas posibles para los compuestos volátiles. La absorción de sustancias químicas también puede darse a través de la alimentación a través de su ciclo de vida, por ejemplo, con los anuros, debido a que en su tiempo de vida viven en dos niveles tróficos, comiendo algas cuando son renacuajos o comiendo invertebrados cuando son adultos. Además, los anfibios adultos pueden enterrarse en los sedimentos y suelos durante la hibernación y la estivación, creando otra ruta de exposición a contaminantes cuando su piel permeable está en contacto con las fases sólidas de los suelos (Linder *et al.*, 2010a; Sparling *et al.*, 2010).

Este ciclo de vida complejo y sus características como: tamaño, su fisiología ecotérmica, metabolismo y su piel altamente permeable hacen a los anfibios especialmente susceptibles a la degradación del ambiente (Wells, 2007), por lo cual, han sido considerados recientemente como indicadores o biomonitores de la calidad ambiental (Sparling *et al.*, 2010). Más aún, diferentes estudios han propuesto la contaminación ambiental como uno de los principales factores o cofactores en el declive mundial de los anfibios que se ha presentado desde 1990 (Alford, 2010).

2.3.1.1 Los anuros

Los anuros, son un grupo de anfibios que constituyen un componente importante de la biomasa de la comunidad ocupando diferentes niveles tróficos.

Las ranas y los sapos constituyen este grupo. La mayoría de los renacuajos son a menudo considerados como herbívoros o detritívoros, mientras que las ranas y los sapos adultos son carnívoros. Además, los anuros renacuajos pueden ocupar un nivel trófico inferior que cuando son adultos, lo que los hace vivir íntimamente con los sedimentos, y por lo tanto pueden estar expuestos a los contaminantes a través diferentes rutas de exposición (Sparling *et al.*, 2010). Aunado a esto, la mayoría de las investigaciones con biomarcadores de efecto o exposición y monitoreos ambientales han sido llevadas a cabo en especies de ranas como; *Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Rana pipiens* o *Lithobates catesbeianus*, y sapos como; *R. arenarum*, *R. fernandezae* y *R. marina* (Venturino *et al.* 2001, Attademo, Lajmanovich, Ilizaliturri González Mille). Muchas de estas investigaciones han demostrado la alta sensibilidad y la utilidad como biomonitores que los anuros tienen a la exposición a xenobióticos tanto en laboratorio como en campo (Venturino *et al.*, 2003; Linder *et al.*, 2010b).

2.3.1.1.1 El sapo gigante o de caña (*R. marina*)

El sapo gigante o sapo de caña es una especie de anfibio anuro (Figura 2), una especie omnívora y oportunista (Zug y Zug, 1979), lo cual indica que pueden ser susceptibles a diferentes vías de exposición de contaminación (González-Mille *et al.*, 2013; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013). Es nativo de Sudamérica, América Central, México y Texas (Solís *et al.*, 2009). Ha sido introducido en países como Australia o Indonesia, entre otros para el control de plagas de la caña de azúcar, sin embargo, según la IUCN a pesar de ser considerada una especie con un estado de conservación de preocupación menor, es también una especie invasora, listada dentro de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo (Lowe *et al.*, 2000). En México no se encuentra listado en las especies con protección especial o en peligro de extinción dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2001. Su distribución incluye los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Chiapas, Tamaulipas, Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Campeche, Veracruz, Tabasco, Chiapas, San Luis Potosí, Quintana Roo y Yucatán (Ochoa-Ochoa *et al.*, 2006).



Figura 2. Sapo gigante o de caña (*R. marina*)

Su alto índice somático y hepatosomático (Feder y Burggren, 1992), su alta biomasa y su voraz apetito (Pizzatto y Shine, 2008) lo hacen una especie susceptible a la bioacumulación y biomagnificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos y a sus efectos toxicológicos. Ha sido utilizado como biomonitor en la evaluación de la contaminación del aire (Dohm *et al.*, 2008), enfermedades infecciosas (Zupanovic *et al.*, 1998), plaguicidas organoclorados (Linzey *et al.*, 2003), perturbadores endocrinos (McCoy *et al.*, 2008), contaminación por Pb (Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013) y otros contaminantes orgánicos persistentes (Gonzalez-Mille *et al.*, 2013). En las investigaciones llevadas a cabo con *R. marina* se han utilizado diferentes biomarcadores, algunos específicos para los contaminantes de los sitios de estudio, siendo respuestas medibles en esta especie útiles para conocer el estado de los ecosistemas donde se encuentran, así como el grado en el que los contaminantes pueden afectar a los organismos.

2.4 Uso de biomarcadores para evaluar la exposición y efectos de los contaminantes

Una de las partes más importantes de evaluaciones de riesgo o monitoreos ambientales es la utilización de biomarcadores. Un biomarcador es una respuesta biológica a un xenobiótico a nivel individual o por debajo de lo que demuestra una

desviación del estado normal. Así las mediciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y de comportamiento son considerados biomarcadores que pueden utilizarse en la evaluación de la exposición o de los efectos de factores estresantes ambientales (Walker, 2009; Sparling *et al.*, 2010; Roméo y Giambérini, 2013).

La clasificación más usada en ecotoxicología de biomarcadores es la división entre biomarcadores de exposición y de efecto (Walker *et al.*, 2012):

- De exposición: son aquellos que indican la exposición de un organismo a químicos ambientales o xenobióticos, pero no proporcionan información acerca del grado de adversidad de los efectos que estos cambios puedan causar.
- De efecto: son aquellos que demuestran un efecto adverso en el organismo.

Una ventaja de la evaluación bioquímica y parámetros fisiológicos en organismos expuestos a contaminantes es que las variaciones que se presenten pueden ser relacionadas por la influencia de estresores y como una indicación temprana de mayores efectos en el organismo o la población (Sibley y Hanson, 2011). También con esto es posible comparar valores de biomarcadores de una población residente a sitios contaminados con otra población de referencia, para indicar la influencia de la exposición a contaminantes en el estado de salud general de los organismos (Linder *et al.*, 2010b).

Los biomarcadores a su vez pueden ser específicos, es decir, pueden ser respuestas ligadas un determinado contaminante. Sin embargo, algunos biomarcadores son tan específicos que no dan información de otros contaminantes que pueden encontrarse comúnmente en sitios contaminados (mezcla compleja) (Amiard-Triquet *et al.*, 2013a). Un ejemplo de este tipo de biomarcadores puede ser la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE), la cual se puede utilizar para proveer una prueba legal de la muerte por plaguicidas OFs y carbamatos, y su inhibición es considerada específica de esta clase de químicos (Walker, 2009). Los biomarcadores son necesarios para conectar la presencia de

los contaminantes en el ambiente con su acción en el organismo (Venturino *et al.*, 2003).

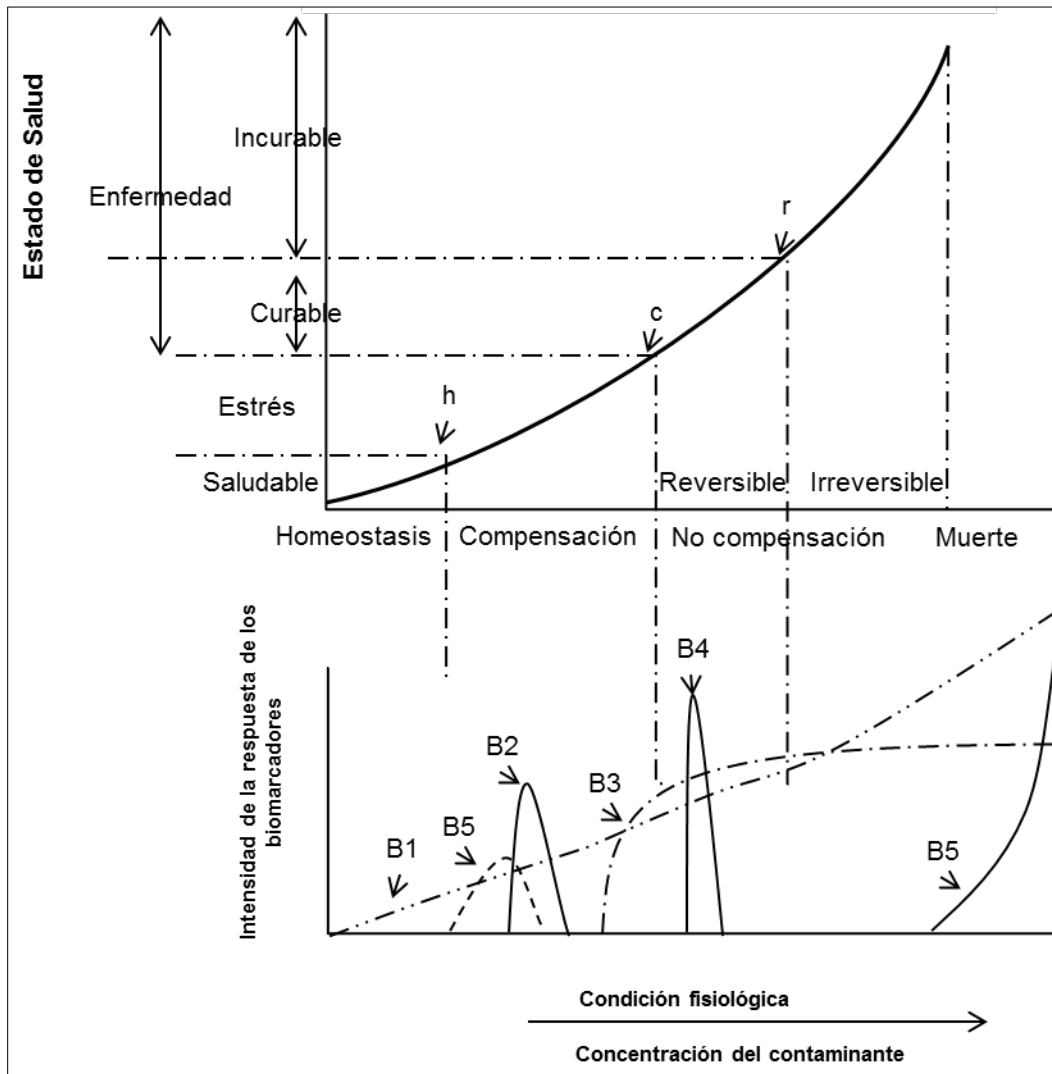


Figura 3. Relación entre la condición fisiológica de un organismo y su estado salud (gráfica superior), y su vínculo con la intensidad de respuesta de biomarcadores y la concentración del contaminante (gráfica inferior) al que está expuesto. Una de las ventajas de una batería de biomarcadores (Fuente: Depledge, 1994).

Diversos autores señalan distintas ventajas al utilizar un enfoque con múltiples biomarcadores (es decir una batería) en el monitoreo biológico, por ejemplo; se podrían conjuntar en un índice que a su vez proveería un mayor entendimiento de los efectos en los organismos y priorizar los sitios más afectados en una región contaminada para finalmente proponer la contención o mitigación de la contaminación (Depledge, 1994; Beliaeff y Burgeot, 2002; Broeg y Lehtonen,

2006; Roméo y Giambérini, 2013). Además Depledge (1994) estableció que una batería de biomarcadores a diferencia de un biomarcador individual puede dar un mayor acercamiento a la salud de los organismos en cuanto a la exposición a contaminantes (Figura 3); de esta forma este autor señala que un conjunto de biomarcadores (B1, B2, B3, B4, B5) podrían señalar en donde se encuentra un organismo dentro de la curva de salud, por lo tanto ofrecen potencialmente una advertencia temprana de cuando la exposición a contaminantes induce desviaciones reversibles o irreversibles (r) de la homeostasis (h) o de la zona compensatoria (c).

2.4.1 Biomarcadores no destructivos

La mayoría de los biomarcadores comúnmente usados en los programas de biomonitoreo requieren el análisis de tejidos y órganos, como el hígado, riñón o cerebro, involucrando el sacrificio de los organismos vivos. Además de implicar consideraciones éticas, los ensayos destructivos son indeseables en muchas situaciones, por ejemplo, el número de animales disponible en un sitio puede estar limitado, las especies pueden estar en peligro de extinción, o en algunas ocasiones se requieren muestras secuenciales del mismo individuo en campo para compararlas en diferentes tiempos. Los ensayos destructivos no pueden ser usados en la evaluación de riesgo en especies protegidas por las normas oficiales o reglamentos (Fossi, 1994).

Un biomarcador no destructivo es toda variación bioquímica, celular, fisiológica o de comportamiento que puede ser medido en fluidos biológicos, tejidos (biopsias) en un organismo o población, el cual proporciona evidencia de la exposición y/o los efectos de uno o más contaminantes ambientales sin causar ningún daño o un estrés prolongado al organismo o la población (Leonzio y Fossi, 1994). Las técnicas no destructivas pueden reemplazar las técnicas destructivas en el biomonitoreo ambiental. Presentando ventajas como (Fossi, 1994):

- La disminución de la población de la especie estudiada puede ser evitada, así mismo, las especies con protección especial o en peligro de extinción pueden ser utilizadas.
- Se pueden analizar especies ecológicamente importantes con un número reducido. Como aquellas especies que no pueden ser analizadas mediante métodos invasivos sin poner en peligro la población.
- Un mayor número de individuos puede ser muestreado por estación, dando más datos para un mayor peso en el análisis estadístico.
- Los animales pueden ser recapturados si se requieren series de muestras o mediciones por tiempos y así hacer el análisis de los mismos biomarcadores, para observar que tan constante o cuanto varía la exposición a los xenobióticos.

2.4.2 Respuestas biológicas consideradas como biomarcadores

2.4.2.1 Enzimas de Biotransformación de Fase II

Durante su desarrollo los organismos pueden estar expuestos a un sinnúmero de contaminantes (plaguicidas organoclorados y organofosforados, productos industriales o petroquímicos como BPCs o HAPs, hasta productos o desechos farmacéuticos) en el medio ambiente donde residen. Dada sus propiedades fisicoquímicas la mayoría de estos contaminantes tienden a ser lipofílicos, haciéndolos susceptibles a ser absorbidos con mayor facilidad, y dentro del organismo a ser reabsorbidos, haciendo difícil su eliminación. Por ende, los organismos a lo largo de su evolución han desarrollado sistemas o procesos para la eliminación de estos compuestos. Dentro de los cuales destaca la biotransformación de xenobióticos (Parkinson *et al.*, 2013).

Está bien documentado que este proceso se lleva a cabo en dos fases por enzimas en el hígado y otros tejidos, y tiene la función de transformar o cambiar las propiedades fisicoquímicas (que les confieren su lipofilidad) de los xenobióticos hasta compuestos más solubles en agua (hidrofílicos), y mucho más fáciles de eliminar mediante vía urinaria o biliar. La primera fase de este proceso

involucra una serie de reacciones que incluyen hidrólisis, oxidación y reducción donde enzimas, como esterasas, hidrolasas o el sistema de citocromos P450, agentes reductores o microflora intestinal eliminan o añaden grupos funcionales a los compuestos haciéndolos hidrofílicos y susceptibles al siguiente proceso de biotransformación; la segunda fase, en la cual se incluyen reacciones de glucoronidación, sulfonación, acetilación, metilación y conjugación, donde las enzimas encargadas de esto reaccionan con los grupos funcionales añadidos en la anterior fase o que ya contenían los compuestos, dando finalmente un producto de mayor polaridad, el cual será más fácil de excretar (Van der Oost *et al.*, 2003; Amiard-Triquet *et al.*, 2013b; Parkinson *et al.*, 2013). La conjugación interviene en el metabolismo de xenobióticos, ya sea después de las reacciones de oxidación (Fase I), o directamente en moléculas que contienen grupos hidroxilos, tiol o carboxílicos (Figura 4). Estas reacciones, también llamadas reacciones de fase II, son catalizadas por enzimas de la membrana o citosólicas que funcionan con varios cofactores (glutación, sulfatos, ácido glucorónico, entre otros) (Parkinson *et al.*, 2013). Las enzimas responsables de estas conjugaciones son glutación-S-transferasa (GST), UDP-glucuronosil-transferasa (UDPGT) y sulfotransferasas. La actividad de las enzimas de fase II es baja en invertebrados a comparación de vertebrados superiores (Amiard-Triquet *et al.*, 2013b).

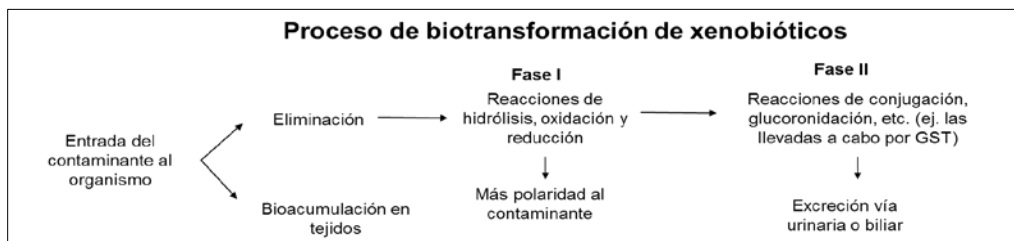


Figura 4. Proceso de biotransformación de xenobióticos por enzimas

2.4.2.1.1 Glutación S-transferasa (GST)

Representan una familia de enzimas importante cuya función es la de combinar el glutación reducido (GSH) con compuestos electrófilos mediante la formación de tioéteres. Los productos son metabolizados en mercapturatos que se excretan en la bilis o en la orina. La actividad de GST aumenta en organismos

expuestos de acuerdo con la concentración de xenobióticos en el medio. Diversos autores han demostrado que la GST está involucrada en la desintoxicación de muchos contaminantes químicos como hidrocarburos, plaguicidas organoclorados y BPCs (Slatinská *et al.*, 2008). Así mismo, desempeña un papel adicional en el proceso de desintoxicación, siendo utilizado como el transporte de moléculas que aumentan la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos a las enzimas de fase I. Por lo tanto, reducen, por enlace covalente a compuestos electrófilos, y la probabilidad de que estos se una a otras macromoléculas celulares, tales como compuestos de ADN (Awatshi, 2006). Diversos xenobióticos y metabolitos pueden ser sometidos a conjugaciones de glutatión. Un ejemplo de reacción en donde se involucra la enzima GST es el ataque a epóxidos; compuestos formados durante las reacciones que ocasionan los radicales libres. En este tipo de reacción el anillo del epóxido es abierto, un enlace GSH es añadido a un carbono, y un grupo OH añadido a otro, confiriéndole más polaridad y en consecuencia pueda ser eliminado con mayor facilidad del organismo por vía biliar. Este tipo de conjugación puede ser crítico en la eliminación de epóxidos mutagénicos recién generados, tales como el benzo[a]pireno 7,8-diol-9-10-epóxido, antes de que pueda causar daños al ADN (Figura 5) (Walker, 2009).

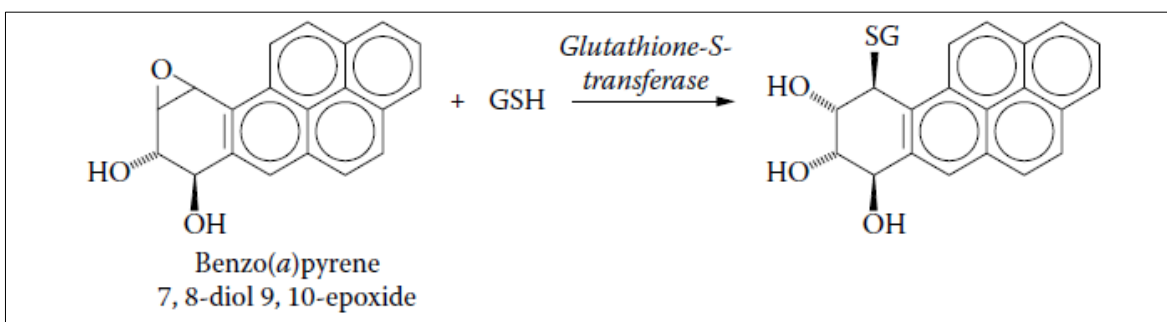


Figura 5. Ejemplo de una de las reacciones de conjugación por parte de GST hacia un epóxido (Walker, 2009).

Recientemente la determinación de esta enzima ha sido utilizada como biomarcador de exposición en campo a plaguicidas organofosforados o en laboratorio a hidrocarburos policíclicos aromáticos en anfibios como *Xenopus laevis*, *R. schneideri*, *R. fernandezae*, o *R. arenarum* (Burýsková *et al.* 2006; Attademo *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2008).

2.4.2.2 Estrés oxidativo

En los seres vivos, las especies reactivas de oxígeno (EROs) y radicales libres son continuamente producidas por mecanismos que involucran compuestos exógenos o endógenos. La producción de EROs y radicales libres es el resultado de la actividad de diferentes enzimas oxidativas, como por ejemplo el citocromo P₄₅₀ reductasa, que producen aniones superóxidos, o de la peroxidación lipídica de membranas celulares. Los xenobióticos son importantes productores de EROs y de radicales libres (Repetto *et al.*, 2012). El desbalance de la producción de EROs da lugar al estrés oxidativo. A nivel celular, resulta en la alteración y oxidación de componentes, como el ADN, proteínas y lípidos, y en consecuencia una perturbación total del equilibrio redox. Sus efectos citotóxicos se expresan en perturbaciones estructurales tales como la inhibición enzimática, el daño de proteínas, la peroxidación de lípidos, procesos inflamatorios y la apoptosis. El daño oxidativo está directamente relacionado con la eficiencia de los sistemas antioxidantes que se producen en las diferentes especies. Los sistemas se componen de un conjunto de enzimas citosólicas (superóxido dismutasa -SOD-, peroxidasas, catalasas -CAT-), la reducción de moléculas de bajo peso molecular (glutatión, ascorbatos, uratos) y varias vitaminas liposolubles (α -tocoferol, β -caroteno) (Amiard-Triquet *et al.*, 2013b).

2.4.2.2.1 Peroxidación lipídica (malondialdehído)

La deficiencia de sistemas antioxidantes para eliminar el exceso de EROs podría dar lugar a diferentes tipos de daño celular, de los cuales el más estudiado es la peroxidación de lípidos, capaz de inducir alteraciones estructurales y químicas en las membranas celulares (Amiard-Triquet *et al.*, 2013b).

El proceso de la peroxidación lipídica involucra una cadena de reacciones que conducen a la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son relativamente sensibles a las reacciones de oxidación. Esta degradación induce la formación de diferentes compuestos como radicales lípidos alcoxilos, alquenos, epóxidos y aldehídos (Figura 6). Entre sus productos finales, se encuentran el

malondialdehído (MDA), el más importante y el más estudiado. La mayoría de estos compuestos son mutagénicos (Marnett, 1999).

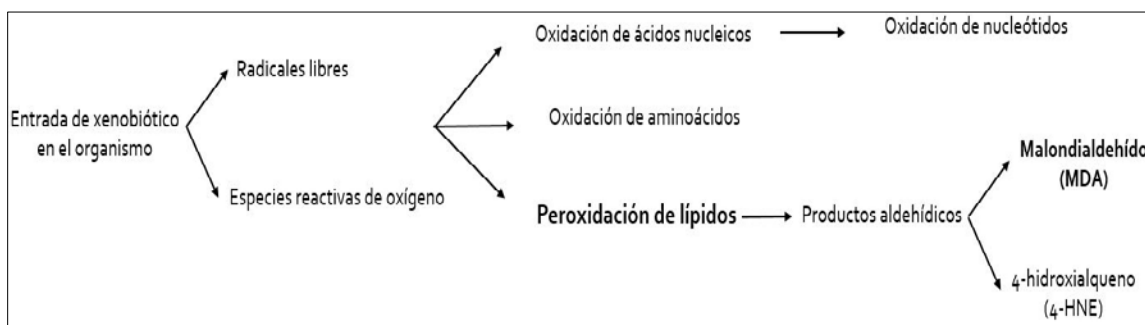


Figura 6. Explicación del proceso peroxidación lipídica inducida por xenobióticos (Fuente: De Zwart *et al.* 1999).

La peroxidación lipídica es considerada uno de los mecanismos que ocasionan daño oxidativo a las membranas celulares y proceso de toxicidad que conducen a la muerte celular (Repetto *et al.*, 2012). Así mismo, se ha demostrado que la peroxidación lipídica puede ser inducida por compuestos organoclorados, organofosforados y metales pesados (De Zwart *et al.*, 1999; Marnett, 1999; Hampel *et al.*, 2016). Los efectos de la peroxidación lipídica pueden ser evaluados en diferentes pasos de la ruptura lipídica: en la fase inicial (dienos conjugados), fase intermedia (hidroperóxidos lipídicos) o en la fase final (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -SRATB-). Este último se basa en el uso de estas sustancias que revelan la formación de MDA por métodos colorimétricos o fluorimétricos. En ocasiones, y debido a que el ácido tiobarbitúrico (ATB) puede reaccionar con otros compuestos diferentes al MDA, los resultados son expresados finalmente como concentraciones de SRATB (Del Río *et al.*, 2005; Amiard-Triquet *et al.*, 2013b). Los niveles de MDA y SRATB son usados comúnmente como biomarcadores de estrés oxidativo indicando la peroxidación de las membranas en diferentes especies vertebradas (Van der Oost *et al.*, 2003).

2.4.2.3 Ácido delta aminolevulínico dehidratasa (δ -ALAD)

Una enzima que ha mostrado en diversos estudios una inhibición directa por la exposición a un contaminante específico, es el ácido 5-aminolevulínico dehidratasa (δ -ALAD), necesaria para la síntesis del grupo hemo (Figura 7). Esta

enzima es muy sensible a los efectos del incremento de plomo en la sangre. El δ -ALAD eritrocitario es inhibido a niveles bajos de plomo, y es por esto, que ha sido usado frecuentemente como un biomarcador no destructivo (Fairbrother, 1994). La biosíntesis del grupo hemo, el grupo prostético de la hemoglobina, es selectivamente dañada por la unión de un metal (plomo), afectando así pasos importantes de la biosíntesis, inhibiendo la actividad de δ -ALAD, y afectando la síntesis de protoporfirina IX y de la hemoglobina (Arrieta *et al.*, 2000; Tokar *et al.*, 2013). Posteriormente, la inactivación de ALAD produce la acumulación de productos pro-oxidantes que pueden desencadenar procesos de estrés oxidativo, por ejemplo, la oxidación de membranas (Arrieta *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2012).

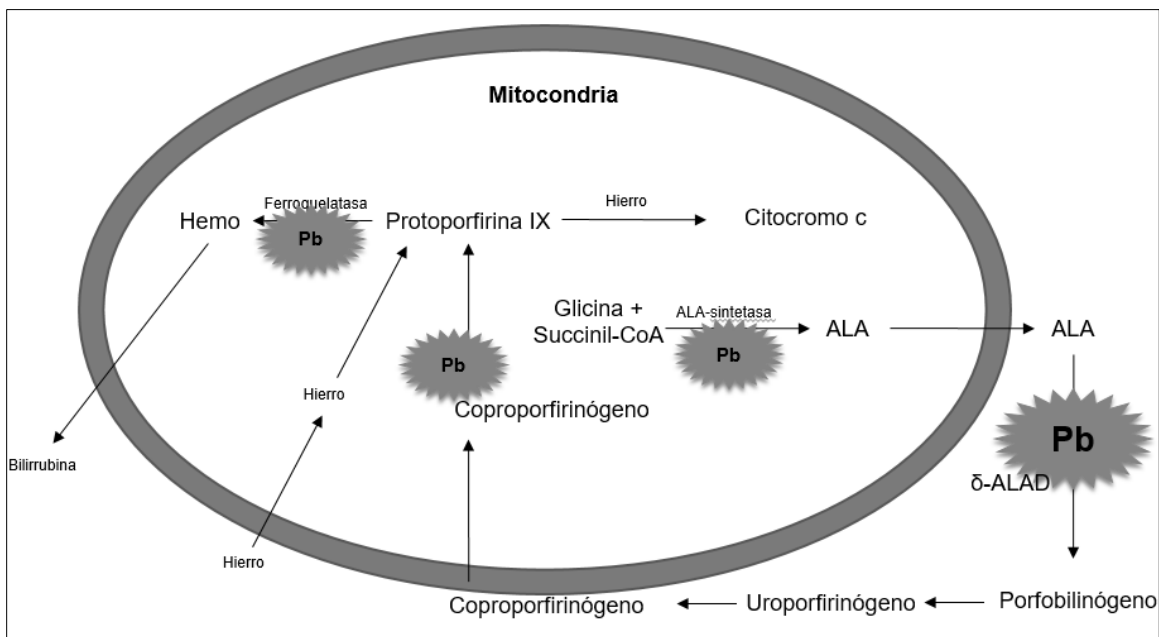


Figura 7. Sitios donde el Pb puede afectar la biosíntesis del grupo hemo, incluyendo la inhibición de δ -ALAD (Fuente: Tokar *et al.*, 2013).

La inhibición de δ -ALAD se estudió por primera vez hace más de 30 años como un medio para detectar la exposición al plomo del medio ambiente en los seres humanos y se ha convertido desde entonces en el bioensayo estándar para este propósito; y posteriormente se ha utilizado en las investigaciones con vida silvestre. El ensayo es altamente específico para el plomo, con otros metales es 10 000 veces menos activo en la causa de la inhibición. La inhibición de ALAD es

rápida, pero el efecto es reversible por sí solo y lentamente, los valores de ALAD regresan a su normalidad después de 4 meses (Walker *et al.*, 2006).

En estudios recientes con sapo gigante ha sido utilizado este biomarcador, para evidenciar la exposición a plomo en sitios contaminados (Arrieta *et al.*, 2000; Arrieta *et al.*, 2004; Fink y Salibián, 2005; Ilizaliturri-Hernández *et al.*, 2013).

2.4.2.4 Parámetros hematológicos

Los parámetros químicos y morfológicos de la sangre pueden proveer una amplia gama de biomarcadores, su uso ha incrementado debido a que la toma de muestra puede ser muy rápida y no destructiva (Hopkins y Rowe, 2010).

La hematología está dedicada a la evaluación del funcionamiento de la sangre, principalmente las células de la sangre y sus progenitores en la médula ósea. Los parámetros hematológicos pueden proporcionar evidencia de patología incluyendo anemias, deshidratación, procesos infecciosos, parasitismo o intoxicaciones (Fossi *et al.*, 1994). Estos parámetros a su vez pueden estar relacionados con la contaminación y sus efectos (Blaxhall, 1972).

Un gran número de células rojas inmaduras en la sangre circulante es indicativo de una pérdida de sangre, un incremento de la tasa de destrucción de eritrocitos maduros o linfocitos es indicativo de una respuesta a un proceso inflamatorio o infección. Debido a que el volumen de células empaquetadas es una función tanto de la cantidad y el tamaño de las células rojas de la sangre, se pueden utilizar para una estimación de la presencia de una anemia. Sin embargo, debe tomarse en cuenta, si el animal está deshidratado porque esto reduce el volumen de plasma y aumenta artificialmente el porcentaje de volumen de células empaquetadas. El tamaño de las células rojas (volumen corpuscular medio VCM) puede ser calculado por la división del volumen del paquete celular entre el conteo de eritrocitos. Un VCM alto es causado por un aumento de eritrocitos inmaduros y ocasionalmente es indicativo de una anemia causada por agentes infecciosos, pérdida interna de sangre, enfermedades autoinmunes o deficiencias de vitamina B₁₂ o ácido fólico. El contenido de hemoglobina por eritrocito (Hb corpuscular media -HCM-) es calculado por la división de la cantidad de hemoglobina por

mililitro entre el número de células rojas por mililitro. Las anemias hemolíticas y la deficiencia de hierro llevan a un aumento de HCM. La concentración de Hb corpuscular media (CHCM) es el rango del peso de la hemoglobina por el volumen del eritrocito. Una deficiencia de hierro, aumento de eritrocitos inmaduros (reticulocitosis) y metahemoglobina puede resultar en una disminución de los valores de CHCM (Fairbrother, 1994).

La cantidad de hemoglobina en la sangre puede ser cuantificada espectrofotométricamente por la conversión de hemoglobina a hemoxihemoglobina con hidróxido de amonio. El volumen de paquete celular o hematocrito, es el porcentaje de volumen total de sangre compuesto por glóbulos rojos. Algunos compuestos tóxicos pueden alterar el funcionamiento del sistema hematológico a través de la interferencia con la producción celular en la médula ósea o en la síntesis del grupo hemo, por una citotoxicidad directa a las células, o por lesiones en otros tejidos resultando en una pérdida de células de la sangre a través del secuestro en órganos (Fairbrother, 1994; Lajmanovich *et al.*, 2005).

2.4.2.5 Enzimas esterasas

El uso de la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) es particularmente útil porque representa el sitio de acción, y el grado de inhibición está relacionado con efectos tóxicos. La butirilcolinesterasa (BChE) es estudiada algunas veces en paralelo con AChE, sin embargo, su grado de inhibición no siempre está relacionado a un efecto tóxico. El modo de acción está bien establecido. Dos clases de compuestos, los organofosforados y carbamatos, inhiben la AChE o la BChE, en el caso de la primera; causando una acumulación de acetilcolina en las sinapsis nerviosas, interrumpiendo su función. Esta disrupción neurológica de la función nerviosa tiene efectos evidentes: temblores, disfunción motora, o hasta la muerte. El análisis de AChE y BChE es más sencillo, más rápido y más barato que el análisis químico para OFs y carbamatos (Amiard y Amiard-Triquet, 2013).

La BChE, conocida también como pseudo-colinesterasa o colinesterasa no específica, es una serina hidrolasa que cataliza la hidrólisis de esteres de colina. Está relacionada estructuralmente y funcionalmente con AChE. Diversas

investigaciones sugieren que BChE puede tener funciones en el sistema nervioso y puede participar en procesos patológicos de enfermedades neurodegenerativas (Darvesh *et al.*, 2003).

En vertebrados, la inhibición de AChE del cerebro ha sido usada para establecer la muerte causada por una exposición a plaguicidas OFs o carbamatos. Bajo condiciones ideales, la inhibición en un intervalo de 50-80% se puede tomar como prueba de la mortalidad por el plaguicida. En la práctica, a menudo se desconoce el grado de desnaturalización de los compuestos, y los controles para estos son difíciles de obtener. Además, la inhibición por carbamatos es fácilmente reversible y se puede perder rápidamente después de la muerte. Sin embargo, las mediciones de los OFs y carbamatos son aún más difíciles, ya que se metabolizan y eliminan con rapidez, de hecho, los análisis químicos para niveles de residuos no han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico de toxicidad por estos compuestos. La recolección de AChE y BChE sanguíneo es más rápida y más fácil que la del cerebro (Thompson, 1999). Además, la BChE ha sido utilizada como biomarcador de exposición a organofosforados (OFs) en anfibios que habitan en campos o cultivos de arroz o maíz (Attademo *et al.*, 2007; Lajmanovich *et al.*, 2008).

2.4.2.6 Factor de condición

Los índices de condición físicos han sido usados durante mucho tiempo en la acuicultura como un método simple para monitorear los cambios en la salud de los peces. El índice morfométrico más usado es el factor de condición, expresado como el peso (g)/ longitud (cm). Además, los índices de condición, son biomarcadores potencialmente atractivos debido a que son sencillos de implementar (Linder *et al.*, 2010a).

Los índices de condición pueden estar influenciados por factores ambientales (temperatura, temporada, pH) y el estado fisiológico del animal (nutrición). Por otra parte, los contaminantes pueden producir cambios rápidos y marcados en los índices de condición que se diferencian claramente de cualquier influencia estacional o ciclo de vida subyacente (Schlenk *et al.*, 2008).

El decremento del factor de condición es interpretado como un declive en las grasas del cuerpo o almacenamiento de glucógeno en el hígado. Así mismo, los contaminantes que causan un aumento en la tasa metabólica, un declive en la ingesta de energía o mejoran el metabolismo de las grasas, como parte de la acción tóxica, es probable que disminuyan el factor de condición. Comúnmente, una mayor reserva de energía en organismos les confiere una mayor resistencia sin alimento, mayor supervivencia y mejor rendimiento reproductivo en comparación a los individuos que presenten menores reservas (Brodeur *et al.*, 2011). La elevación de la tasa metabólica es una respuesta común a la exposición a contaminantes, y varios de estos pueden causar una menor ingesta de energía, ya sea, por el cambio de comportamiento alimenticio o por los efectos tóxicos en la absorción en el tracto gastrointestinal, lo cual también afecta el factor de condición. Alternativamente, el índice de condición puede confirmar la ausencia de efectos tóxicos o indicar la recuperación del ecosistema de la contaminación (Schlenk *et al.* 2008). En organismos, como peces, aves y anfibios se ha reportado la disminución del factor de condición después de la exposición a metales pesados, bifenilos policlorados y plaguicidas (Bervoets y Blust, 2003; Jaspers *et al.*, 2006; Brodeur *et al.*, 2011).

2.4.2.7 Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso de muerte celular natural, esencial para el desarrollo normal y la homeostasis de todos los organismos multicelulares. Este proceso es muy importante para eliminar cualquier daño, infección o neoplasia en la célula. Sin embargo, un proceso de apoptosis alterado puede conducir a efectos biológicos adversos (Sweet *et al.*, 1999). La apoptosis se distingue claramente de la necrosis, debido a que, en este último proceso la integridad de la membrana celular está severamente comprometida a un daño. Además, la necrosis ocurre en grupos de células o en tejidos. En contraste, la apoptosis ocurre a nivel de célula individual. Durante este proceso, una célula individual se somete a un proceso activo de muerte celular puesto en movimiento por un programa genético y que culmina en la

fragmentación del ADN y la formación de trozos de membranas empaquetadas llamadas cuerpos apoptóticos. La membrana plasmática de las células y cuerpos apoptóticos mantienen su integridad, previniendo la salida de material celular, y de ese modo, una respuesta inflamatoria y daño tisular local. Los cambios bioquímicos en la superficie de la membrana plasmática son reconocidos por macrófagos del tejido y otras células, encargándose de su eliminación *in vivo* (Kannan y Jain, 2000).

La apoptosis puede ser desencadenada por numerosos factores incluyendo las señales mediadas o la inducción por receptores, factores de crecimiento, fármacos, contaminantes, y en determinadas condiciones, el daño al ADN (Sweet *et al.*, 1999, Kannan y Jain, 2000). Además, tiene un papel importante en las funciones inmunológicas, tanto con la selección de células inmunes y la eliminación de células citotóxicas. Una alteración de la señalización de la apoptosis puede desencadenar enfermedades degenerativas, autoinmunidad y cáncer (Chopra y Schrenk, 2011).

Los contaminantes ambientales pueden influir en la proliferación celular y la apoptosis, los cuales pueden generar el desarrollo de lesiones pre neoplásicas o tumores. Se ha demostrado que algunos contaminantes como el DDT, dieldrín, heptacloro, dioxinas o BPCs pueden inhibir la apoptosis de células hepáticas. Por otra parte, otras investigaciones, han demostrado la inducción de apoptosis por contaminantes como dioxinas, dieldrín, hexaclorobenceno o metabolitos del DDT principalmente porque inducen la producción de especies reactivas de oxígeno que desencadenan toda una cascada de procesos hasta dar inicio a la apoptosis (Figura 8) (Shi *et al.*, 2009; Ludewig *et al.*, 2013).

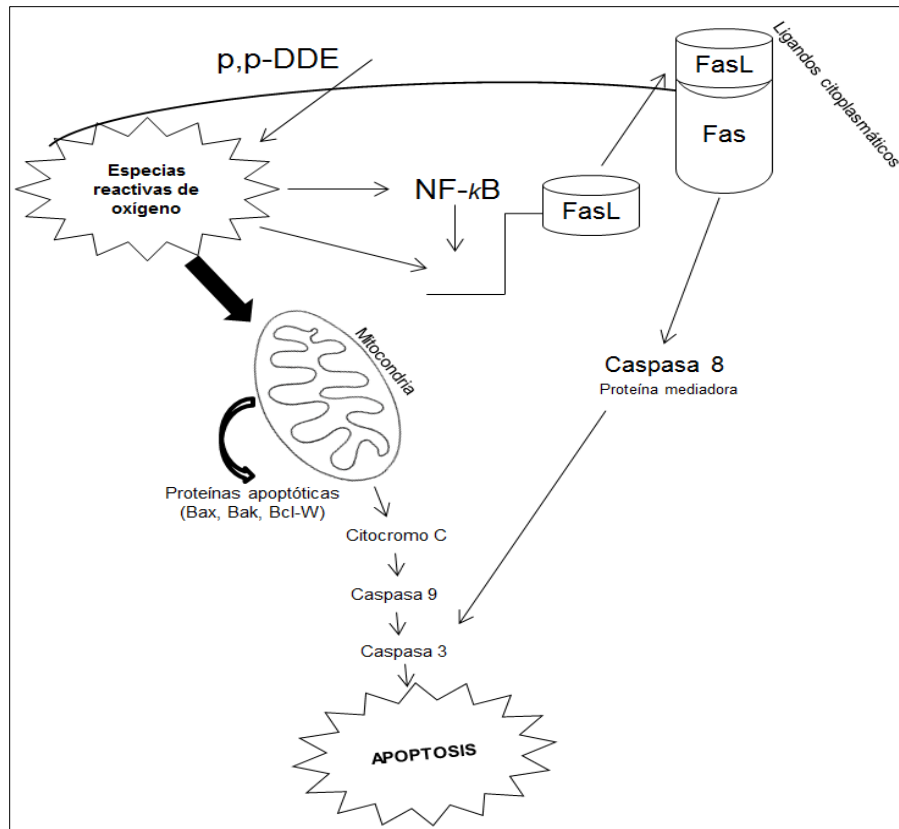


Figura 8. Ejemplo de inducción de apoptosis por p, p'-DDE (metabolito del DDT) (Shi *et al.*, 2009).

2.4.2.8 Perturbación endocrina

Los biomarcadores de perturbación endocrina han sido usados desde que se demostró que la reproducción de los peces era sensible a los contaminantes químicos. Los primeros compuestos de perturbación endocrina (EDCs por sus siglas en inglés) fueron aquellos que actuaban como estrógenos por su capacidad de imitar el estrógeno natural, estradiol, causando así una acción de feminización en los organismos. El término general de los EDCs ahora incluye moléculas de distinta variedad estructural y de origen (BPCs, por ejemplo) (Palmer *et al.*, 1998; Walker, 2009). Otro ejemplo, es el nonilfenol, usado como una sustancia intermediaria en la producción industrial de etoxilatos de nonilfenol, un grupo de surfactantes no iónicos usados en plásticos, pinturas de látex, detergentes industriales y de hogar, o en la industria textil y de papel. Los EDCs no sólo imitan las hormonas sexuales esteroideas estrogénicas sino también los androgénicos,

mediante la unión a receptores hormonales o influyendo en las vías de señalización hormonal; bloqueando o alterando la unión de las hormonas a estos receptores, resultando en la alteración de la producción de las hormonas naturales y modificando los niveles y la función de los receptores (Walker *et al.*, 2012).

En vertebrados no mamíferos, la producción de yema es iniciada en el hígado de las hembras adultas con la producción de vitelogenina. Una vez sintetizada y liberada por el hígado, la vitelogenina entra al sistema de circulación, siendo tomada por los ovocitos para ser convertida en la yema de huevo (lipovitelina y fosvitina). Estructuralmente, VTG es una fosfolipoproglicoproteína precursora de la yema de huevo, que tiene un peso molecular de 200 a 250 kDa (Linder *et al.*, 2010a).

El estrógeno es el principal estímulo para la producción de vitelogenina, induce la vitelogénesis en miembros de todas las clases de vertebrados no mamíferos. En cada uno de estos grupos, el tiempo de la producción de vitelogenina en hembras adultas corresponde al periodo de niveles elevados de estrógenos. La vitelogénesis puede ser inducida en machos y en hembras no vitelogénicas por la administración de estrógenos (Figura 9). La producción de vitelogenina en respuesta a compuestos estrógenicos es rápida, sensible y dependiente de la dosis (Wallace y Bergink, 1974; Palmer *et al.*, 1998). Los estrógenos miméticos ejercen una acción feminizante, que preocupa más en los individuos macho, debido a que induce la VTG en estos, y por consecuencia hay presencia de ovocitos y oviductos en los testículos, disminución de la fecundidad, modificación de la proporción de sexos, y la reducción de los caracteres sexuales secundarios en el macho. Cuando se detecta la presencia de VTG en sangre de machos puede haber un efecto endocrino en estos, así mismo, cuando en las hembras es detectada una disminución en los valores de VTG también sugieren una perturbación endocrina. Es por esto que la VTG se considera un biomarcador de exposición a xenoestrogenos, que producen una perturbación endocrina (Linder *et al.*, 2010; Arukwe y Goksøyr, 2003; Roméo y Giambérini, 2013).

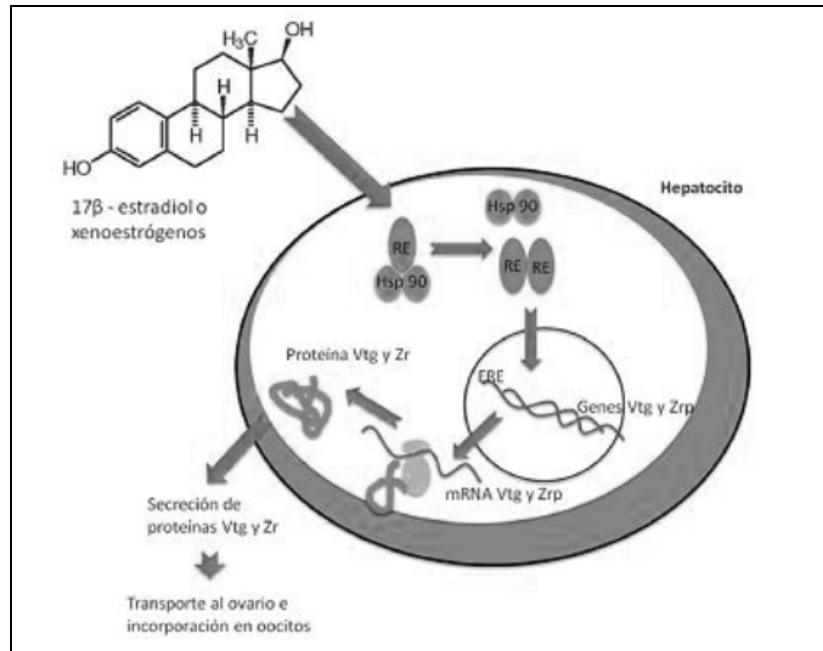


Figura 9. Inducción de la producción y secreción de proteína VTG mediante compuesto estrogénicos (Arukwe y Goksoyr, 2003; adaptado por Aranzazu-Taborda *et al.* 2009).

Se estima que VTG es la única proteína que contiene fósforo en la sangre de los vertebrados ovíparos, y esto, junto con el alto grado de fosforilación permite la cuantificación indirecta de VTG (Hallgren *et al.*, 2009).

En cuanto a estudios, en anfibios macho de la especie *Xenopus laevis*, se ha reportado el incremento de las concentraciones de VTG plasmática al estar expuestos a compuestos organoclorados (dieldrín, toxafeno y DDT) en condiciones controladas (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1998). Otros autores señalan que dentro de los principales compuestos que causan perturbación endocrina, en anfibios y reptiles, se encuentran los BPC's, plaguicidas organoclorados y algunos metales pesados (Sparling *et al.*, 2010).

METODOLOGÍA

3.1 Selección de biomarcadores no destructivos (sangre completa o plasma)

Con base a una revisión bibliográfica realizada de efectos presentados en organismos vertebrados como *R. marina* expuestos a diferentes contaminantes se seleccionaron los siguientes biomarcadores:

- Glutación s-transferasa (GST). Aumento de la enzima GST (fase II) por la presencia de contaminantes.
- Peroxidación lipídica (Medida como MDA). Presencia del producto MDA cuando se induce peroxidación de lípidos ocasionado por la exposición a contaminantes.
- ALAD (inhibición). Sensible a la contaminación por Pb
- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM): parámetro hematológico sensible a los cambios en la salud general de los organismos producidos por contaminantes.
- Butirilcolinesterasa (BChE). Sensible a la presencia de plaguicidas organofosforados.
- Factor de condición. Biomarcador considerado como metabólico y de uso de energía.
- Apoptosis. Sensible a los cambios producidos por contaminantes como organoclorados, que podrían causar un desequilibrio en este proceso.
- Determinación de la presencia de vitelogenina (VTG). Aumento o disminución con la presencia de perturbadores endocrinos.

3.2 Identificación del sitio y estaciones de muestreo

Se seleccionaron dos estaciones de muestreo divididas en dos sitios de muestreo cada una de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos: de la zona baja o industrial el Ejido Cangrejera (municipio Coatzacoalcos) y Estero del Pantano (municipio de Cosoleacaque), de la zona alta o rural el ejido Limonta (municipio de Minatitlán) y la localidad de San Carlos aledaña al Río Uxpanapa (Figura 10).

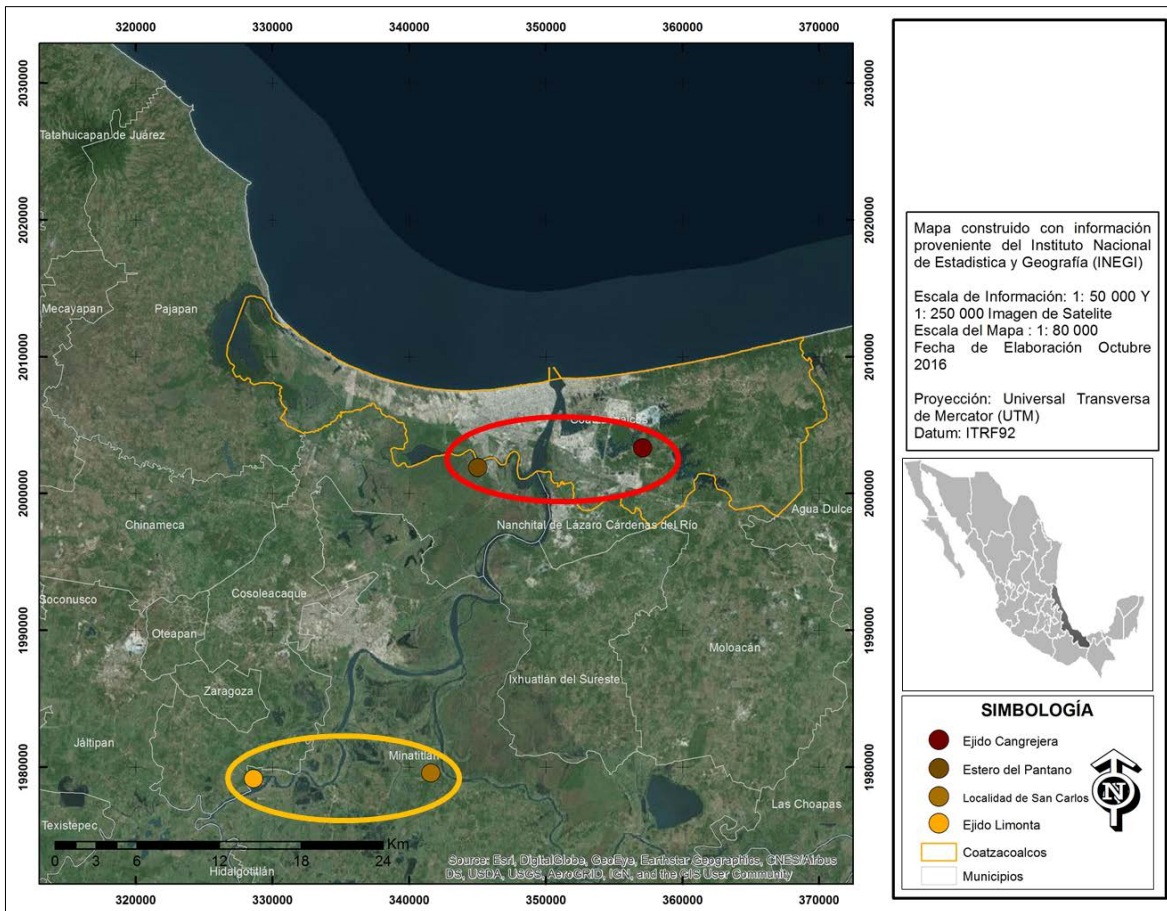


Figura 10. Sitios de muestreo de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, Zona baja o industrial (rojo) y zona alta o rural (amarillo).

3.2.1 Descripción de las estaciones de muestreo

La elección de estas estaciones de muestreo se basó en el grado de contaminación registrado en el lugar. La zona baja o industrial (Figura 10) se conformó por los siguientes sitios:

- Ejido Cangrejera: sitio aledaño a los complejos petroquímicos de Pajaritos y Cangrejera, donde son producidos diversos derivados de compuestos de cloro y etileno. Además, en esta zona ya se ha evidenciado la presencia de COPs tanto en matrices ambientales como en biológicas, así como los efectos que estos podrían estar causando en organismos terrestres (Stringer *et al.*, 2001; Espinosa-Reyes *et al.*, 2010b; González-Mille *et al.*, 2010).

- Estero del Pantano: sitio que se encuentra en las orillas del Río Calzadas. De acuerdo a Ilizaliturri et al. (2013) el río recibe descargas de aguas residuales e industriales. Además, se ha evidenciado la presencia de COPs y Pb, así como los efectos de estos compuestos a organismos terrestres y acuáticos (Pelallo-Martínez et al., 2011; González-Mille et al., 2013; Ilizaliturri-Hernández et al., 2013).

Mientras que la zona alta o rural (Figura 10) se conformó por los siguientes sitios:

- Ejido Limonta: Ubicado río arriba del Río Coatzacoalcos, en el municipio de Hidalgotitlán. Presenta escasa urbanización y ecosistemas aún bien conservados.
- Localidad de San Carlos: sitio aledaño al Río Uxpana, río arriba y que desemboca en el Río Coatzacoalcos. Tiene ecosistemas bien preservados.

Los sitios agrícolas seleccionados se caracterizan por tener ecosistemas semi-preservedos, y algunos impactados por la producción agrícola, siendo zonas susceptibles donde se pueden utilizar plaguicidas organofosforados, organoclorados o carbamatos para el control de plagas o vectores.

Como referencia se seleccionaron sapos gigantes mantenidos en laboratorio por un año con su respectiva alimentación, recolectados en Cd. Valles, San Luis Potosí. En el laboratorio estos organismos no se expusieron a ningún contaminante.

3.3 Recolección de sapo gigante y toma de muestras

Se obtuvo el permiso de colecta científica con número de oficio: SGPA/DGVS/09731/15 para captura de sapo gigante en la región de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos por parte de la SEMARNAT.

Para la captura de los sapos, esta se hizo a mano en transectos de los sitios por la tarde y noche. Se recolectaron de 4 a 10 sapos por sitio de muestreo. Se tomaron como criterios de inclusión las siguientes características: estado adulto, del sexo macho y hembra (en proporción), y con características similares entre sí.

Los sapos se trasladaron al Laboratorio de Química de la Universidad Veracruzana Campus Coatzacoalcos, donde se les tomó el peso y la longitud hocico-cloaca. Posteriormente se procedió a tomar la muestra sanguínea (3 a 5 mL) con jeringas heparinizadas por cada uno (siguiendo la guías y normas establecidas por la Comisión para el Uso y Cuidado de Animales Herpetológicos - HACC, por sus siglas en inglés-). Se tomaron dos partes de las muestras de sangre completa antes de centrifugar. La primera se fijó con formaldehído para su posterior análisis de contenido de ADN en el citómetro de flujo. Después de una centrifugación a 3500 rpm de la sangre completa restante, se tomó el plasma y junto con la segunda parte de sangre completa se almacenó en criotubos en nitrógeno líquido (-196°C) para su posterior análisis de enzimas (esterasas, ALAD, MDA, GST y VTG). Para los sapos de referencia se procedió de la misma manera para la toma de muestras.

3.4 Determinación de biomarcadores

3.4.1 Glutación S-Transferasa (GST)

El método para la determinación de GST en plasma de los sapos está basado en la metodología propuesta por Habig *et al.* (1974) modificada por Habdous *et al.* (2002) para ser usada en sangre. El principio del método consiste en que la enzima GST que se encuentra en el plasma, combina el GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) (conjugación), este conjugado aumenta su absorbancia a 340 nm. Una unidad de actividad de GST se define como la cantidad de enzima que sintetiza 1 μ M del producto por minuto. Para anfibios anuro el método fue modificado por Attademo *et al.* (2007).

La técnica se estandarizó bajo las condiciones del laboratorio donde se determinaron los biomarcadores (ANEXO B). Posteriormente para la determinación de GST en plasma de sapos gigantes de referencia y del Río Coatzacoalcos, se utilizaron 50 μ L de plasma diluido 1:50 con buffer fosfato. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 50 μ L de plasma, se le adicionaron 100 μ L de CDNB 15 mM y 100 μ L de GSH reducido 3 mM. El espectrofotómetro

con lector de microplacas se programó para medir cada 10 segundos por 1 minuto la reacción, después cada minuto hasta completar 10 minutos. Se procedió a leer a una longitud de onda de 340 nm. Para el blanco analítico se sustituyó la muestra por buffer fosfato, y para el blanco de la muestra el sustrato se sustituyó por buffer fosfato.

El incremento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de GST. Para calcular la actividad de GST se utilizó la Ecuación 1.

Ecuación 1. Fórmula para obtener la actividad de GST en plasma de sapo gigante

$$\text{Cálculo de cambio en absorbancia } \left(\frac{\Delta A_{340}}{\text{minuto}} \right) = \frac{A_{340} (\text{lectura final}) - A_{340} (\text{lectura inicial})}{\text{tiempo de reacción (min.)}}$$

$$\text{Actividad GST } \left(\frac{\frac{\mu\text{M}}{\text{mL}}}{\text{min}} \right) = \frac{\Delta A_{340} / \text{min} \times V (\text{mL}) \times \text{FD}}{\varepsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{ez}} (\text{mL})}$$

Donde V= volumen de la reacción, FD= factor de dilución, ε_{mM} = factor de extinción y V_{ez} = volumen de la muestra enzimática.

3.4.2 Peroxidación lipídica medida como malondialdehído (MDA)

Las especies de radicales libres involucrados en el proceso de peroxidación lipídica desaparecen a causa de su corta vida, y sólo las sustancias estables permanecen. Incluso tales sustancias estables son susceptibles de descomponerse en cierta medida. En consecuencia, el principio del procedimiento, para determinar SRATB, es hacer reaccionar estas sustancias estables con un reactivo adecuado después de la eliminación de otras sustancias reactivas. El ácido tiobarbitúrico (ATB) es un reactivo sensible para la detección de peróxidos de lípidos, pero su especificidad es muy baja cuando se encuentran otras sustancias reactivas. Por lo tanto, para la eliminación de estas sustancias en el proceso tales como la glucosa y aldehídos solubles en agua, los lípidos se pueden precipitar junto con las proteínas mediante el uso de un sistema de ácido fosfórico

y butilhidroxitolueno (BHT). Después de la reacción con ATB a 60°C, el producto se mide por espectrofotometría UV-Visible a 532 nm.

Para la cuantificación de MDA se utilizó el kit NWLSS™ Malondialdehyde Assay de la empresa Northwest Life Science Specialities. Se siguió el protocolo de este kit. En un tubo de ensaye, se añadieron 10 µL de BHT, 250 µL de plasma (por duplicado) o estándar de MDA (para el caso de la curva de calibración), 250 µL de ácido fosfórico y 250 µL de TBA, posteriormente se mezclaron en vórtex durante 5 a 10 segundos, enseguida se incubaron a 60°C por 60 minutos. Una vez completado el tiempo, la mezcla se centrifugó a 10 000 g x 3 minutos. El sobrenadante fue transferido a un pozo de microplaca de 24 pocillos y se realizó la lectura inmediatamente a 532 nm. El cálculo de MDA se realizó mediante extrapolación con una curva de calibración de MDA que el propio kit contenía.

3.4.3 Butirilcolinesterasa (BChE)

La determinación de esterasas en plasma se basó en el método propuesto por Ellman *et al.* (1961) modificado por Attademo *et al.* (2007) para anfibios y por Gagné (2014) para microplaca de 96 pocillos. El fundamento del método consiste en la medición de la reacción enzimática, donde a partir de la butirilcolina, la BChE libera tiocolina, esta última reacciona con el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo cromógeno), produciendo un color amarillo el cual puede ser medido espectrofotométricamente a 412 nm.

La técnica se estandarizó bajo las condiciones del laboratorio donde se determinaron los biomarcadores (ANEXO B). Para la determinación de la actividad de BChE 10 µL de suero se diluyeron en 990 µL (1:100) de buffer Tris HCl 0.1 M. Enseguida 50 µL del plasma diluido se añadieron a la microplaca, posteriormente se adicionaron 100 µL de DTNB 5 mM y 100 µL de yoduro de butirilcolina 1 mM, se mezclaron e inmediatamente se midieron en un espectrofotómetro UV-Visible con lector de microplacas a 412 nm en intervalos 10 segundos por 1 minuto, y posteriormente en intervalos de 1 minuto hasta completar 10 min. Para la preparación del blanco analítico, se sustituyó la muestra sanguínea por 50 µL de

buffer Tris HCl 0.1 M a pH 7.6, mientras que para el blanco de la muestra solo se sustituyó el sustrato por buffer, y el procedimiento para la reacción fue similar. La actividad de BChE se calculó con la ecuación 2.

Ecuación 2. Fórmula para calcular la actividad de BChE en plasma de sapo gigante

$$\text{Actividad BChE} = \Delta A / \text{min} \times \frac{1}{13600} \times Vt \times \frac{1000}{Vm} \times FD$$

Donde, $\Delta A/\text{min}$ = cambio de absorbancia por minuto, 1= ancho de la celdilla, 13.6= coeficiente de extinción molar, Vt = volumen total de la determinación, Vm = volumen de muestra utilizado, 1000= factor de conversión, y FD = factor de dilución (600).

3.4.4 Actividad δ -ALAD

El principio del método de determinación se basa en la incubación de la enzima δ -ALAD con un exceso de ácido aminolevulínico (ALA). El porfobilinógeno formado es mezclado con el reactivo de Erlich's y el color conseguido se mide fotométricamente contra un blanco. La cantidad de porfobilinógeno producido es indicativa de la actividad δ -ALAD (Berlin y Schaller, 1974). La determinación de δ -ALAD se basó en el método anteriormente mencionado y de las modificaciones realizadas por Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013).

Antes de realizar el ensayo, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente tres alícuotas por sapo (muestra, repetición y un blanco) de 50 μL de sangre se mezclaron con 1.45 mL de agua desionizada en tubos de ensaye libres de suciedad y adecuados para centrifugación. La sangre diluida se homogenizó por 15 segundos con un agitador tipo vórtex para asegurar su completa hemólisis. Enseguida, las muestras se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos. Terminado el tiempo, se añadió 1 mL de buffer sustrato (ALA 10 mM y pH 6.4) a todas las muestras (para el caso del blanco solo se agregó además 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%) y se homogenizaron con vórtex. Los tubos se incubaron a 38°C por 60 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 1 mL de TCA 10%, se homogenizaron los tubos con vórtex y se centrifugaron por 10 minutos a 2000 rpm.

Un mililitro del sobrenadante se mezcló con 1 mL de la solución de Erlich's y se dejó reposar por 10 minutos. Finalmente, en el espectrofotómetro de UV-Visible se realizó la lectura de las absorbancias de las muestras contra el blanco a 555 nm.

Se determinó el hematocrito de la sangre de los sapos para calcular la actividad δ -ALAD. Para esto, la sangre se colocó en tubos capilares (heparinizados de 50 μ L) durante unas horas en posición vertical, para que el paquete globular sedimentara. La medición se realizó con una carta estándar de hematocrito. Las muestras se midieron por duplicado, y se reportó la media de los dos registros.

Para el cálculo de la actividad δ -ALAD, las unidades se expresaron en μ mol x min x L de hematíes (ER), con la ecuación 3.

Ecuación 3. Fórmula para calcular la actividad δ -ALAD en sangre completa de sapo gigante

$$\text{Actividad } \delta - \text{ALAD} = \frac{\text{Abs} \times 100 \times D \times F}{\text{Ht} \times 60 \times 0.062}$$

Donde Abs= absorbancia de la muestra, F= 2 (factor de conversión de porfobilinógeno a δ -ALA), D= 35 (factor de dilución), Ht= hematocrito (%), 60= tiempo de incubación (minutos), y 0.062= coeficiente de extinción (L/ μ mol x cm).

3.4.5 Determinación de Hb y cálculo de CHCM

El contenido de hemoglobina (g/dL) fue medido usando el kit HemoCue Hb 201+. La determinación fue realizada siguiendo el protocolo del aparato. Una pequeña muestra de sangre fue vertida por capilaridad a una microcubeta del aparato, la cual, contenía reactivos secos para reaccionar con la Hb de la sangre y ser determinada fotométricamente en el analizador portátil HemoCue Hb 201+.

La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fue calculada bajo la ecuación 4.

Ecuación 4. Fórmula para calcular la concentración de hemoglobina corpuscular media

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) \times 100}{\text{HT} (\%)}$$

3.4.6 Cálculo del factor de condición (FC)

Para el cálculo del FC se tomó la longitud hocico-cloaca (SVL) de los sapos con un calibrador vernier (mm) y su peso (g) con una balanza electrónica. Posteriormente se utilizó la ecuación 5.

Ecuación 5. Fórmula para obtener el factor de condición

$$FC = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{SVL (mm)}} \times 100$$

3.4.7 Porcentaje de apoptosis por citometría de flujo

Para el análisis del porcentaje de apoptosis en eritrocitos de sapo gigante, primeramente, siguiendo el método propuesto por Gagné (2014) una parte de la sangre completa recolectada se centrifugó a 3500 rpm, se desechó el plasma y el paquete eritrocitario se lavó dos veces con solución buffer salino pH 7.4 (PBS). Enseguida a 250 µL del paquete eritrocitario se le añadieron 750 µL de solución fijadora de células (formaldehído al 3% en PBS), se agitó lentamente y se almaceno hasta su posterior análisis.

El fundamento de la técnica consiste en que el IP se una al ADN, tiñe las células en proporción con su contenido de ADN; las células con contenido diploide normal de ADN aparecerán en la fase G₀/G₁ del ciclo celular, las células que sintetizan ADN activamente tienen un contenido de ADN mayor y se asignarán a la fase S, mientras que las células con contenido 4N (diploide) de ADN estarán en G₂ o mitosis (G₂/M), por último las células en procesos de muerte celular estarán en la categoría de apoptosis (Pérez-Maldonado *et al.*, 2004).

Para el análisis por citometría de flujo se prosiguió con el método propuesto por Pérez-Maldonado *et al.* (2004), las muestras previamente fijadas, se diluyeron con formaldehído 3% para obtener de 10 000 a 10 000 células y entrar en el rango que el citómetro de flujo requería. Posteriormente, se realizó un lavado 1:1 del paquete eritrocitario con PBS y se centrifugaron las muestras a 1500 rpm por 5 minutos. Enseguida se desechó el sobrenadante, y al botón celular se le añadió 1 mL de IP (preparado con ARNasa) en agitación constante en vórtex por 1 minuto. Se incubaron las muestras por 20 minutos a 4°C en la oscuridad, y se realizó la

lectura inmediatamente en el citómetro de flujo. Finalmente se obtuvieron los resultados en porcentajes e intensidad de fluorescencia.

3.4.8 Cuantificación de la proteína VTG como fósforo proteico lábil álcali (ALP)

Este método se basó en la metodología descrita por Martin y Doty (1949) modificada por Wallace y Jared (1969) y Hallgreen *et al.* (2009). Consiste en precipitar, purificar y obtener el fósforo de origen proteico, mediante una digestión álcali para eliminar la materia orgánica. Después de esta digestión la concentración de fósforo es determinada colorimétricamente mediante la técnica de Fiske y Subbarow (1925).

Primero se procedió a extraer la fracción fósforo ALP del plasma. Para esto se mezclaron 50 μ L de plasma y 500 μ L de ácido tricloracético (TCA) al 20%. Esta mezcla se centrifugó a 4500 rpm durante siete minutos, y se desechó el sobrenadante. Enseguida se agregaron 500 μ L de TCA al precipitado y de nuevo se centrifugó a 4500 rpm en el mismo lapso de tiempo, y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 3 mL de etanol en absoluto, y se colocaron en vórtex, para romper los grumos o sólidos. Posteriormente, se incubaron las muestras en baño María a 60°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron (4500 rpm/7 minutos) y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 2 mL de solución etanol-éter-cloroformo, y se colocaron en vórtex, para romper grumos y sólidos. Hecho esto, se centrifugó (4500 rpm/7 min) y se desecharon el sobrenadante. Se agregaron 3 mL de acetona y se colocaron nuevamente vórtex para eliminar grumos o sólidos. Enseguida, se centrifugará (4500 rpm/7 min) y se desechará el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 2 mL de éter y se colocó en vórtex para romper grumos o sólidos, esta mezcla se dejó en una campana de extracción para evaporarse toda una noche. Después se agregaron 500 μ L de NaOH (2N) y se colocaron las muestras en vórtex, y enseguida en baño seco a 100°C 20 minutos. Pasado el lapso de tiempo, se dejó enfriar, y se agregaron 500 μ L de HCl (2N), se mezclaron y se centrifugó, y el sobrenadante se empleó para la determinación de fósforo (ALP).

En una placa de 24 pocillos se colocó en una columna el blanco y una curva de calibración de 0 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm) de fósforo. Para las muestras se tomaron 500 μL sobrenadante. Enseguida se adicionaron 100 μL de solución de molibdato ácido y 25 μL de reductor de Fiske y SubbaRow (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 0.8% de sulfito de sodio y bisulfito de sodio) a todos los pozos y se mezclaron por 35 segundos. Se esperó 10 minutos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Visible con lector de microplacas a 630 nm. La absorbancia de cada muestra se extrapoló con la curva de calibración para así obtener la concentración de ALP.

3.5 Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante la prueba Kruskal Wallis ($p > 0.05$) y pruebas post-hoc para observar las diferencias entre los rangos cada sitio evaluado. Posteriormente se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los biomarcadores para observar sus. Todos estos análisis se realizaron bajo el programa STATISTICA 10® y Prisma GraphPad 6®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Actividad Glutación S-transferasa (GST)

Los niveles de actividad de la enzima GST por zona se presentan en la Figura 11. La GST presentó un aumento significativo de su actividad enzimática en los sapos residentes de Coatzacoalcos. Este aumento fue de 1.4 veces con respecto a los de laboratorio. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (KW-H₂, ₃₇=13.64, $p < 0.05$) entre los organismos de Coatzacoalcos y con los de referencia (laboratorio).

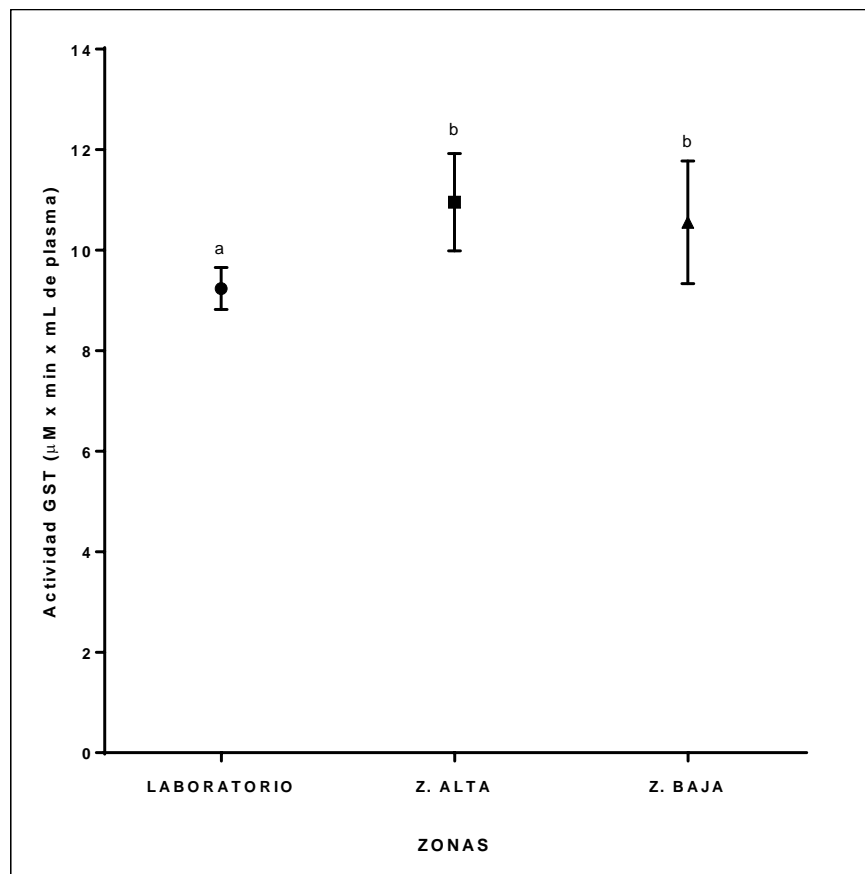


Figura 11. Actividad GST en plasma de sapo gigante. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p < 0.05$. (Laboratorio $n=7$, Alta o Rural $n=19$, Baja o Industrial $n=11$) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

El patrón de aumento de la actividad enzimática de GST concuerda con estudios en anfibios adultos de la especie *R. schneideri* expuestos a plaguicidas organofosforados en campos agrícolas en comparación a los residentes a un sitio prístino (Attademo *et al.*, 2007). En otros estudios, experimentales, se demostró

que conforme aumenta la concentración de plaguicidas como el endosulfan, diazinon y 2-4-D, estos elevan significativamente la actividad de GST en diferentes órganos y suero de anfibios adultos (*R. regularis* y *R. arenarum*) expuestos (Ezemonye y Tongo, 2010; Lajmanovich *et al.*, 2015). Por otra parte, en otros vertebrados como peces que habitaban en sitios contaminados por HAPs, BPCs, DDT, lindano y metales pesados, se encontró un aumento de la actividad enzimática de GST comparado con sitios no contaminados (Willett *et al.*, 1997; Armknecht *et al.* 1998; Luk'ianov y Ireikina, 2011). Los autores de las investigaciones anteriormente señaladas han atribuido el incremento de GST a una posible detoxificación de los contaminantes por parte de la enzima. Ciertamente, GST es una de las enzimas que conforman la segunda fase de biotransformación de xenobióticos, conjugando estos compuestos, adicionando un grupo glutatión reducido (GSH) para hacerlos muchos más polares (grupo tioéter) y por ende puedan ser eliminados mediante vía biliar o urinaria del organismo (Parkinson *et al.*, 2013). Por lo cual, el incremento de GST encontrado en la presente investigación puede estar relacionado con la presencia de los contaminantes como compuestos orgánicos persistentes (BPCs, PBDEs, plaguicidas organoclorados) registrados en algunos de estos sitios (Espinosa-Reyes *et al.*, 2010b; Espinosa-Reyes *et al.*, 2012; Espinosa-Reyes *et al.*, 2013; González-Mille *et al.*, 2013, Ruiz-Fernández *et al.*, 2016). Cabe aclarar, que la mayoría de las investigaciones anteriores evidencian una mayor presencia de COPs y HAPs en la zona industrial. Aunado a esto, el análisis de comparación post hoc de la presente investigación no mostró diferencia significativa de la actividad de GST entre los sapos de la zona baja y la zona alta. Por lo tanto, se podría asimilar que en la zona alta pueden existir compuestos similares a los de la zona baja que estén propiciando una mayor actividad de GST en plasma de los organismos residentes de esta zona, y por ende, con esto se confirmaría la utilidad de GST como biomarcador de exposición en sapo gigante.

4.2 Peroxidación lipídica

En cuanto a la peroxidación lipídica reportada como MDA se encontró una menor presencia de este compuesto (2.3 veces menor) en los organismos de la zona alta, el cual fue estadísticamente significativo con respecto al de laboratorio (KW-H_{2,37}=9.74, p<0.05). Los resultados se muestran en la Figura 12. El análisis de comparación post hoc mostró también una diferencia significativa entre la presencia de MDA, donde se obtuvo un incremento de 1.8 veces de MDA en los organismos residentes de la zona baja en comparación con los de la zona alta.

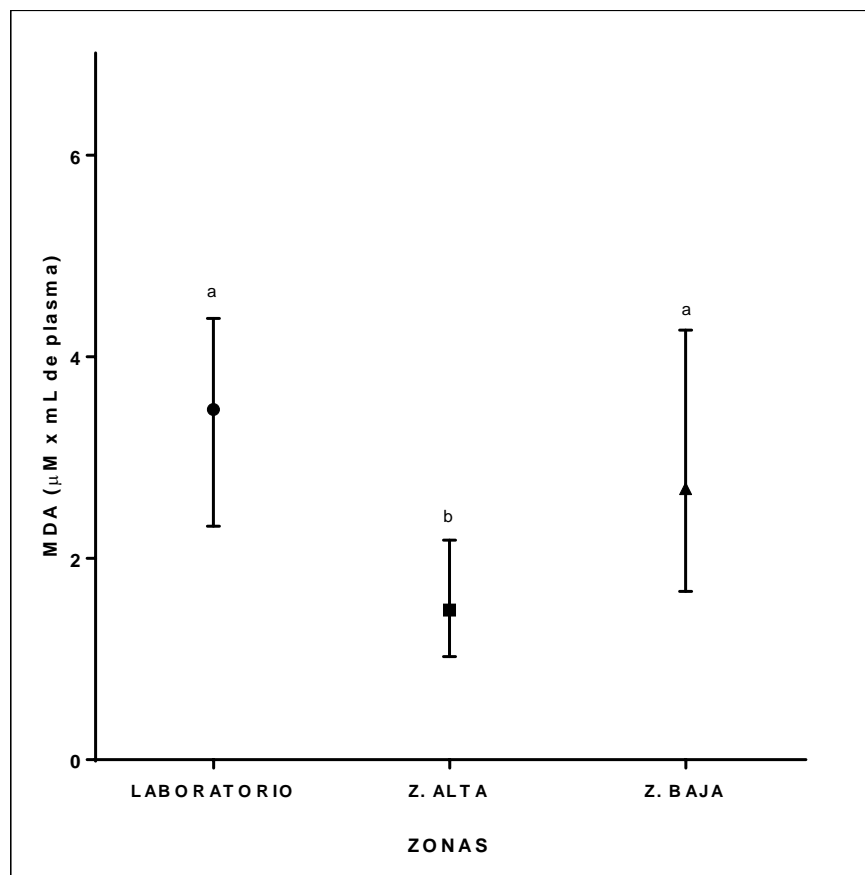


Figura 12. Presencia de MDA en plasma de *R. marina*. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, p<0.05. (Laboratorio n=7, Z. Alta= 19. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

MDA es el producto de la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados que se encuentran en las membranas celulares. MDA ha sido utilizado comúnmente como un biomarcador de estrés oxidativo (Repetto *et al.*, 2012). Algunos xenobióticos pueden interactuar con las membranas celulares y formar

radicales libres, generando una cadena que puede desbalancear el sistema redox en el organismo y tener consecuencias severas, como la inducción de la apoptosis o daño al ADN en las células (De Zwart *et al.* 1999; Marnett, 1999; Hampel *et al.* 2016).

Con la premisa de que se ha registrado una mayor concentración de contaminantes en la zona industrial (metales pesados, compuestos organoclorados, HAPs, etc.), en matrices ambientales (suelo y sedimento) hasta en tejido de sapo gigante (Espinosa-Reyes, *et al.*, 2012; González-Mille *et al.*, 2013, Ilizaliturri-Hernández, *et al.*, 2013), se puede asumir que la presencia de MDA en los sapos residentes de la zona industrial puede estar relacionado a una posible inducción de peroxidación lipídica por los contaminantes, debido al incremento de especies reactivas de oxígeno y radicales libres que estos ocasionan al estar en contacto con las membranas celulares (Repetto *et al.*, 2012).

Wolmarans (2015) encontró la presencia de MDA en tejidos de anfibios terrestres y acuáticos (sapos y ranas) en un río de Sudáfrica, lo cual se le atribuyó a la exposición a organoclorados. Más aún, en este mismo estudio, el incremento del estrés oxidativo y por consiguiente la peroxidación lipídica se correlacionó con la bioacumulación de plaguicidas como aldrín, HCH, DDT y clordano en el hígado de los anfibios. Otras investigaciones llevadas a cabo a nivel laboratorio han evidenciado que la exposición a compuestos similares a los registrados en sedimento y suelo de las zonas industriales de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos tales como derivados de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Burýsková *et al.*, 2006), compuestos de aceite crudo (Eriyamremu *et al.*, 2008), elutriados de sedimento contaminado con Pb, Hg y Cd (Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2016), metales pesados principalmente Pb y Cd (Wang y Jia, 2009; Ezemonye y Enuneku, 2011; Zhang *et al.*, 2012) organofosforados (Kanter y Celik, 2012; Lajmanovich *et al.*, 2015) e incluso piretroides (Munisway *et al.*, 2012) aumentan la presencia de MDA en tejidos o en plasma de larvas, renacuajos o en estado adulto de sapos, ranas o ajolote, debido a la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres o especies reactivas de oxígeno que estos contaminantes generan.

Por otra parte; se podría explicar una mayor presencia de MDA detectada en los sapos de laboratorio comparado con los de la zona alta, y a la similitud con los sapos residentes de la zona baja con la alimentación de los organismos. Se ha evidenciado que una deficiencia de vitaminas (por ej. Vitamina E) o la falta de una nutrición adecuada puede hacer susceptibles a los organismos de presentar una peroxidación lipídica, debido a que se produce un desbalance en los sistemas antioxidantes (Mihara *et al.*, 1980). Esto podría estar pasando en los sapos de laboratorio, los cuales tuvieron una dieta muy diferente (un solo tipo de alimento) comparado al de los organismos silvestres. Sin embargo, Repetto *et al.* (2012) mencionan que la única manera de diferenciar si un estatus nutricional influye en la peroxidación de lípidos, es midiendo además de MDA, la capacidad antioxidante en la sangre de los organismos, lo cual hizo falta en la presente investigación. Así mismo, Grotto *et al.* (2009) y Repetto *et al.* (2012) recomiendan utilizar más de dos métodos para detectar la presencia de MDA en cualquier muestra biológica. Por lo cual, es evidente que hizo falta una estandarización de otros métodos para determinar la peroxidación lipídica en plasma de sapo gigante. Además en futuras investigaciones se podría complementar este biomarcador con la determinación de sistemas antioxidantes (catalasa -CAT-, superóxido dismutasa -SOD-, capacidad total antioxidante) para obtener una mayor información en cuanto al estrés oxidativo en organismos inducido por contaminantes.

4.3 Ácido 5-aminolevulínico dehidratasa (δ -ALAD)

Los resultados de δ -ALAD mostraron una menor actividad enzimática en los sapos residentes de las zonas muestreadas en Coatzacoalcos comparado con los sapos de laboratorio. Como se muestra en la Figura 13, los resultados fueron estadísticamente significativos ($KW-H_{2,37}=15.95$, $p<0.001$). Comparando con el control, se encontró un porcentaje de inhibición de δ -ALAD de un 60 a 65% en los anfibios de Coatzacoalcos.

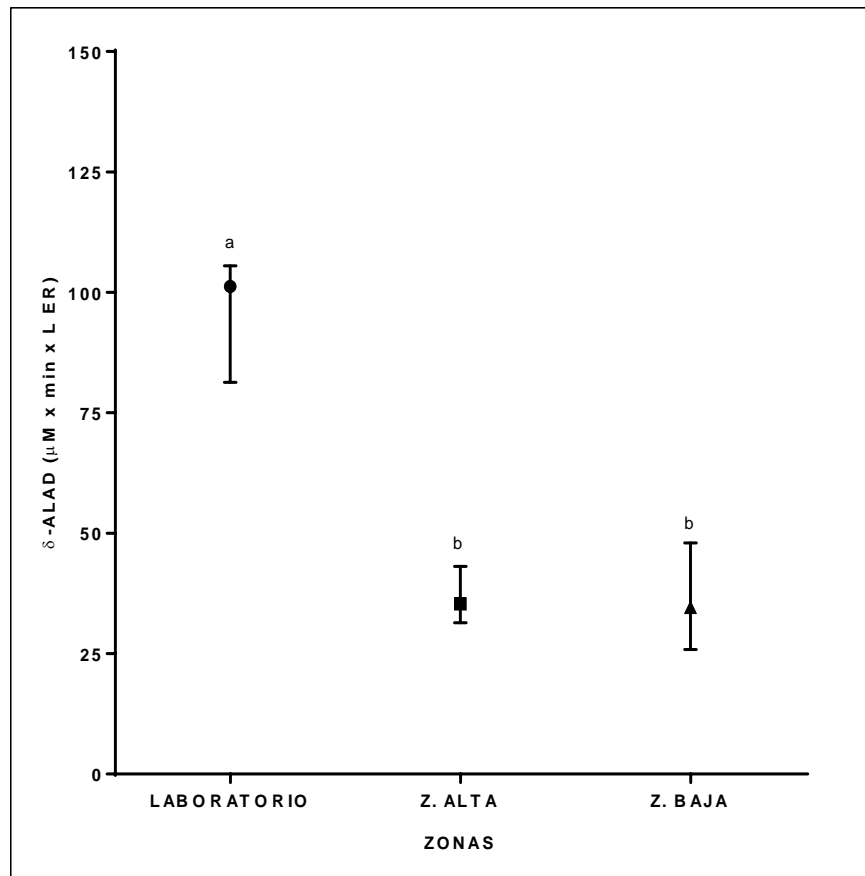


Figura 13. Actividad δ -ALAD en sangre completa de sapo gigante. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p < 0.001$. (Laboratorio $n=7$, Z. Alta= 19. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

Arrieta *et al.* (2000) y Arrieta *et al.* (2004) demostraron en estudios de laboratorio que la exposición a Pb en sapos adultos (*R. arenarum*) inhibía la actividad enzimática δ -ALAD, conforme las concentraciones de este metal aumentaban. Los resultados obtenidos fueron aún más similares a los encontrados por Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013), donde se demostró un patrón de inhibición de 35 a 78% δ -ALAD en sapos residentes a sitios urbano-industriales e industriales, respectivamente, atribuyéndolo a una exposición por Pb. Sin embargo, al comparar el presente estudio con el anterior, se observó que la actividad δ -ALAD tanto en zona alta y baja fue similar a las obtenidas en la zona industrial en el 2013. Está bien documentado que de todos los contaminantes que existen al Pb se le ha relacionado con una alta inhibición de la enzima δ -ALAD, dada la composición rica en grupos sulfhidrilos de la enzima y a la afinidad del Pb

por estos grupos (Arrieta et al., 2004; Ahamed et al., 2006; Mussali-Galante et al., 2013). Por lo tanto, la inhibición enzimática presentada en los sapos de Coatzacoalcos en la presente investigación, podría estar relacionada a una exposición reciente a Pb, debido a que, la enzima δ -ALAD es evaluada en la sangre completa que contiene los eritrocitos que llevan a cabo el transporte de la hemoglobina, y que por consiguiente contienen esta enzima. Además esto se confirmaría por la vida media (700-1400 días) de los eritrocitos registrado en *R. marina* (Atland y Brace, 1962). Se podría suponer que el hecho de encontrarse inhibida la enzima en los sapos de sitios rurales, donde no existen fuentes puntuales de Pb como en los sitios industriales, podría deberse a dos factores. El primero es que estos sitios rurales se encuentran cercanos a Minatitlán, municipio donde se encuentran industrias, sobretodo, de refinación y petroquímica, las cuales podrían ser fuentes de contaminación no puntuales de Pb, y hayan aumentado las emisiones en años recientes, y por consiguiente incrementado la exposición a Pb en los organismos. Por otro lado, un segundo factor que podría estar propiciando esta exposición serían los fenómenos meteorológicos que se han presentado en esta zona, por ejemplo, inundaciones recientes. Se ha documentado que algunos metales pesados, como el Pb, y compuestos orgánicos puede movilizarse y afectar su biodisponibilidad debido a la remoción de sedimentos cuando se presentan fenómenos meteorológicos extremos como las inundaciones (Espinosa-Reyes et al., 2013), por lo cual posiblemente un evento como este haya aumentado la exposición a Pb en los organismos.

4.4 Parámetros hematológicos: CHCM

En la Figura 14 se presentan los resultados de la concentración de hemoglobina corpuscular media. Los valores de CHCM (mediana \pm rango intercuartil) obtenidos para los organismos de Coatzacoalcos fueron 22.14 ± 2.20 g/dL (zona alta) y 26.45 ± 6.17 g/dL (zona baja) los cuales fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en sapos de referencia (17.09 ± 4.0 g/dL) (KW- $H_{2,37}=17.50$, $p < 0.001$). Como se observa se presentó un aumento significativo de 1.3 a 1.5 veces de la CHCM en los sapos de las zonas muestreadas con respecto

a la referencia. El análisis de comparación post hoc también detectó diferencias significativas en la CHCM de los organismos capturados en zona alta y zona baja.

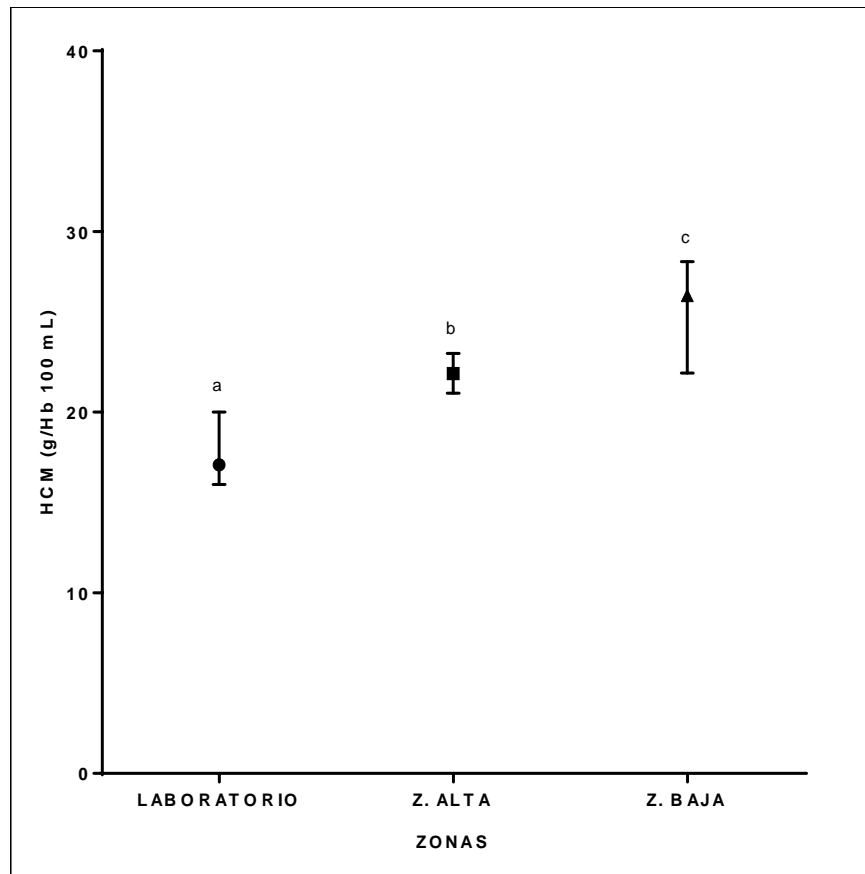


Figura 14. Hemoglobina Corpuscular Media (HCM) en sapo gigante. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p < 0.001$. (Laboratorio $n=7$, Z. Alta= 19. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

Cabe destacar que muy pocos estudios, en relación a contaminantes y parámetros hematológicos, se han realizado con anfibios. Cabagna *et al.* (2005) utilizaron estos parámetros para evaluar los efectos de los agroecosistemas en la salud de los anfibios, sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el sitio de referencia y los agroecosistemas. Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013) encontraron valores de CHCM en sapo gigante, de Coatzacoalcos, similares a los obtenidos en la presente investigación. Aunque, en ese estudio, se encontró un patrón de disminución de CHCM conforme a la cercanía de los organismos a sitios industriales, siendo asociado a una anemia microcítica, la cual podría haber sido causada por exposición a Pb. Caso contrario,

en el presente estudio se encontró un patrón de incremento de la concentración de HCM, en relación al incremento de los valores de hemoglobina y hematocrito en los organismos capturados en Coatzacoalcos. De acuerdo a Cazenave *et al.* (2005) el incremento de algunos parámetros, como la Hb, podría estar relacionado a una respuesta de los organismos ante una disminución del transporte de oxígeno en la sangre (hipoxia), lo cual puede dar origen a una anemia (hipoxia anémica). La hipoxia en algunos organismos vertebrados (peces, anfibios) se ha relacionado con el incremento natural y antropogénico de amonio, sulfuros o materia orgánica, así como por la presencia de contaminantes (orgánicos o metales pesados -plomo-) y exceso de nutrientes (Rice *et al.*, 1999; Wu, 2002). Así mismo, Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013) señalan que uno de los mecanismos de respuesta de los vertebrados ante una hipoxia anémica puede ser el aumento del número de eritrocitos (policitemia) incrementando la capacidad del transporte de oxígeno, por consiguiente, aumentando algunos valores hematológicos, como el hematocrito. Sugiriendo este fenómeno como un mecanismo de compensación ante la hipoxia anémica.

Con lo anterior, y, dada la evidencia de la presencia de contaminantes como metales pesados o COPs, se podría suponer que un efecto similar haya ocurrido en el sistema de *R. marina* de Coatzacoalcos de la presente investigación, presentando diferencia en los parámetros con respecto a los organismos de referencia, y entre los de cada zona.

4.5 Butirilcolinesterasa (BChE)

En cuanto a la actividad de BChE, la Figura 15 muestra los resultados que se obtuvieron. La actividad de BChE fue estadísticamente más alta y se obtuvo un incremento de 1.4 veces para los sapos residentes de la zona baja con respecto a los de referencia ($KW-H_{2,37}=7.47$, $p<0.05$). El análisis de comparaciones post hoc no mostró diferencias estadísticamente significativas de la actividad enzimática entre las zonas muestreadas de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos.

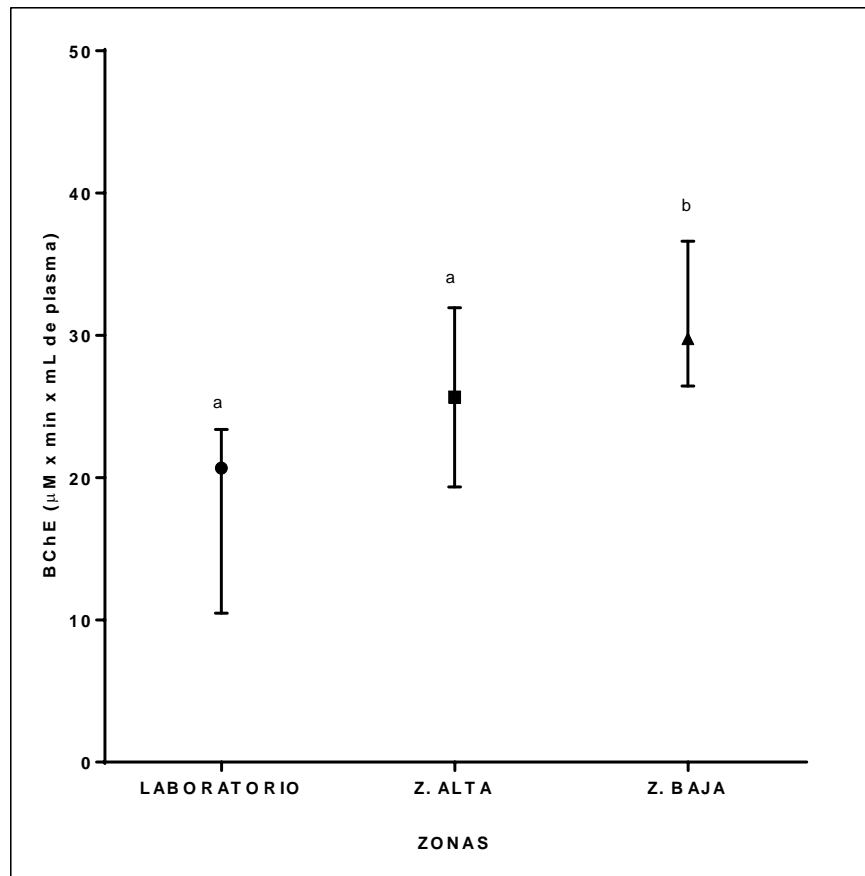


Figura 15. Actividad BChE en plasma de sapo gigante. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p < 0.05$. (Laboratorio $n=7$, Z. Alta= 19. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

La inhibición de esterasas muchas veces se ha utilizado como un excelente biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos, dado que estos, mediante una fosforilación del sitio activo, pueden inhibir la enzima, y, en consecuencia, desencadenar efectos a nivel neurológico en los organismos (Thompson, 1999; Leite *et al.*, 2010).

Diversos estudios, tanto en campo como en laboratorio, en anfibios han demostrado la inhibición enzimática de BChE cuando están expuestos a plaguicidas organofosforados (Lajmanovich *et al.*, 2004; Attademo *et al.*, 2007; Attademo *et al.*, 2011; Lajmanovich *et al.*, 2015). BChE ha sido utilizado también en otros organismos (aves y reptiles) como un excelente biomarcador no destructivo de exposición a plaguicidas (Fossi *et al.*, 1992; Sánchez-Hernández *et al.*, 2003).

Como en la mayoría de los estudios se esperaba obtener una respuesta de inhibición de BChE, sobre todo, en los sitios de la zona rural, debido a que podrían utilizarse plaguicidas para el control de plagas en cultivos. Sin embargo, los resultados obtenidos, demostraron una mayor actividad de BChE en sapos residentes de la zona baja. Dado que los sapos gigantes que se mantuvieron en laboratorio no están en contacto con ningún contaminante que pueda tener un efecto en la actividad de BChE, se asumió esta actividad en estos organismos como normal.

Además de utilizarse como biomarcadores de exposición a organofosforados, tanto BChE como la acetilcolinesterasa, han sido utilizados como biomarcadores de respuesta inflamatoria (Das *et al.*, 2007). Das (2012) explica que un incremento de la esterasas se debe a que regulan la acetilcolina, dado que esta molécula es antiinflamatoria, para que el proceso de inflamación se lleve en equilibrio. La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico, de un organismo, al daño causado en células y tejidos por cualquier agente (biológico, químico, físico o mecánico); caracterizada por el incremento del flujo sanguíneo, permeabilidad capilar y migración de células blancas fuera del sistema circulatorio hacia el tejido circundante para eliminar los residuos y restaurar la estructura y actividad del tejido (Kovacs y Frazier-Jessen, 1994; García Barreno, 2008). La inflamación es considerada una respuesta común a la toxicidad causada por el metabolismo de xenobióticos (Rosenthal y Luster, 1994; Lampón *et al.*, 2012). Algunos COPs como las dioxinas y BPCs pueden desencadenar procesos inflamatorios por su interacción con células vasculares (Hennig *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012). Por lo tanto, la respuesta que presentaron los anfibios residentes de la zona baja podría ser causa de exposición o efectos de los contaminantes de esa zona que podrían estar desencadenando procesos inflamatorios. Trujillo-Vázquez *et al.* (2016) evidenciaron un aumento de la acetilcolinesterasa y BChE en reptiles (*Cocodrilo moreletti*) residentes de una laguna contaminada, atribuyéndolo a un posible daño hepático en estos.

4.6 Factor de condición (FC)

Los resultados para FC se muestran en la Figura 16. El análisis estadístico con la prueba Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas entre el FC de los sapos de las zonas de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos con respecto al FC de los organismos de referencia (KW- $H_{2,35}=15.41$, $p<0.001$). Sin embargo, el análisis de comparación post hoc mostró una disminución estadísticamente significativa de 1.4 veces en el FC de los sapos residentes de la zona baja comparado con el de los de la zona alta.

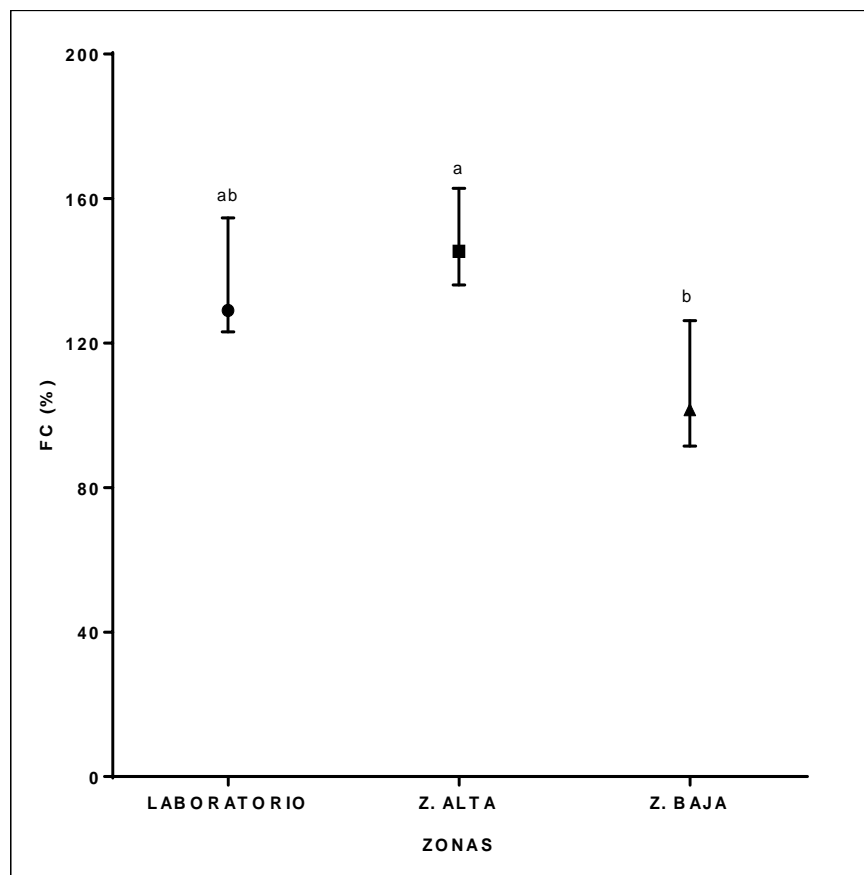


Figura 16. Factor de condición (FC) presentado en sapos gigantes. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p<0.001$. (Laboratorio $n=6$, Z. Alta= 18. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

Existe muy poca información de la utilización del factor de condición en anfibios en sitios contaminados. Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013) reportaron una disminución en el factor de condición de sapos residentes de zonas industriales de la cuenca del Río Coatzacoalcos comparado con los de referencia (zonas rurales),

siendo similar a lo obtenido en la presente investigación. Así mismo, Brodeur *et al.* (2011) reportaron una disminución del factor de condición y alteraciones enzimáticas en ranas semi-acuáticas y terrestres residentes de sitios agrícolas, asociándolo a una posible activación de sistemas compensatorios o de detoxificación en los anfibios ante un estrés ambiental o una disminución de sus presas (mosquitos) por la aplicación de insecticidas. En otros organismos, como peces y aves, se ha reportado la disminución del factor de condición después de la exposición a metales pesados y BPCs, respectivamente (Bervoets y Blust, 2003; Jaspers *et al.*, 2006).

La estimación del factor de condición en anfibios es importante para evaluar si se encuentran bajo un estrés ambiental (Bancila *et al.*, 2010). Este indicador es utilizado comúnmente para evaluar el estado de salud general de organismos acuáticos y terrestres, debido a que es considerado un biomarcador no destructivo de las reservas energéticas (Amiard-Triquet *et al.*, 2013). Lo anterior resulta muy importante dado que las reservas energéticas pueden ser utilizadas para el mantenimiento, desarrollo o reproducción de los anfibios. Comúnmente, una mayor reserva de energía en organismos les confiere una mayor resistencia sin alimento, mayor supervivencia y mejor rendimiento reproductivo en comparación a los individuos que presenten menores reservas (Brodeur *et al.*, 2011). La exposición de los organismos a contaminantes puede incrementar los requerimientos energéticos, disminuir la tasa metabólica o de asimilación de nutrientes, e incluso alterar las enzimas de digestión (Rice *et al.*, 1999; Linder *et al.*, 2010a; Dedourge-Geffard *et al.*, 2013). Esto podría explicar la disminución en el factor de condición de los sapos residentes de la zona baja en el presente estudio y en el realizado por Ilizaliturri-Hernández *et al.* (2013), dado que ya se ha demostrado una mayor presencia de contaminantes en esta zona. En cuanto a la similitud encontrada entre los sapos residentes de la zona alta y los de referencia, esto podría estar ocasionado por la falta de un mayor número de individuos (tamaño de muestra) o por la deficiencia en la nutrición de los organismos de laboratorio, debido a que, estos fueron alimentados por un solo tipo de dieta.

4.7 Apoptosis

En cuanto al resultado del porcentaje de apoptosis en eritrocitos de los sapos, el análisis estadístico mostró un aumento significativo de este parámetro en los organismos de la zona de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos con respecto a los de referencia ($KW-H_{2,37}=19.90$, $p<0.001$), siendo mayor en los organismos de la zona baja (Figura 17). Por otra parte, el análisis de comparación post hoc demostró diferencias significativas entre el porcentaje de apoptosis de los sapos de la zona alta y baja. El porcentaje de apoptosis (de mayor a menor) fue de 35.68% y 11.52% en sapos gigantes de la zona baja y zona alta, respectivamente. La apoptosis en eritrocitos se presentó 10.7 veces y 33.3 veces más en los organismos residentes de la zona alta y baja, respectivamente, en comparación a los de laboratorio.

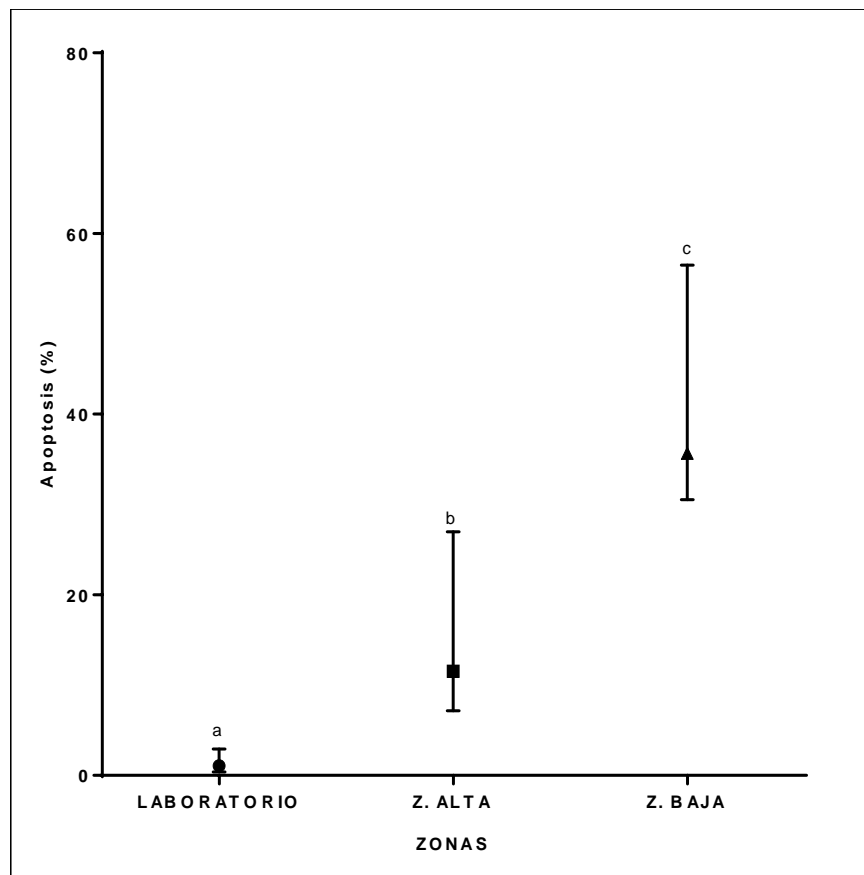


Figura 17. Porcentaje de apoptosis presentado en eritrocitos de sapos gigantes. Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p<0.001$. (Laboratorio $n=7$, Z. Alta= 19. Z. Baja=11) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

La mayoría de las investigaciones realizadas en fauna con apoptosis, como biomarcador, hasta el momento se enfocan a la exposición de organismos a contaminantes (en condiciones controladas), sobre todo, de compuestos organoclorados. Por ejemplo, Tebourbi *et al.* (1998) y Hallegue *et al.* (2002) reportaron una mayor inducción de apoptosis en linfocitos de ratas expuestas a DDT y dieldrín, concluyendo que ambos compuestos tuvieron efectos inmunotóxicos. Sakamoto *et al.* (1997) y Sakamoto *et al.* (2004) reportaron la inducción de apoptosis en células rojas del anfibio anuro *Xenopus laevis* expuesto a dioxinas, concluyendo que estos compuestos podrían conducir a una anemia en estos organismos mediante la inducción de la apoptosis en eritrocitos. Por otra parte, Cabagna *et al.* (2006) evidenciaron el incremento de inducción de apoptosis en eritrocitos de renacuajos de la especie *Odontophrynus americanus* conforme aumentaron la exposición a concentraciones del piretroide Cipermetrina.

Con lo anterior, se podría asumir que el resultado obtenido en la presente investigación es uno de los primeros estudios de la utilización de la apoptosis como biomarcador en anfibios en campo, y dado que, ya se ha evidenciado la presencia de diferentes contaminantes a lo largo de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, se podría asumir que la inducción de la apoptosis en las dos zonas se podría deber a una exposición reciente a contaminantes que se encuentran en este sitio. Sweet *et al.* (1999) mencionan que la apoptosis comúnmente es utilizada como un biomarcador de respuesta a una exposición aguda o crónica a una mezcla de contaminantes, indicando un estado de estrés general, y en algunas ocasiones, la pérdida de función celular o estructural de un tejido, y, por consiguiente, la salud del organismo. En este sentido, se ha demostrado que algunos compuestos organoclorados y metales pesados pueden inducir especies reactivas de oxígeno, y, en consecuencia, inducir la apoptosis en células de diferentes organismos (Pérez-Maldonado *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Esta inducción de apoptosis puede desbalancear o alterar la homeostasis inmunológica. Por ejemplo, un exceso de apoptosis puede alterar las funciones de los linfocitos, y, en consecuencia, dañar el sistema inmunológico del organismo (Kamath *et al.*, 1997; Weyts *et al.*, 1997; Fukuyama *et al.*, 2010). Por

otra parte, se puede generar una pérdida de función celular, o incluso, de un órgano, por el exceso de apoptosis, como, por ejemplo, dañar la formación de órganos reproductivos, teniendo efectos de disrupción endocrina en los organismos (Androutsopoulos *et al.*, 2013). Y, en cuanto a su relación con daño genético, se ha demostrado que cuando compuestos como HAPs, BPCs, dioxinas o metales pesados causan daños en el ADN como aductos, aberraciones cromosómicas o daño en las bases, y el ADN no puede repararse por sí sólo, se induce la apoptosis, por lo cual esta inducción puede ser utilizada como biomarcador de genotoxicidad (Roos y Kaina, 2006).

Es evidente que los sapos residentes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos contienen mayor porcentaje de apoptosis en comparación con los de referencia, por lo tanto, se puede asumir que esto puede ser provocado por la exposición a contaminantes en las zonas. Más aún, las diferencias estadísticas entre la zona alta y baja, dan un gradiente de exposición en este biomarcador, siendo la zona baja o industrial la más afectada, coincidiendo con la región donde se han registrado más contaminantes.

4.8 Vitelogenina

Por último, los resultados de vitelogenina en plasma de *R. marina* se muestran en la Figura 18. Las concentraciones de VTG ($\mu\text{g/mL}$) en los organismos de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de referencia ($\text{KW-H}_{2,26}=4.017$, $p>0.05$). El análisis de comparación post hoc no mostró diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de VTG en sapos gigante residentes de la zona alta y baja. Cabe destacar, que la determinación de VTG plasmática se realizó en organismos macho residentes del Río Coatzacoalcos, mientras que, para laboratorio o referencia, se utilizaron organismos hembra.

VTG ha sido utilizada como biomarcador de disrupción endocrina en organismos como peces, reptiles, anfibios y mamíferos. Kirby *et al.* (2004) reportaron un aumento de esta proteína en plasma de peces pleuronéctidos machos (*Platichthys flesus*) residentes de estuarios del Reino Unido, atribuyéndolo

a una exposición a compuestos estrogénicos por los sitios industriales aledaños. Posteriormente, en este mismo estudio, realizado en otra temporada se evidenció la disminución de VTG en los peces macho, asociándolo a un mejor tratamiento de aguas residuales de las industrias aledañas al estuario. De la misma manera Medina-Garza (2012) reportó un aumento de VTG en plasma de peces (*Oreochromis sp.*) en ecosistemas acuáticos de México, asociándolo a una posible presencia de compuestos estrogénicos en descargas de aguas residuales o lodos de tratamiento circundantes a estos ecosistemas.

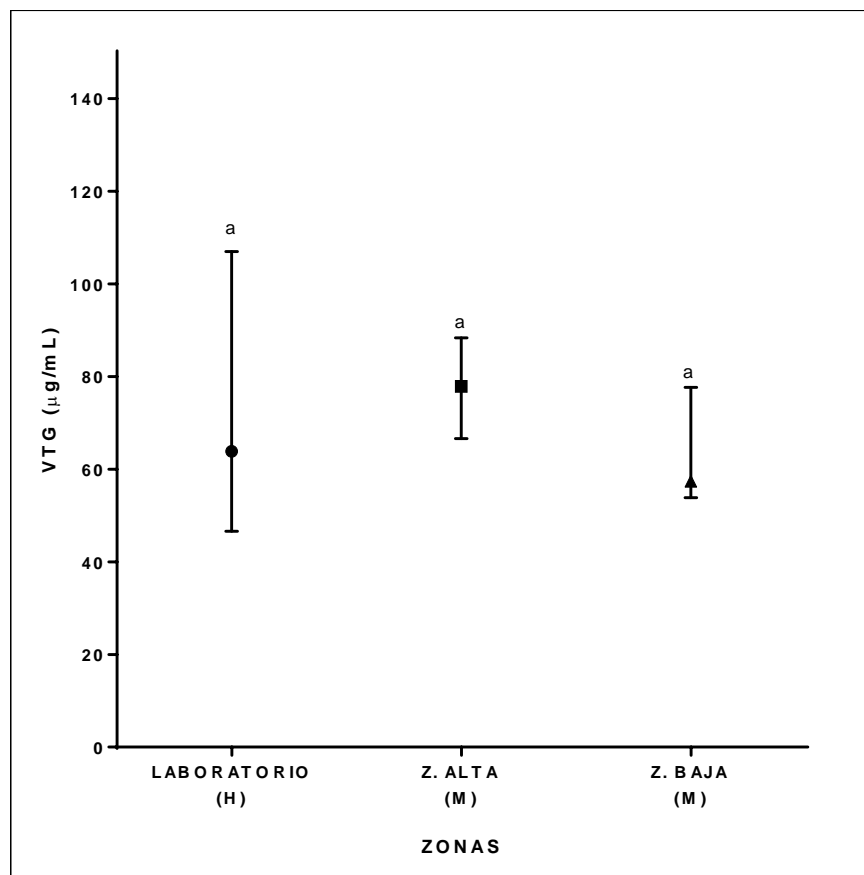


Figura 18. Concentración de VTG plasmática en sapos gigantes (H=hembras, M= machos). Análisis estadístico realizado con prueba Kruskal Wallis, $p < 0.05$. (Laboratorio $n=7$, Z. Alta= 10. Z. Baja=9) (Las barras representan el rango intercuartil y el símbolo la mediana).

Por otra parte, en anfibios, la mayoría de estudios se han realizado a nivel de laboratorio. Por ejemplo; Palmer y Palmer (1995) y Palmer *et al.* (1998) reportaron un incremento de las concentraciones de VTG plasmática en anfibios de la especie *Xenopus laevis* al estar expuestos a compuestos organoclorados

(dieldrín, toxafeno y DDT) en condiciones controladas, concluyendo que VTG servía como un biomarcador de exposición a xenoestrogenos en anfibios. Lo anterior no fue similar a lo encontrado en el presente estudio, debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sapos gigantes de referencia contra los del Río Coatzacoalcos, y los valores de VTG no se encontraron aumentados en las zonas muestreadas. Sin embargo, esto también podría ser indicativo de una exposición a perturbadores endocrinos, debido a que los sapos machos de los sitios problema presentan valores similares de VTG plasmática que las hembras del laboratorio. Wallace y Bergink (1974) y Palmer *et al.* (1998) explican que VTG es una proteína característica de las hembras en anfibios, induciéndose en anfibios machos solamente por la exposición a compuestos estrogénicos. Hallgren *et al.* (2009) confirman que, en organismos vertebrados del sexo hembra, VTG es la única proteína plasmática que contiene fósforo, y es por esto, que se puede determinar indirectamente como fósforo álcali lábil (ALP) y relacionar con perturbación endocrina en caso de estar presente en organismos machos. Por lo tanto, con el hallazgo de las concentraciones similares en los sapos gigantes evaluados, se podría suponer que los organismos residentes del Río Coatzacoalcos están expuestos a compuestos que pueden tener efectos como perturbadores endocrinos. Más aún, se ha demostrado que algunos de los compuestos organoclorados que se han registrado en el sitio de estudio pueden tener efectos endocrinos en anfibios, reptiles y peces (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1998; Vega-López *et al.*, 2006). Esto es indicativo de que el biomarcador puede funcionar para evidenciar perturbación endocrina por xenoestrogénos en sapo gigante.

4.9 Asociaciones entre biomarcadores

Al realizarse las pruebas de correlación de Spearman entre los biomarcadores en sapo gigante por cada sitio evaluado incluyendo la referencia (laboratorio), solamente se encontraron correlaciones en las enzimas determinadas en los sapos residentes de ambas zonas de la cuenca baja del Río

Coatzacoalcos. No se encontró ninguna correlación en los biomarcadores de sapos de laboratorio.

Primeramente, se encontró una correlación positiva ($r=0.51$, $p<0.05$, $n=19$) entre el porcentaje de apoptosis y la actividad de BChE de sapos gigantes residentes de la zona alta (Figura 19); y, una correlación negativa ($r=-0.68$, $p<0.05$, $n=11$) para los mismos biomarcadores en los organismos de la zona baja (Figura 18).

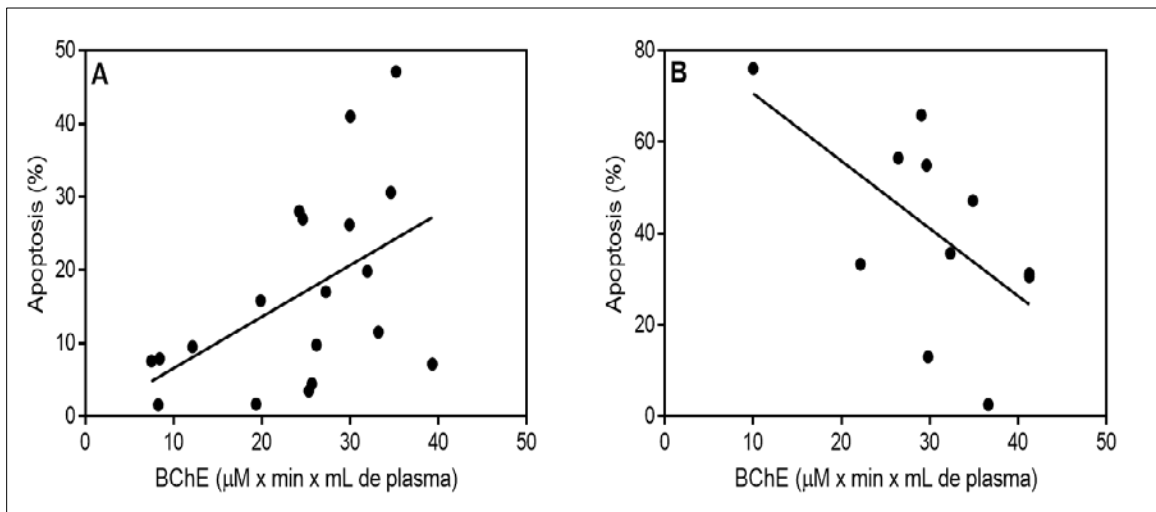


Figura 19. Correlación entre la actividad BChE y apoptosis de sapo gigante (*R. marina*) de la zona alta (A) y la zona baja (B) de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos.

La apoptosis es un mecanismo natural donde se programa la muerte celular, siendo esencial para el desarrollo y homeostasis normal en los organismos. Este proceso es muy importante, debido a que, remueve las células dañadas o infectadas. Sin embargo, un desbalance de este mecanismo puede dar consecuencias biológicas adversas (Kannan y Jain, 2000). Se ha evidenciado que las esterasas como BChE y AChE pueden ser reguladoras de los procesos apoptóticos (Zhang *et al.*, 2002). Jiang y Zhang (2008) mencionan que esterasas como AChE pueden suprimir o promover la apoptosis, incluso bajo estrés oxidativo, ya sea porque la expresión de esta enzima podría influir en la expresión de genes involucrados en la inducción de la apoptosis, o porque, además, las esterasas contribuyen a la formación del apoptosoma (complejo que da inicio a una reacción en cascada que da lugar a la apoptosis), aunque los mecanismos

aún no estén bien elucidados. Además, Zhang y Greenberg (2012) proponen que una sobreexpresión de esterasas puede ocasionar que las células sean susceptibles a procesos apoptóticos; mientras que una disminución provoca lo contrario. Lo anterior podría estar sucediendo en los organismos. Como ya se había mencionado en apartados anteriores, algunos compuestos organoclorados pueden inducir la apoptosis, la cual podría estar siendo regulada por la BChE, manteniendo el equilibrio de este proceso en el sistema de los organismos. Por otra parte, otro proceso que podría estar sucediendo en el sistema de los organismos es la inflamación. Durante este proceso debe haber un balance para reducir el daño celular o a los tejidos, por lo cual, ciertas sustancias con características pro-inflamatorias y anti-inflamatorias son excretadas para mantener el equilibrio de la inflamación y minimizar los efectos de este proceso. Una de las sustancias que se ha demostrado tiene efectos anti-inflamatorios es la acetilcolina, la cual mediante las esterasas BChE y AChE debe estar regulada para mantener el equilibrio de la inflamación (Rao *et al.*, 2007; Das, 2012). En apartados anteriores se mencionó que algunos xenobióticos pueden provocar procesos inflamatorios en los organismos. Así también durante la inflamación puede ocurrir la apoptosis y la necrosis de las células y tejidos (Rao *et al.*, 2007). Por lo cual, se puede deducir que los sapos gigantes antes una exposición de diversos contaminantes podrían estar bajo procesos inflamatorios, los cuales podrían estar siendo regulados por el aumento de BChE, y a su vez provocando una inducción de apoptosis como balance para evitar algún daño o pérdida de la función en tejidos o células. Se necesita estudiar con mayor profundidad estos procesos no sólo en anfibios, sino en otros organismos, ya que esto daría la pauta para utilizar estos biomarcadores en conjunto y evidenciar hasta posibles efectos de los contaminantes.

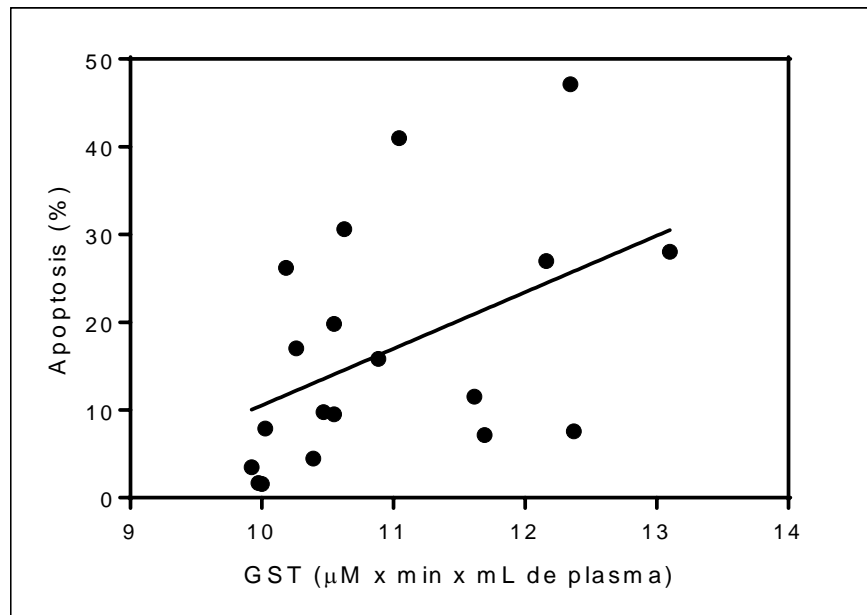


Figura 20. Correlación entre la actividad de GST y porcentaje de apoptosis en sapos gigantes de la zona alta de la cuenca del Río Coatzacoalcos.

Por otro lado, se encontró una correlación positiva ($r=0.54$, $p<0.05$, $n=19$) entre la actividad de GST y el porcentaje de apoptosis en los sapos gigantes residentes de la zona alta (Figura 20).

En apartados anteriores se había mencionado el papel importante que cumplía GST ante la eliminación de xenobióticos. Esta función es una de sus características principales por el que GST es conocido. Sin embargo, en estudios recientes se ha señalado que esta enzima podría estar involucrada en procesos no enzimático en modulación de las señales celulares para regular la proliferación y muerte celular (apoptosis) ante condiciones de estrés (Laborde, 2010). Por otra parte, Gilot *et al.* (2002) evidenciaron que algunas clases o isoformas de GST podrían regular la apoptosis para la protección de células como hepatocitos ante condiciones de estrés inducido por diferentes compuestos. Con lo anterior, se puede suponer que un mecanismo similar podría estar presentándose en el sistema de los sapos gigantes de la zona alta, GST podría estar regulando esta apoptosis en las células para prevenir alteraciones o daños. Esta asociación también podría confirmar que los organismos pueden encontrarse bajo un estrés oxidativo inducido por los contaminantes que allí se encuentren.

De igual manera, se encontró una correlación negativa ($r=-0.61$, $p<0.05$, $n=11$) entre GST y MDA de los organismos residentes de la zona baja, y, una correlación negativa entre GST y δ -ALAD ($r=-0.48$, $p<0.05$, $n=19$) de los organismos residentes de la zona alta (Figura 21).

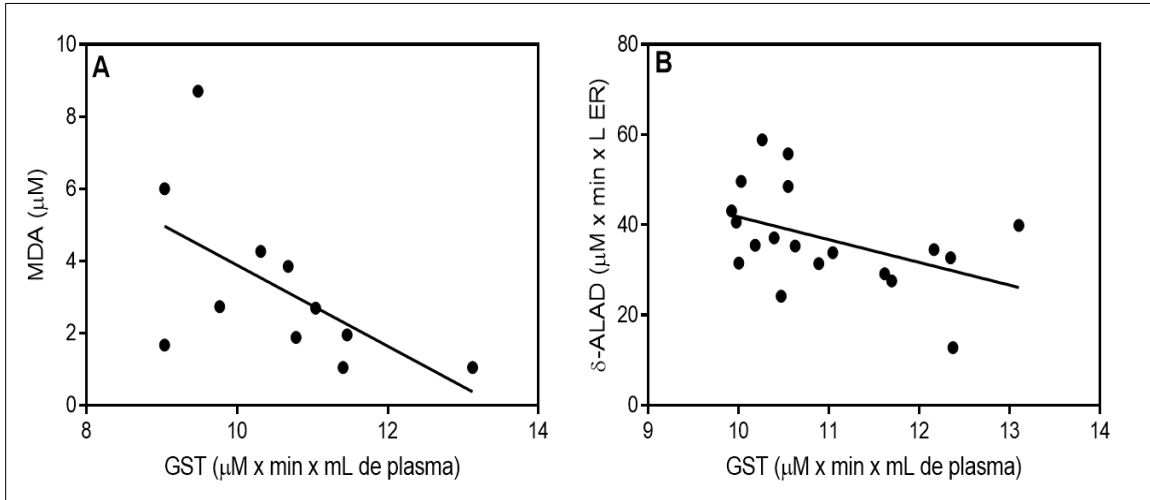


Figura 21. Correlación entre la actividad GST y MDA (A), GST y δ -ALAD (B), en sapos gigantes de la zona baja (A) y de la zona alta (B)

Con las correlaciones encontradas, podría confirmarse que la enzima GST cumple un rol importante en los organismos.

En cuanto a la relación entre GST y MDA, se ha demostrado que GST cumple un papel como antioxidante y como mecanismo de defensa en la peroxidación de lípidos. Una exposición a xenobióticos puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, la interacción de estas moléculas con los lípidos de las membranas celulares puede generar productos como hidroperóxidos, radicales peróxidos, epóxidos y productos finales de la reacción como 4-hidroxicalconos (4-HNE), MDA y acroleína. En general, GST puede reducir los radicales peróxidos formados de ácidos grasos insaturados, así como los productos finales (4-HNE, MDA), e interrumpir la cadena que se origina por la peroxidación lipídica. Aunque GST no puede del todo prevenir la peroxidación lipídica, pero si proteger las células de la toxicidad de los productos finales de este proceso (Yang *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2004). Por lo cual, se podría asumir que un mecanismo similar podría estar pasando en los

sapos gigantes de la zona baja del Río Coatzacoalcos. Esto también puede confirmar que los organismos se encuentran bajo un estrés probablemente inducido por los contaminantes que se encuentran en esa zona, y, por lo tanto, el sistema de estos compensa los efectos generados por esta exposición mediante la utilización de la enzima GST, ya sea, para prevenir y proteger a las células de efectos adversos como el daño al ADN.

Por otra parte, la relación entre GST y δ -ALAD, también confirmaría la existencia de contaminantes que posiblemente podrían estar induciendo efectos en el sistema de los sapos gigantes de la zona alta del Río Coatzacoalcos. Se ha demostrado que la inhibición de δ -ALAD puede ocasionar la acumulación de productos pro-oxidantes que pueden conllevar a un estrés oxidativo (Arrieta *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2012). Lo anterior podría explicar el aumento de GST a la par de la inhibición de δ -ALAD en la zona alta. En este caso, GST podría estar actuando, ya sea, regulando los productos pro-oxidantes, al igual que sucede con MDA, para disminuir el estrés oxidativo en los organismos. A su vez, se ha evidenciado que metales pesados, como el Pb y Cd, pueden conducir a un estrés oxidativo y peroxidación lipídica, activando las funciones de los antioxidantes (Sarkar *et al.*, 1997; Arrieta *et al.*, 2004). Esto podría suponer que la existencia de metales pesados como el Pb en esta zona puede estar desencadenando todos estos procesos y efectos en el sistema de los sapos gigantes, y que GST esté cumpliendo un papel importante en la regulación de estos procesos como mecanismo de defensa y protección.

4.10 Sobre los biomarcadores

Los estudios previos y los resultados del presente estudio, han demostrado que el incremento de la actividad enzimática GST en anfibios, como el sapo gigante, puede utilizarse como un biomarcador no destructivo. Más aún, dada la amplia distribución de esta especie a lo largo país, se puede recomendar incluir la actividad GST en una batería de biomarcadores en estos organismos en el monitoreo ambiental o evaluación de riesgo ecológico de sitios contaminados. A su vez, la actividad de esta enzima se podría complementar con otros

biomarcadores que puedan evidenciar daños en los tejidos -recordando que GST no solamente puede ayudar la detoxificación de los contaminantes, sino también puede contribuir a la activación de la toxicidad de algunos compuestos, como por ejemplo, los alquenos halogenados, los cuales se transforman en sustancias nefrotóxicas después de la conjugación por glutatión (Slatinská *et al.*, 2008)-.

En cuanto a MDA, este puede funcionar como un biomarcador no destructivo de estrés oxidativo en sapos gigantes. Sin embargo, para evidenciar que un organismo se encuentra bajo un estrés oxidativo y desbalance antioxidante, es posible complementar este biomarcador con la determinación de enzimas antioxidantes (como, por ejemplo; CAT y SOD) (Repetto *et al.* 2012), además de probar otros métodos para plasma o comprobar con cromatografía de gases si el método implementado con el kit está realizándose de manera correcta o es de utilidad para la determinación de MDA en plasma de sapo gigante.

Por otra parte, se puede asimilar que la actividad δ -ALAD puede ser considerada como un buen biomarcador no destructivo de exposición a Pb en sapo gigante, y debido, a que se encontró inhibición en ambas zonas de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, podría dar la pauta a que es necesario un nuevo monitoreo con énfasis en la región rural para afirmar o descartar si hay un aumento en la concentración de Pb, su posible causa y, si esto, pueda estar afectando a otros organismos e incluso a los asentamientos humanos que allí se encuentran.

Los parámetros hematológicos pueden ser considerados como biomarcadores no sólo de exposición, sino de efectos a la salud de los organismos, sin embargo, deberían utilizarse cautelosamente, debido a que los valores pueden verse afectados no solamente por los xenobióticos, sino también, por factores como la temperatura del ambiente, el estado nutricional de los organismos o hasta la presencia de microorganismos (Blaxhall, 1972; Roche y Bogé, 1996). Ante esto, para diferenciar estos factores, podría hacerse un análisis hematológico mucho más exhaustivo, incluyendo conteo de glóbulos rojos, diferenciación celular, anomalías eritrocitarias e incluso la evaluación del ciclo celular.

Como en la mayoría de los estudios se esperaba encontrar una inhibición de la actividad de BChE la zona alta (sitios rurales), sin embargo, esto puede explicarse porque podría ser que los sitios rurales no tienen una actividad agrícola intensa. El hecho de encontrarse una mayor actividad de BChE en los sapos residentes de la zona baja (industrial) podría ser posiblemente una respuesta a procesos inflamatorios, sin embargo, para demostrar esto, tendrían que añadirse biomarcadores inmunológicos o de daño a tejidos, además de acompañarlo con la determinación de la actividad de acetilcolinesterasa; o, dada la poca información que existe, realizar bioensayos con anfibios y contaminantes (especialmente inductores de procesos de inflamación) para demostrar si las esterasas también podrían servir como biomarcadores de inflamación en organismos silvestres.

Es importante mencionar que con los resultados obtenidos el FC puede funcionar como un biomarcador no destructivo en sapo gigante. Aunque el FC es considerado un biomarcador para evaluar el estado general de salud de los organismos, a falta de un análisis de contaminantes en el sitio evaluado, muy pocas veces puede relacionarse directamente con la presencia de contaminantes, debido a que también puede responder a factores como la edad o el estado reproductivo de los organismos e incluso a factores ambientales como la temperatura (Mouneyrac *et al.*, 2013). Dedourge-Geffard *et al.* (2013) proponen el uso de biomarcadores de digestión enzimática, junto con la medición de parámetros fisicoquímicos y el análisis de la presencia de contaminantes en monitoreos ambientales para diferenciar las causas de una disminución o incremento en los índices de condición, y para de esta manera, definir el riesgo individual o a la población de organismos.

La apoptosis en eritrocitos mostró ser un buen biomarcador de exposición no destructivo en los sapos gigantes residentes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos. Cabe mencionar, que la evaluación de apoptosis en células rojas puede proveer evidencia de la disminución de la función inmunológica o fisiológica de los organismos (Sweet *et al.*, 1999). Por lo cual podría ser que los sapos gigantes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos podrían estar teniendo efectos a nivel hematológico, inmunológico o de daño a tejidos o ADN, sin embargo, para

diferenciar el tipo de efecto se deberían tomar en cuenta biomarcadores inmunológicos o histológicos u otros de genotoxicidad junto a la determinación de apoptosis.

La VTG plasmática podría ser considerada como biomarcador de perturbación endocrina en futuros monitoreos ambientales no solamente con sapo gigante sino con otras especies de anfibios, reptiles o peces. Principalmente porque uno de los criterios que se manejan para usarla como biomarcador es que los organismos machos no deben presentar concentraciones de vitelogenina, y en caso de presentarla, es indicativo de que están expuestos a compuestos estrogénicos. De igual manera, Gagné *et al.* (2008) proponen utilizar el enfoque de múltiples biomarcadores, para determinar que otros efectos podrían presentar los organismos a la par del incremento de VTG. También, es de importancia utilizarlo sobre todo en anfibios y reptiles en sitios impactados, para evidenciar y prevenir posibles efectos en las poblaciones de estos organismos, debido a que, se ha relacionado el declive mundial de anfibios y reptiles con la contaminación ambiental y con la exposición a perturbadores endocrinos (Bögi *et al.*, 2003; McCoy *et al.*, 2008; Alford, 2010).

Cabe destacar que las correlaciones confirmaron que una batería de biomarcadores es útil para el caso de monitoreo o evaluaciones de riesgo ambiental, debido a que algunos biomarcadores pueden estar relacionados entre sí, y, a su vez, pueden estar cumpliendo otras funciones para regular o equilibrar la homeostasis de los organismos. De esta manera, se podría confirmar o dar un mayor peso de evidencia a los efectos inducidos posiblemente por los xenobióticos a los que se encuentren expuestos los organismos. Es importante destacar, que también esto podría abrir nuevas líneas de investigación, sobre todo, utilizando el sapo gigante como modelo animal para entender y elucidar los mecanismos que se pueden presentar ante una exposición a contaminantes en este organismo.

A pesar de que este estudio demostró que los biomarcadores no destructivos pueden ser una útil herramienta en la evaluación de sitios contaminados, como la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, algunos autores

señalan que es mejor utilizar estos biomarcadores junto a parámetros fisicoquímicos y la determinación de concentraciones de contaminantes (Romeo y Gambieri, 2013), así como su utilización por temporadas; primeramente, para observar si dependen del comportamiento del en cuanto a los cambios de condiciones meteorológicas, y, segundo, para relacionar la presencia de contaminantes y poder diferenciar cuales de estos podrían tener mayores efectos en los organismos (Amiard-Triquet *et al.*, 2013). Por lo anterior es también de suma importancia destacar la utilización de organismos de referencia en este tipo de estudio, y, aunque, en la presente investigación se hayan utilizado organismos mantenidos en laboratorio, se asume que estos no se encuentran bajo un estrés por contaminantes. Por último, la integración de los biomarcadores bajo un índice para evidenciar el gradiente de contaminación podría ser de gran utilidad, en caso de tener diferentes sitios o estaciones de muestreo, en una región contaminada (ej. Coatzacoalcos), y evidenciar el grado de los efectos que los organismos puedan estar presentando, para posteriormente proponer los sitios prioritarios para la implementación de su remediación (Depledge, 1994; Beliaeff y Burgeot, 2002; Broeg y Lehtonen, 2006; Roméo y Giambérini, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran una posible exposición y efectos por contaminantes en los sapos gigantes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos. Aunque no se determinaron las concentraciones de contaminantes en esta región, la exposición y los efectos se pueden asociar debido a que estos biomarcadores responden principalmente a los xenobióticos registrados en anteriores investigaciones.

Los biomarcadores GST, δ -ALAD, los parámetros hematológicos y el factor de condición demostraron que los sapos gigantes de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos están bajo un estrés oxidativo o efectos inducidos por los contaminantes que se encuentran en esas zonas. Esto se logró confirmar, con las correlaciones que evidenciaron un aumento de GST con la disminución de MDA, las cuales no se presentaron en los organismos de laboratorio o referencia. Además, la correlación encontrada con la actividad δ -ALAD y GST suponen una posible exposición reciente a metales pesados (por ej. Pb) en la zona alta de la cuenca, lo cual también da la pauta para realizar un nuevo monitoreo ambiental y deducir si los niveles de Pb podrían haber aumentado en esta zona y por qué.

El biomarcador MDA requiere de la verificación de los valores obtenidos por otros métodos alternativos fiables para su determinación, así como la inclusión de biomarcadores del sistema antioxidante (CAT y SOD), para ser añadido o considerado en una batería de biomarcadores.

Con la actividad de BChE no se demostró la exposición a plaguicidas organofosforados como se esperaba. Sin embargo, su relación con procesos de inflamación y la correlación encontrada con apoptosis (posiblemente como un mecanismo de regulación) hace que este biomarcador si pueda incluirse dentro de la batería, junto a AChE y biomarcadores de daño específicos. Además, hace falta un mayor estudio a profundidad con estas enzimas y su relación en procesos inflamatorios en sapo gigante, ya sea con estudios de laboratorio o de campo.

La apoptosis demostró ser un buen biomarcador no destructivo que puede evaluarse en sangre de *R. marina*. Aunado a esto, las técnicas sencillas para su

determinación lo hacen un biomarcador utilizable en otros organismos como reptiles o peces. Cabe destacar que este estudio es de los primeros donde se utiliza apoptosis como un biomarcador a contaminantes en campo en anfibios.

Aunque no se hayan encontrado diferencias estadísticas en el aumento o disminución de VTG en los sapos gigante macho en comparación con las hembras de laboratorio, se asume por las concentraciones similares que los organismos están expuestos a perturbadores endocrinos en ambas zonas de la cuenca. Por lo cual la presencia en machos posiblemente se deba a la presencia de compuestos estrogénicos, lo cual hace a VTG un buen biomarcador no destructivo de perturbación endocrina aplicable en sapo gigante.

Una vez más, se confirmó que el sapo gigante (*R. marina*) es un buen biomonitor de la salud de ecosistemas, y puede ser útil para la evaluación de exposición y efectos por los contaminantes en diferentes sitios debido a su facilidad de captura, amplia distribución y, como ya se demostró, a su susceptibilidad ante xenobióticos. Eso también puede dar la pauta para su utilización en estudios de laboratorio o bioensayos para comprender el comportamiento de los biomarcadores en este organismo. Además, se podría utilizar y extrapolar los biomarcadores con otras especies de ecosistemas similares, recordando, el ciclo de vida bifásico (larvas: ecosistemas acuáticos, adultos: ecosistemas terrestres) que tienen los anfibios como el sapo gigante.

Además, con la presente investigación se demostró que la utilización de muestras biológicas como sangre completa o plasma sanguíneo puede ser suficiente y de gran utilidad para determinar biomarcadores sin el sacrificio del organismo (no destructivo). Aunque el organismo evaluado no se encuentra bajo ningún estatuto de protección, en ocasiones por cuestiones de bioética se debe evitar el sacrificio de este. Aunado a esto, *Rhinella marina* presenta un amplio rango de distribución y cumple un importante rol ecológico en los ecosistema, lo cual con el uso de estos biomarcadores lo colocaría como un excelente biomonitor en otro tipo de sitios contaminados. Más aún, esto puede dar la pauta para utilizar este tipo de biomarcadores en sitios protegidos o donde solo se encuentran especies bajo protección especial o en peligro de extinción, debido a que solo se

necesitan muestras biológicas (plasma, sangre completa, orina) para determinarlos.

Las correlaciones encontradas sólo confirmaron que una batería de biomarcadores no destructivos es una herramienta útil para evidenciar la exposición y efectos por contaminantes. Estos biomarcadores podrían ser útiles en futuras investigaciones o monitoreos ambientales; debido a que se pueden obtener por métodos rápidos con la utilización de muestras biológicas como el plasma sanguíneo. Además la importancia de una batería de estas respuestas biológicas radica en que puede complementar la información indicando la magnitud de respuesta de los organismos a los contaminantes, así como, añadir un mayor peso de evidencia entre las causas de estas respuestas, la presencia de contaminantes en evaluaciones de riesgo ecológico o monitoreo ambiental para priorizar los sitios en una región contaminada y así tomar las decisiones adecuadas en cuanto a su remediación o mitigación.

LIMITACIONES

Así como el sapo gigante tiene ventajas en cuanto a ser un organismo biomonitor, también cuenta con desventajas, una de las más claras es que existe poca información con biomarcadores en este organismo, por lo que es difícil hacer comparaciones con otros estudios. Además cada investigación con anfibios ha utilizado métodos diferentes y algunos destructivos para determinar los biomarcadores, lo cual lo hace aún más difícil para comparar entre estudios.

Un monitoreo constante de los biomarcadores, en los sapos de laboratorio, podría haber dado una noción del comportamiento de estos en cuanto al tiempo o temporada.

Otros biomarcadores no destructivos (CAT, SOD, cortisol) podrían haber complementado la información acerca del estrés oxidativo en los organismos. Debido al tiempo y a las normas establecidas con algunos reactivos no se logró la estandarización de más métodos para determinar MDA y añadir los biomarcadores anteriormente mencionados.

La medición de biomarcadores por una sola temporada o solo una vez no puede evidenciar del todo los efectos a la salud de los organismos por los contaminantes. Es decir, hizo falta una determinación de biomarcadores por lo menos por estaciones del año. Debido a que cada biomarcador responde de manera diferente entre organismos (tanto individual como poblacional) en razón a la concentración de los contaminantes en los sitios donde residen y al tiempo de exposición. Así por ejemplo, el aumento de GST en ambas zonas de la cuenca baja del Río Coatzacoalcos, junto a las correlaciones con MDA y δ -ALAD podrían evidenciar un estado de compensación del sistema de los sapos gigantes. Sin embargo, para asimilar que este efecto puede ser reversible o irreversible en estos organismos faltó la inclusión de biomarcadores de daño específicos, como por ejemplo, transaminasas, que evidencian un daño hepático. Para así de esta manera funcione la batería de biomarcadores como diferentes autores indican.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Sería ideal que en futuras investigaciones se utilizarán biomarcadores específicamente que evidencien daño celular o en tejidos, para posteriormente establecer o diferenciar que sucede cuando los biomarcadores no responden de la manera esperada, que como ya se demostró, pueden tener relación entre sí, y con las correlaciones podría diferenciarse el porqué de su comportamiento. Además, es recomendable utilizarlos junto a parámetros fisicoquímicos y determinación de concentraciones de contaminantes, así como su utilización por temporadas; para así presentar suficiente información y peso de evidencia en evaluaciones de riesgo ambiental. Una herramienta útil que aumentaría esto es la integración de estos biomarcadores en un índice, para diferenciar cuales sitios en una región son los más afectados.

Así mismo, se recomienda realizar un registro de la batería de biomarcadores por temporadas o estaciones del año para finalmente dar una explicación más objetiva y añadir un mayor peso de evidencia, no solo de la exposición a contaminantes sino del efecto de estos al estado de la salud de los organismos en cuanto a su homeostasis, mecanismos de compensación y daños irreversibles.

Con la determinación de algunos biomarcadores en la presente investigación y su relación entre sí se pueden abrir otras líneas de investigación para elucidar los mecanismos o procesos en los que algunas enzimas están involucradas, sobre todo, para anfibios, debido a que existe poca información, y esto determinaría como pueden aplicarse o entender el comportamiento de los biomarcadores.

Se recomienda en futuras investigaciones con biomarcadores en la cuenca baja del Río Coatzacoalcos añadir más sitios de muestreo, incluso, establecer una referencia aguas arriba de la cuenca baja, es decir, incluir por lo menos la cuenca media (límite entre Oaxaca y Veracruz, que incluye en su mayoría municipios de Oaxaca sin actividades industriales) del Río Coatzacoalcos, donde por lo menos

se encuentran ecosistemas mayormente preservados en comparación a la región conformada por los municipios de Veracruz.

Con esta investigación se plantó la base para futuras investigaciones con biomarcadores en otros sitios contaminados. Dada la complejidad de diferentes escenarios de contaminación en México, se recomienda mejorar la batería de biomarcadores añadiendo parámetros antes mencionados, y otras respuestas biológicas en relación al tipo de escenario, como por ejemplo, la adición de metalotioneínas en evaluaciones de sitios contaminados con metales pesados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., y Siddiqui, M. K. J. (2006). Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition and oxidative stress in relation to blood lead among urban adolescents. *Human & Experimental Toxicology*, (25), 547–554.
- Albers, P. H. (1995). Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. En Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, A. G. y Cairns, J. (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology* (pp. 330–355), Ed. Lewis Publishers, Florida, EE. UU.
- Alford, R. (2010). Declines and the Global Status of Amphibians. En: Sparling, W.D., Linder, G., Bishop, A. C., y Krest, K.S. (Eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition* (pp. 13–45). Ed. CRC Press, EE. UU.
- Amiard, J. C., y Amiard-Triquet, C. (2013). Molecular and Histocytological Biomarkers. En: Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. y Rainbow, S. P. (Eds.), *Ecological Biomarkers* (pp. 75–106). Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., y Rainbow, S. P. (2013)a. Ecological Biomarkers Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Amiard-Triquet, C., Cossu-Leguille, C., y Mouneyrac, C. (2013)b. Biomarkers of Defense, Tolerance, and Ecological Consequences. En: Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. y Rainbow, S. P. (Eds.), *Ecological Biomarkers* (pp. 45–74). Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Androutsopoulos, V. P., Hernandez, A. F., Liesivuori, J., y Tsatsakis, A. M. (2013). A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*, 307, 89–94.
- Aranzazu-Taborda, D. A., De J-Rodríguez, B., y Duque-Agudelo, B. A. (2009). Endocrine disruption in fish. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25, 312–323.
- Armknecht, S. L., Kaattari, S. L., y Van Veld, P. A. (1998). An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*).

- Aquatic Toxicology*, 41(1–2), pp. 1–16.
- Arrieta, M. A., Bruzzone, L., Apartín, C., Rosenberg, C. E., Fink, N. E., y Salibián, A. (2004). Biosensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 224–230.
- Arrieta, M. A., Perí, S. I., Apartín, C., Rosenberg, C. E., Fink, N. E., y Salibián, A. (2000). Blood Lead Concentration and δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in Adult *Bufo arenarum*. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 108(3), 275–280.
- Arukwe, A., y Goksøyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 2, pp.1-21.
- Atland, D. P., y Brace, C. K. (1962). Red cell life span in the turtle. *Am. J. Physiol*, 203, 1188–1190.
- Attademo, A. M., Cabagna-Zenklusen, M., Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C., y Bassó, A. (2011). B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology*, 20(1), 274–282.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., y Fiorenza, G. (2007). Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*, 16(8), 533–539.
- Awasthi, Y. C. (2006). *Toxicology of Glutathione Transferases*. Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Baruch-Velázquez, J. A. (2010). Revisión Bibliográfica de Aspectos Hidrológicos, Bióticos, Especies Pesqueras de Interés Comercial y Contaminantes en el Río Coatzacoalcos. *Trabajo de Experiencia Profesional*. Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Beliaeff, B., y Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC*,

21(6), 1316–1322.

- Berlin, B. A., y Schaller, K. H. (1974). European Standardized Method for the Determination of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in Blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, Vol. 12: 389–390.
- Bervoets, L., y Blust, R. (2003). Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: Relationship with fish condition factor. *Environmental Pollution*, 126(1), pp. 9–19.
- Blake, A. (2005). The Next Generation of POPS : PBDEs and Lindane. *Keep the Promise, Eliminate POPs Campaign*.
- Blaxhall, P. C. (1972). The haematological assessment of the health of freshwater fish: a review of selected literature. *Journal of Fish Biology*, 4, pp. 593–604.
- Bögi, C., Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Steineck, C., Sinowatz, F., ... Kloas, W. (2003). Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*. *Environmental Research*, 93(2): 195–201.
- Bozada-Robles, L. y Bejarano-González, F. (2006). Los Contaminantes Orgánicos Persistentes en el Istmo Mexicano (1era ed.). México: Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM).
- Brasher, A. M. D., y Wolff, R. H. (2004). Relations between land use and organochlorine pesticides, PCBs, and semi-volatile organic compounds in streambed sediment and fish on the island of Oahu, Hawaii. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3): 385–398.
- Brodeur, J. C., Suarez, R. P., Natale, G. S., Ronco, A. E., y Elena Zaccagnini, M. (2011). Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), p. 1370–1380.
- Broeg, K., y Lehtonen, K. K. (2006). Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53(8–9): 508–522.
- Burýsková, B., Hilscherová, K., Bláha, L., Marsálek, B., y Holoubek, I. (2006). Toxicity and modulations of biomarkers in *Xenopus laevis* embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives.

- Environmental Toxicology*, 21(6), p. 590–8.
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., y Peltzer, P. M. (2006). Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin, *Toxicological y Environmental Chemistry*, Vol. 88(4): p. 37–41.
- Capo-Martí, M. A. (2007). Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. Editorial Tebar.
- Carmona, D. G., y Hernández, C. S. (2010). Registro de Géneros Florísticos por Municipio. En: Mendoza-Cantú, A., Cram-Heydrich, S., Sommer-Cervantes, I. y Oropeza-Orozco, O. (Eds.), *Atlas Regional de Impactos Derivados de las Actividades Petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz* (p. 45–52). SEMARNAT-UNAM-INECC, México.
- Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Hued, A. C., y Bistoni, M. D. L. Á. (2005). Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captured from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, 537(1–3), p. 25–33.
- Cecil, H. C., Bitman, J., Lillie, R. J., Fries, G. F., y Verrett, J. (1974). Embryotoxic and teratogenic effects in unhatched fertile eggs from hens fed polychlorinated biphenyls (PCBs). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(6), p. 489–495.
- Chopra, M., y Schrenk, D. (2011). Dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor signaling, and apoptosis-persistent pollutants affect programmed cell death. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(4), p. 292–320.
- Collier, A., Orr, L., Morris, J., y Blank, J. (2008). The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the mortality and growth of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Pseudacris triseriata*). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(5), p. 368–377.
- CONABIO (2015). Ficha Técnica para la Evaluación de los Sitios Prioritarios para la Conservación de los Ambientes Costeros y Oceánicos de México-Cuenca baja y delta del Río Coatzacoalcos, México.
- Cumanova, A., Gilca, G., y Orlova, N. (2008). The Fate of Persistent Organic

- Pollutants (POPs) in the Environment. En: Mehmetli, E. y Koumanova, B. (Eds.), *The Fate of Persistent Organic Pollutants in the Environment* (p. 161–171). Ed. Springer Netherlands.
- Darvesh, S., Hopkins, D. A., y Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(2), 131–138.
- Das, U. N. (2012). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. *Annals of Hepatology*, 11(3), 409–411.
- De Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., y Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1–2), p. 202–226.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A., y Amiard-Triquet, C. (2013). Origin of Energy Metabolism Impairments. En: Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. y Rainbow, S. P. (Eds.), *Ecological Biomarkers*, Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., y Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4): 316–328.
- Depledge, M. (1994). The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. En: Fossi, M. C. y Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (pp. 271–295). Ed. Lewis Publishers, EE. UU.
- Dohm, M. R., Mautz, W. J., Doratt, R. E., y Stevens, J. R. (2008). Ozone exposure affects feeding and locomotor behavior of adult *Bufo marinus*. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(5): 1209–16.
- Duellman, E. W., y Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians* (1era edición), Ed. The Johns Hopkins University Press, EE. UU.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report*, 85(1.11), p. 1–55.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., y Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochemical Pharmacology, 7(2), p. 88–95.

- Eriyamremu, G. E., Osagie, V. E., Omoregie, S. E., y Omofoma, C. O. (2008). Alterations in glutathione reductase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to Bonny Light crude oil and its fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1): 284–290.
- Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A., Ilizaliturri, C., González-Mille, D., Díaz-Barriga, F., y Mejía-Saavedra, J. (2010)a. Wild rodents (*Dipodomys merriami*) used as biomonitors in contaminated mining sites. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45(1), 82–89.
- Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri-Hernández, C. A., González-Mille, D. J., Costilla, R., Díaz-Barriga, F., Cuevas, M. del. C., Martínez, M. A. y Mejía-Saavedra, J. (2010)b. DNA damage in earthworms (*Eisenia* spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 45: 59–55.
- Espinosa-Reyes, G., González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Díaz-Barriga M. F., y Mejía-Saavedra, J. J. (2012). Exposure Assessment to Persistent Organic Pollutants in Wildlife : The Case Study of Coatzacoalcos, Veracruz Mexico. En Puzyn, T. y Mostrag-Slizchtyng, A. (Eds.), *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update* (pp. 114–134). Ed. InTech-Environmental Sciences.
- Espinosa-Reyes, G., Ilizaliturri-Hernández, C., González-Mille, D., Mejía-Saavedra, J., Nava, A. D., Cuevas, M., y Cilia-López, G. (2013). Contaminantes orgánicos persistentes en la cuenca baja del río Coatzacoalcos, Veracruz. En Botello, A. V., Rendón von Osten, J., Benítez, J. A., y Gold-Bouchot, G. (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (2da. edición, pp. 309–322). UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV- Unidad Mérida, México.
- European Trade Union Institute (ETUI). (2012). ISTAS: Volatile organic compounds (VOCs). [En Línea], Fecha de consulta: 31/Agosto/2016,

<http://risctox.istas.net/en/index.asp?idpagina=621>

- Ezemonye, L. I., y Enuneku, A. A. (2011). Haematological changes in *Bufo maculatus* treated with sublethal concentrations of Cadmium. *Journal of Xenobiotics*, 1(1): 35–37.
- Ezemonye, L., y Tongo, I. (2010). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81(2), p. 214–217.
- Fairbrother, A. (1994). Clinical Biochemistry. En: Fossi, M. C. y Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (pp. 63-91). Ed. Lewis Publishers, EE. UU.
- Feder, E. M., y Burggren, W. W. (1992). Environmental Physiology of the Amphibians, Ed. The University of Chicago Press, EE. UU.
- Fink, N., y Salibián, A. (2005). Toxicological studies in adult amphibians: Effects of lead. *Applied Herpetology*, 2(3): 311–333.
- Fiske, H. C., y Subbarow, Y. (1925). The Colorimetric Determination of Phosphorus. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(2), p. 375–400.
- Fossi, M. C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102 (Suppl. 12), p. 49–54.
- Fossi, M. C., y Leonzio, C. (1994). Nondestructive biomarkers in vertebrates. Ed. Lewis Publishers, EE. UU.
- Fossi, M. C., Leonzio, C., Massi, A., Lari, L., y Casini, S. (1992). Serum esterase inhibition in birds: a nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23(1), p. 99–104.
- Fossi, M. C., Leonzio, C., y Peakall, D. B. (1994). The Use of Nondestructive Biomarkers in the Hazard Assessment of Vertebrate Populations. En: Fossi, M. C. y Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (p. 3-36). Ed. Lewis Publishers, EE. UU.
- Fukuyama, T., Tajima, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Shutoh, Y., Harada, T., y Kosaka, T. (2010). Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides.

- Journal of Immunotoxicology*, 7(1): 39–56.
- Gagné, F. (2014). *Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods*. Ed. Elsevier Inc., EE. UU.
- García-Barreno, P. (2008). Inflamación. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas*, 102, p. 91–159.
- Gilot, D., Loyer, P., Corlu, A., Glaise, D., Lagadic-Gossmann, D., Atfi, A., Morel, F., Hichijo, H., y Guguen-Guillouzo, C. (2002). Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), p. 49220–49229.
- González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., y Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19, p. 1238–1248.
- González-Mille, D. J., Espinosa-Reyes, G., Rivero-Pérez, N. E., Trejo-Acevedo, A., Nava-Montes, A. D., e Ilizaliturri-Hernández, C. A. (2013). Persistent organochlorine pollutants (POPs) and DNA damage in giant toads (*Rhinella marina*) from an industrial area at Coatzacoalcos, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224, p. 1781-1795.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., y Siest, G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326(1–2), p. 131–142.
- Habig, W. ., Pabst, M. ., y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J Biol Chem*, 249, p. 7130.
- Hallegue, D., Rhouma, K. Ben, Krichah, R., y Sakly, M. (2002). Dieldrin initiates apoptosis in rat thymocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, p. 1147–1150.
- Hallgren, P., Mårtensson, L., y Mathiasson, L. (2009). Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish

- plasma—a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89(14), p. 1023–1042.
- Hampel, M., Blasco, J., y Díaz, M. L. (2016). Biomarkers and Effects. En: Blasco, J. Chapman, M. P., Campana, O. y Hampel, M. (Eds.), *Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues* (pp. 121–165), Ed. Academic Press, EE. UU.
- Hennig, B., Meerarani, P., Slim, R., Toborek, M., Daugherty, A., Silverstone, A. E., y Robertson, L. W. (2002). Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 181(3): 174–183.
- Hopkins, W. A., y Rowe, C. (2010). Interdisciplinary and Hierarchical Approaches for Studying the Effects of Metals and Metalloids on Amphibians. En: Sparling, W.D., Linder, G., Bishop, A. C., y Krest, K.S. (Eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition* (p. 325-336). Ed. CRC Press, EE. UU.
- Ilizaliturri, C. A, González-Mille, D., Pelallo, N. A, Mejía-Saavedra, J., Dosal, A. T., Pérez-Maldonado, I., ... Díaz-Barriga, F. (2009). Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Interciencias*, 34(2405), 710–717.
- Ilizaliturri-Hernández, C. A., González-Mille, D. J., Mejía-Saavedra, J., Espinosa-Reyes, G., Torres-Dosal, A., y Pérez-Maldonado, I. (2013). Blood lead levels, δ -ALAD inhibition, and hemoglobin content in blood of giant toad (*Rhinella marina*) to asses lead exposure in three areas surrounding an industrial complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, p. 1685–1698.
- INEEC (2009). Metales Pesados. [En Línea], Fecha de consulta: 16-Agosto-2016, <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>
- INEGI (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos-Coatzacoalcos, Veracruz de Ignacio de la Llave.
- Jaspers, V. L. B., Covaci, A., Voorspoels, S., Dauwe, T., Eens, M., y Schepens, P.

- (2006). Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in aquatic and terrestrial predatory birds of Belgium: Levels, patterns, tissue distribution and condition factors. *Environmental Pollution*, 139(2), p. 340–352.
- Jasso-Pineda, Y., Espinosa-Reyes, G., González-Mille, D., Razo-Soto, I., Carrizales, L., Torres-Dosal, A., ... Díaz-Barriga, F. (2007). An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead An Integrated Health Risk Assessment Approach to the Study of Mining Sites Contaminated With Arsenic and Lead. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3), 344–350.
- Jiang, H., y Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase and apoptosis: A novel perspective for an old enzyme. *FEBS Journal*, 275(4), p. 612–617.
- Kamath, A. B., Xu, H., Nagarkatti, P. S., y Nagarkatti, M. (1997). Evidence for the induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142(2), p. 367–377.
- Kannan, K., y Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3): 153–163.
- Kanter, A., y Celik, I. (2012). Acute effects of fenthion on certain oxidative stress biomarkers in various tissues of frogs (*Rana ridibunda*). *Toxicology and Industrial Health*, 28(4), p. 369–76.
- Kim, M. J., Pelloux, V., Guyot, E., Tordjman, J., Bui, L. C., Chevallier, A., Forest, C., Benelli, C., Clément, K., y Barouki, R. (2012). Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environmental Health Perspectives*, 120(4), p. 508–514.
- Kirby, M. F., Allen, Y. T., Dyer, R. A., Feist, S. W., Katsiadaki, I., Matthiessen, P., ... Waldock, M. J. (2004). Surveys of Plasma Vitellogenin and Intersex in Male Flounder (*Platichthys flesus*) As Measures of Endocrine Disruption By Estrogenic Contamination in United Kingdom Estuaries: Temporal Trends, 1996 To 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3), p. 748.
- Laborde, E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation*, 17(9), p. 1373–1380.

- Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernández, J. C., Stringhini, G., y Peltzer, P. M. (2004). Levels of Serum Cholinesterase Activity in the Rococo Toad (*Bufo paracnemis*) in Agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72: 586-591.
- Lajmanovich, R., Cabagna, M., Peltzer, P., Stringhini, G., y Sanchez-Hernandez, J. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2, p. 373–380.
- Lajmanovich, R. C., Sánchez-Hernández, J. C., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Fiorenza, G. S., Cabagna, M. C., y Bassó, A. (2008). Levels of plasma B-esterases and glutathione S-transferase activities in three South American toad species. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 90(6), p. 1145–1161.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Grenón, P. y Cabagna-Zenklusen, M. C. (2015). Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(12): 427-439
- Lampón, N., Hermida-Cadahia, E. F., Riveiro, A., y Tutor, J. C. (2012). Association between butyrylcholinesterase activity and low-grade systemic inflammation. *Annals of Hepatology*, 11(3), p. 356–363.
- Leite, P. Z., Margarido, T. C. S., De Lima, D., Rossa-Feres, D. C., y De Almeida, E. A. (2010). Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(8), p. 1411–1421.
- Leonzio, C., y Fossi, M. C. (1994). Nondestructive Biomarker Strategy: Perspectives and Applications. En: Fossi, M. C. y Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates* (p. 279-311). Ed. Lewis Publishers, EE. UU.
- Linder, G., Krest, S. K., y Sparling, D. W. (2003). *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*. Ed. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Florida, EE. UU.

- Linder, G., Palmer, B., Little, E., Rowe, C., y Henry, P. (2010)a. Physiological Ecology of Amphibians and Reptiles. En: Sparling, W.D., Linder, G., Bishop, A. C., y Krest, K.S. (Eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition* (p. 105-166). Ed. CRC Press, EE. UU.
- Linder, G., Lehman, C., y Bidwell, J. (2010)b. Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles in a Nutshell. En: Sparling, W.D., Linder, G., Bishop, A. C., y Krest, K.S. (Eds.) *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition* (p. 69-103). Ed. CRC Press, EE. UU.
- Linzey, D., Burroughs, J., Hudson, L., Marini, M., Robertson, J., Bacon, J., Nagarkatti, M. y Nagarkatti, P. (2003). Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *International Journal of Environmental Health Research*, 13(2), p. 125–148.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., y De Poorter, M. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A Selection From the Global Invasive Species Database. Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
- Ludewig, G., Robertson, L. W., y Glauert, H. P. (2013). Carcinogenicity and Mechanisms of Persistent Organic Pollutants. En: Carpenter, O. D. (Ed.), *Effects of Persistent and Bioactive Organic Pollutants on Human Health* (pp. 57–100). Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Luk'ianov, O. N., y Ireĭkina, S. A. (2011). Glutathione-S-transferase as a molecular biomarker of the state of marine organisms influenced by anthropogenic pressure. *Izvestiia Akademii Nauk. Serii Biologicheskaja / Rossiiskaia Akademiia Nauk*, 38(4), p. 456–462.
- Mandal, P. K. (2005). Dioxin: A review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 175(4), p. 221–230.
- Marks, T. A., Kimmel, G. L., y Staples, R. E. (1981). Influence of symmetrical polychlorinated biphenyl isomers on embryo and fetal development in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 61(2), p. 269–276.

- Mann, R. M., Vijver, M. G., y Peijnenburg, W. J. G. M. (2011). Metals and Metalloids in Terrestrial Systems: Biomagnification and Subsequent Adverse Effects. En: Sánchez-Bayo, F., Van den Brink, P. y Mann, M. R. (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* (pp. 43–62), Ed. Bentham e Books.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1–2), p. 83–95.
- Martin, J. B., y Doty, D. M. (1949). Determination of Inorganic Phosphate. *Analytical Chemistry*, 21(8): 965–967.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., y Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 34(4), p. 531–545.
- McCoy, K. A., Bortnick, L. J., Campbell, C. M., Hamlin, H. J., Guillette, L. J., y St. Mary, C. M. (2008). Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environmental Health Perspectives*, 116(11), p. 1526–1532.
- Medina-Garza, H. (2012). Uso De Biomarcadores En Peces Como Herramienta Para Evaluar La Exposición y Efecto De Contaminantes Ambientales En Cuerpos De Agua. *Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Ambientales*. Programa Multidisciplinario de Posgrados en Ciencias Ambientales de la Agenda Ambiental de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Mejía-Saavedra, J., Ilizaliturri-Hernández, C., Espinosa-Reyes, G., González-Mille, D., Cilia-López, G., y Díaz-Barriga, F. (2014). Uso de bioindicadores para la evaluación integrada del riesgo en sitios contaminados de México. En González-Zuarth, C.A., Vallarino, A., Pérez-Jiménez, J.C. y Low-Pfeng, A.M. (Eds.), *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental*. Chiapas, México: Colegio de la Frontera Sur: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.
- Mendoza-Cantú, A., Cram-Heydrich, S., Sommer-Cervantes, I. y Oropeza-Orozco, O. (2010). Atlas Regional de Impactos derivadas de las actividades petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz, SEMARNAT-UNAM-INECC, México.

- Molhave, L. (1991). Volatile organic compounds, indoor air quality and health. *Indoor Air*, 1(4), p. 357–376.
- Morales-Mávil, J. E., y Suárez-Domínguez, A. (2010). Registro de género de vertebrados por municipio. En Mendoza-Cantú, A., Cram-Heydrich, S., Sommer-Cervantes, I. y Oropeza-Orozco, O. (Eds.), *Atlas Regional de Impactos Derivados de las Actividades Petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz* (pp. 53–65), SEMARNAT-UNAM-INECC, México.
- Mouneyrac, C., Durou, C., y Péry, A. (2013). Consequences of Energy Metabolism Impairments. En: Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. y Rainbow, S. P. (Eds.), *Ecological Biomarkers*, Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Munisway, D., Marigoudar, R. S., Patil, K. V., y Halappa, R. (2012). Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2), p. 127–134.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., y Rojas del Castillo, E. (2013). Biomarkers of Exposure for Assessing Environmental Metal Pollution: From Molecules To Ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 29(1), p. 117–140.
- Northwest Life Science Specialities, L. (2010). NWLSS (TM) Malondialdehyde Assay Kit.
- Ochoa-Ochoa, L., Correa-Cano, M., Flores-Villela, O., García-Vázquez, U., y Canseco-Márquez, L. (2006). *Bufo marinus* (Sapo gigante). Área de distribución potencial. Fecha de consulta: 13-Septiembre-2016, [En línea: http://conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/bufo_marigw.xml?_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no]
- Ortiz-Ordoñez, E., López-López, E., Sedeño-Díaz, J. E., Uría, E., Morales, I. A., Pérez, M. E., y Shibayama, M. (2016). Liver histological changes and lipid peroxidation in the amphibian *Ambystoma mexicanum* induced by sediment elutriates from the Lake Xochimilco. *Journal of Environmental Sciences*, 46: 156–164.
- Palmer, B. D., y Palmer, S. K. (1995). Vitellogenin induction by xenobiotic

- estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl. 4), p. 19–25.
- Palmer, B. D., Huth, L. K., Pioto, D. L., y Selcer, K. W. (1998). Vitellogenin As a Biomarker for Xenobiotic Estrogens in an Amphibian Model System. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1), p. 30.
- Parkinson, A., Ogilve, W. B., Buckley, B. D., Kazmi, F., Czerwinski, M. y Parkinson, O. (2013). Biotransformation of Xenobiotics. En: Klassen, D. C. (Ed.), *Casarett & Doull's Toxicology The basic Science of poisons* (8va ed.), Ed. McGraw Hill Education, EE. UU.
- Pelallo-Martínez, N. A., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Carrizales-Yáñez, L., y González-Mille, D. J. (2011). Assessment of exposure to lead in humans and turtles living in an industrial site in Coatzacoalcos Veracruz, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, p. 642–645.
- Pérez-Maldonado, I. N., Díaz-Barriga, F., De La Fuente, H., González-Amaro, R., Calderón, J., y Yáñez, L. (2004). DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Environmental Research*, 94(1), p. 38–46.
- Pérez-Maldonado, I. N., Herrera, C., Batres, L. E., González-Amaro, R., Díaz-Barriga, F., y Yáñez, L. (2005). DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environmental Research*, 98(2), p. 177–184.
- Pizzatto, L., y Shine, R. (2008). The behavioral ecology of cannibalism in cane toads (*Bufo marinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(1), p. 123–133.
- Rao, A. A., Sridhar, G. R., y Das, U. N. (2007). Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 69(6), p. 1272–1276.
- Repetto, M., Semprine, J., y Boveris, A. (2012). Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Lipid Peroxidation*, p. 3–30.
- Rice, T. M. R., Blackstone, B. J. B., Nixdorf, W. L. N., y Taylor, D. H. T. (1999).

- Exposure To Lead Induces Hypoxia-Like Responses in Bullfrog Larvae (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(10): 2283–2288.
- Riojas-Rodríguez, H., Baltazar-Reyes, M. C., y Meneses, F. (2008). Volatile Organic Compound Presence in the Environmental Samples Near a Petrochemical Complex in Mexico. *Epidemiology*, 19(1), p. 219.
- Rocha, J. B. T., Saraiva, R. A., Garcia, S. C., Gravina, F. S., y Nogueira, C. W. (2012). Aminolevulinate dehydratase (δ -ALAD) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicology Research*, 1(2), p. 85–102.
- Roche, H., y Bogé, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41(1), p. 27–43.
- Roméo, M., y Giambérini, L. (2013). History of Biomarkers. En: Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. y Rainbow, S. P. (Eds.), *Ecological Biomarkers* (15-44), Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Roos, W. P., y Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), p. 440–450.
- Root, M. (1990). Biological monitors of pollution. *BioScience*, 40(2), p. 83–86.
- Rosales-Hoz, L., y Carranza-Edwards, A. (2005). Estudio Geoquímico de Metales en el estuario del Río Coatzacoalcos. En Botello, A. V., Rendón von Osten, J., Benítez, J. A., y Gold-Bouchot, G. (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (2da. edición, pp. 389–406). UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida, México.
- Rosenthal, J. G., y Luster, I. M. (1994). Immunotoxicity and Inflammation: An Overview. En Lawrence, B. S. y Debra, L. L. (Eds.), *Xenobiotics and Inflammation* (pp. 1–16). Ed. Academic Press, EE. UU.
- Ruíz-Saucedo, U. (2006). Guía Técnica para Orientar la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgo Ambiental de Sitios Contaminados, SEMARNAT-INECC.
- Safe, S. (1989). Polychlorinated biphenyls (PCBs): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 220(1), p.

31–47.

- Safe, S. H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 24: 87–149.
- Sakamoto, M. K., Mima, S., Kihara, T., y Tanimura, T. (2004). Sequential morphological changes of erythrocyte apoptosis in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Anatomical Record Part a- Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 279A(1), p. 652–663.
- Sakamoto, M. K., Mima, S., Takahashi, K. P., y Tanimura, T. (1997). Apoptotic cell death of erythrocytes in *Xenopus* larvae exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicologic Pathology*, 25(4), p. 398–402.
- Samaniego-Herrera, A., Peralta-García, A. y Aguirre-Muñoz, A. (2007). Vertebrados de las islas del Pacífico de Baja California-Guía de Campo (1era. Edición), Grupo de Ecología y Conservación de Islas, A.C., México.
- Sánchez-Guerra, M., Pelallo-Martínez, N., Díaz-Barriga, F., Rothenberg, S. J., Hernández-Cadena, L., Faugeron, S., ... Quintanilla-Vega, B. (2012). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 742(1–2), p. 66–71.
- Sánchez-Hernández, J. C. (2003). Evaluating reptile exposure to cholinesterase-inhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 22(2): 296–301.
- Sarkar, S., Yadav, P., y Bhatnagar, D. (1997). Cadmium-Induced Lipid Peroxidation and the Antioxidant System in Rat Erythrocytes: the Role of Antioxidants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 11(1), p. 8–13.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M., y Benson, W. (2008). Biomarkers. En: Di Giulio, T. R. e Hinton, E. D., *The Toxicology of Fishes* (pp. 683–731), Ed. CRC Press, EE. UU.
- SEDESOL. (n.d.). Programa de ordenamiento ecológico de la cuenca baja del Río

Coatzacoalcos.

- SEMARNAT. (2013). Registro de Emisiones y Transferencias de Contaminantes (RETC). Fecha de consulta: 14-Agosto-2015, En Línea: <http://apps1.semarnat.gob.mx/retc/retc/index.php>
- SEMARNAT y CONAGUA. (2014). Programa de medidas preventivas y de mitigación de la sequía-Consejo de Cuenca Río Coatzacoalcos (1era. edición), CONAGUA, México.
- Sharma, R., Yang, Y., Sharma, A., Awasthi, S., y Awasthi, Y. C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6(2): 289–300.
- Shi, Y., Song, Y., Wang, Y., Liang, X., Hu, Y., Guan, X., ... Yang, K. (2009). P,p'DDE induces apoptosis of rat sertoli cells via a fasl-dependent pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Sibley, P. K., y Hanson, M. L. (2011). Ecological Impacts of Organic Chemicals on Freshwater Ecosystems. En: Sánchez-Bayo, F., Van den Brink, P. y Mann, M. R. (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* (pp. 138-164), Ed. Bentham e Books.
- Slatinská, I., Smutná, M., Havelková, M., y Svobodová, Z. (2008). Review article: Biochemical markers of aquatic pollution in fish-glutathione S-transferase. *Folia Veterinaria*, 52(3–4), p. 129–134.
- Smets, J., Cogălniceanu, D., Băncilă, R. I., Hartel, T., y Plăiașu, R. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31(4), p. 558–562.
- Solís, F., Ibáñez, R., Hammerson, G., Hedges, B., Diesmos, A., Matsui, M., ... Ponce, P. (2009). *Rhinella marina*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2009*.
- Sommer, S. I., Cram, H. S., y Oropeza, O. O. (2010). Unidades de Suelos Dominantes. En Mendoza-Cantú, A., Cram-Heydrich, S., Sommer-Cervantes, I. y Oropeza-Orozco, O. (Eds.), *Atlas Regional de Impactos Derivados de las Actividades Petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz* (pp. 35-38), SEMARNAT-

- UNAM-INECC, México.
- Sparling, W. D., Linder, G., Bishop, A. C., y Krest, K. S. (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. SETAC Technical Publications Series*. (2nd ed.). CRC Press, Florida, EE.UU.
- Stringer, R., Labunska, I., y Bridgen, K. (2001). Organochlorine and heavy metal contaminants in the environment around the Complejo Petroquímicos Paharitos, Coatzacoalcos, Mexico, *Greenpeace: Basta de Contaminación "Expedición Las Américas"*.
- Suter II, G. W. (2006). *Ecological Risk Assessment* (2a ed.). USA, CRC Press/Taylor & Francis.
- Sweet, L. I., Passino-Reader, D. R., Meier, P. G., y Omann, G. M. (1999). Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers*, 4(4), p- 237–253.
- Tebourbi, O., Rhouma, K. B., y Sakly, M. (1998). DDT induces apoptosis in rat thymocytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(2), p. 216–223.
- Thomas, P. T., y Hinsdill, R. D. (1978). Effect of polychlorinated biphenyls on the immune responses of rhesus monkeys and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 44(1), p. 41–51.
- Thompson, H. M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8(5): 369–384.
- Tokar, J. E., Boyd, A. W., Freedman, H. J., y Waalkes, P. M. (2013). Toxic Effects of Metals. En: Klassen, D.C. (Ed.), *Casarett & Doull's Toxicology The basic Science of poisons* (8va ed., pp. 981–1030). Ed. McGraw Hill Education, EE. UU.
- Trujillo-Vázquez, S. K., Gómez-Olivares, J. L., Ramírez-Romero, P., y López-Luna, M. A. (2016). Marcadores enzimáticos de exposición a contaminantes con efectos hepatotóxicos en *Crocodylus moreletti* (Crocodylia: Crocodylidae) del estado de Tabasco, Memorias del VII Congreso AMEQA 2016, México.
- US Environmental Protection Agency (EPA). (2016). Technical Overview of Volatile Organic Compounds. Fecha de consulta: 31-Agosto-2016, En Línea:

<https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/technical-overview-volatile-organic-compounds>

- Van der Oost, R., Beyer, J., y Vermeulen, P. E. N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), p. 57–149
- Vázquez-Botello, A., y Páez, F. (1987). *El Problema Crucial: La Contaminación* (1era ed.). Centro de Ecodesarrollo, México.
- Vázquez-Botello, A., Villanueva-Fragoso, S., y Rosales-Hoz, L. (2004). Distribución y contaminación de metales en el Golfo de México. En: Caso, M., Pisanty, I. y Ezcurra, E. (Eds.), *Diagnóstico ambiental del Golfo de México* (2da ed., p. 683–711), SEMARNAT-INECC, México.
- Vega-López, A., Martínez-Tabche, L., Domínguez-López, M. L., García-Latorre, E., Ramón-Gallegos, E., y García-Gasca, A. (2006). Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 142(3–4 SPEC. ISS.), p. 356–364.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero de Castro, A., Anguiano, O. L., Gauna, L., Fonovich de Schroeder, T., y Pechen de D'Angelo, A. M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 8(3–4), p. 167–186.
- Walker, C. H. (2009). *Organic pollutants: An Ecotoxicological Perspective*. Ed. CRC Press/Taylor & Francis, EE. UU.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., y Peakall, D. B. (2012). *Principles of Ecotoxicology* (4ta ed.). Ed. CRC Press, EE. UU.
- Walker, C. H. (2014). *Ecotoxicology: Effects of Pollutants on the Natural Environment*, Ed. CRC Press, EE. UU.
- Wallace, R. A., y Bergink, W. E. (1974). Amphian Vitellogenin: Properties, Hormonal Regulation of Hepatic Synthesis and Ovarian Uptake, and Conversion to Yolk Proteins. *American Zoologist*, (14), p. 1159–1175.
- Wallace, R. A., y Jared, D. W. (1969). *Studies on Amphibian Yolk*. VII. The

- Estrogen-Induced Hepatic Synthesis of a Serum Lipophosphoprotein and Its Selective Uptake by the Ovary and Transformation into Yolk Platelet Proteins in *Xenopus laevis*. *Development Biology*, (19), p. 498–526.
- Wang, M. Z., y Jia, X. Y. (2009). Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology*, 18(1), 94–99.
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press.
- Weyts, F. A. A., Verburg-Van Kemenade, B. M. L., Flik, G., Lambert, J. G. D., y Wendelaar-Bonga, S. E. (1997). Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 11(2), p. 95–105.
- Willett, K. L., McDonald, S. J., Steinberg, M. A., Beatty, K. B., Kennicutt, M. C., y Safe, S. H. (1997). Biomarker sensitivity for polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in two marine fish species collected in Galveston Bay, Texas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(7), p. 1472–1479.
- Wolmarans, N. J. (2015). The relationship between organochlorine pesticide exposure and biomarker responses of amphibians in the lower Phongolo River floodplain.
- Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12), p. 35–45.
- Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S., y Awasthi, Y. C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochimica Polonica*, 50(2), 319–336.
- Zhang, H., Cai, C., Shi, C., Cao, H., Han, Z., y Jia, X. (2012). Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog *Rana limnocharis*. *Aquatic Toxicology*, 122–123, p. 67–74.
- Zhang, X. J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J. P., He, H. Y., Jin, Q. H., ... Shi, Y. F. (2002). Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death and Differentiation*, 9(8), p. 790–800.
- Zhang, X.-J., y Greenberg, D. S. (2012). Acetylcholinesterase Involvement in

Apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(April), p. 1–6.

Zug, G. R., y Zug, P. B. (1979). The Marine Toad, *Bufo marinus*: A Natural History Resumé of Native Populations. *Smithsonian Contributions to Zoology*, (284), p. 1–58.

Zupanovic, Z., Musso, C., Lopez, G., Louriero, C. L., Hyatt, A. D., Hengstberger, S., y Robinson, A. J. (1998). Isolation and characterization of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Diseases of Aquatic Organisms*, 33(1), p. 1–9.

ANEXOS

ANEXO A. Preparación de soluciones para la determinación de cada biomarcador.

A.1 Preparación de soluciones para la determinación de GST en microplaca de 96 pocillos

Reactivos

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), agua desionizada, glutatión reducido (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), alcohol absoluto.

Preparación de soluciones

- *Buffer fosfato pH 6.5.* Pesar 1.59 g de NaH_2PO_4 , disolver en 20 mL de agua desionizada, completar hasta 85 mL con agua, y ajustar pH a 6.5 con solución correspondiente. Aforar a 100 mL con matraz volumétrico.
- *GSH 50 mM.* Pesar 0.384 g de GSH y disolver con 5 mL de buffer fosfato, aforar con esta misma solución a 25 mL en matraz volumétrico. Almacenar en frasco ámbar. Preparar solución de trabajo al momento de la determinación, diluir a 15 mM con buffer fosfato, dependiendo de las muestras que se tengan. La solución stock es estable por dos semanas.
- *CDNB 50 mM.* Pesar 0.253 g de CDNB y disolver en 5 mL de alcohol absoluto, posteriormente aforar a 25 mL en matraz volumétrico con la misma solución. Almacenar en frasco ámbar muy bien cerrado. Preparar solución de trabajo al momento de la determinación, diluir a 3 mM con alcohol absoluto, dependiendo de las muestras que se tengan. La solución stock es estable por dos semanas.

Notas

- Si se necesita diluir el plasma del organismo, se debe de hacer con el buffer fosfato, esto para tener la mejor similitud posible con el blanco analítico.

A.2 Preparación de soluciones para la determinación de MDA con el kit NWLSS

La determinación de malondialdehído se sigue tal y como menciona el kit NWLSS™ Malondialdehyde Assay de la empresa Northwest Life Science Specialties.

Preparación de soluciones

- *Ácido tiobarbitúrico (TBA)*. Al frasco ámbar marcado como TBA del kit, añadir 10.5 mL de agua desionizada, mezclar con agitar magnético hasta disolver el TBA. Almacenar a temperatura ambiente, no se debe colocar en refrigeración.
- *Otros reactivos*. El kit incluye ácido fosfórico y butilhidroxitolueno (BHT) previamente preparados y listos para ser utilizados en el ensayo. La curva de calibración se realiza con tetrametoxipropano, el cual también los estándares se incluyen en el kit.

Notas

- Una vez preparado el reactivo de TBA no se debe refrigerar, porque este se precipita y no puede utilizarse en el ensayo. Se debe almacenar a temperatura ambiente y utilizarse antes de una semana.
- El kit se almacena de 2-8°C.

A.3 Preparación de soluciones para la determinación de BChE en microplaca de 96 pocillos

Trisma base (Tris), ácido acético, ioduro de butirilcolina (BTCI), ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), fosfato de potasio (KH_2PO_4), ácido etildiaminotetraacético (EDTA).

Preparación de soluciones

- Buffer Tris-acetato. Preparar 100 mM de buffer a pH 7.4. Disolver 1.21 g de Tris en 90 mL de agua, ajustar a pH 7.4 con ácido acético 10% y completar en un matraz volumétrico a 100 mL con agua desionizada.
- *Ioduro de butirilcolina (BTCI)*. Preparar solución 1 mM de BTCI una hora antes de la determinación. Pesar 50 mg de BTCI, disolver en 15 mL de buffer tris-acetato pH 7.4, aforar a 50 mL con el mismo buffer. Guardar en frasco ámbar. El reactivo preparado tiene una estabilidad en refrigeración de 1 a 2 semanas.
- *Reactivo de Ellman*. Preparar una solución stock de 5 mM de ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) en buffer fosfato-EDTA. Disolver 1.36 g de KH_2PO_4 y 4.5 mg de EDTA en 80 mL de agua desionizada. Ajustar a pH 7.2 y agregar 0.2 g de DTNB, completar a 100 mL con agua desionizada. Esta solución stock es estable por 2 meses en frasco ámbar protegido de la luz. Para preparar la solución de trabajo se diluye 1:5 la solución stock de DTNB en 100 mM de buffer tris-acetato.

Notas

- Si se necesita diluir el plasma del organismo, se debe de hacer con el buffer fosfato, esto para tener la mejor similitud posible con el blanco analítico.

A.4 Preparación de soluciones para la determinación de ALAD

Reactivos

Ácido delta aminolevulínico (ALA), p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB), fosfato de sodio monobásico y dibásico (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4), ácido acético glacial, ácido tricloroacético (TCA), ácido perclórico (70%).

Preparación de soluciones

- *Buffer de fosfatos pH 6.4.* Preparar 100 mL de fosfato de sodio monobásico 0.1 M (pesar 1.56 g de NaH_2PO_4 , disolver con agua desionizada y aforar a 100 mL con matraz volumétrico) y 50 mL de fosfato de sodio dibásico 0.1 M (pesar 0.71 g de Na_2HPO_4 , disolver en agua desionizada y aforar a 50 mL). Mezclar 71 mL del primero con 29 mL del segundo, ajustar el pH a 6.4 y conservar en refrigeración a 4°C.
- *Buffer sustrato.* Disolver 0.01676 g de ALA en 5 mL de NaH_2PO_4 0.1 M. Ajustar a pH 6.4 con fosfato dibásico 0.1 M. Completar a 10 mL con buffer fosfato pH 6.4. Conservar en refrigeración a 10°C (si se usará al momento) o -18°C (si se utilizará en los próximos días).
- *Reactivo de Erlich.* Disolver 0.24 g de p-DMAB en 7.2 mL de ácido acético glacial, agregar 1.92 mL de ácido perclórico y completar a un volumen de 12 mL con ácido acético glacial. Este reactivo debe prepararse al momento de su uso.
- *TCA 10%.* Pesar 10 g de TCA y disolver en 20 mL de agua desionizada, aforar a 100 mL en matraz.

A.5 Preparación de soluciones para la determinación de VTG

Reactivos

Ácido tricloroacético (TCA), etanol absoluto, éter, cloroformo, acetona, hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), molibdato de amonio, ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, sulfito de sodio (Na₂SO₃) y bisulfito de sodio (NaHSO₃).

Preparación de soluciones

- *TCA 20%*. Pesar 20 g de TCA y disolver en 50 mL de agua desionizada, aforar a 100 mL para obtener la solución a 20%.
- *Etanol-éter-cloroformo (2-2-1)*. Mezclar 20 mL de etanol absoluto, 20 mL de éter y 10 mL de cloroformo para obtener esta solución. Guardar en frasco muy bien cerrado. Se debe preparar al momento de su uso.
- *NaOH 2 N*. Pesar 8 g de NaOH y disolver en 35 mL de agua desionizada, aforar a 100 mL en matraz.
- *HCl 2 N*. Tomar 16.423 mL de HCl y adicionarlo a 25 mL de agua desionizada lentamente. Ajustar a 100 mL en matraz volumétrico.
- *H₂SO₄ 2.5 N*. Adicionar lentamente 3.507 mL de H₂SO₄ a 25 mL de agua desionizada, ajustar a 50 mL en matraz volumétrico.
- *Molibdato ácido 5%*. Pesar 0.5 g de molibdato de amonio y disolver en 5 mL de H₂SO₄ 2.5 N, aforar a 10 mL con este mismo ácido. Se debe preparar al momento de su uso.
- *Reductor de Fiske y SubbaRow*. Pesar 5.44 g de NaHSO₃, 1.2 g de Na₂SO₃ y 0.1 g de ácido 1, 2,4-aminonaftol sulfónico, disolver en 20 mL de agua desionizada, ajustar a 50 mL en matraz volumétrico. Se debe preparar al momento de su uso.

A.6 Preparación de soluciones para determinación de ciclo celular en paquete eritrocitario de sapos gigantes

Reactivos

Buffer fosfato salino (PBS), formaldehído, yoduro de propidio, ARNasa A, citrato de sodio, tritón x-100.

Preparación de las soluciones

- *PBS pH 7.4.* Disolver una tableta del reactivo PBS (P4417-100TAB) en 200 mL de agua desionizada.
- *Solución fijadora de células.* Preparar formaldehído 3% en buffer PBS pH 7.4.
- *Solución de yoduro de propidio con ARNasa.* Pesar 50 mg de citrato de sodio. Disolver en 10 mL de buffer PBS, añadir 0.15 mL de tritón x-100, 250 µL de ARNasa A, y 1.25 mL de yoduro de propidio, aforar a 50 mL con PBS en matraz volumétrico.

ANEXO B. Implementación de biomarcadores (BChE y GST) en el laboratorio

B.1 Implementación de BChE

Para la implementación en laboratorio de esterasas se eligió la BChE, debido a que tiene mayor presencia en el plasma de la sangre en comparación con AChE (Thompson, 1998), y a su vez el plasma se obtiene de una manera no destructiva (Fossi *et al.* 1993).

Se hicieron pruebas preliminares con dos técnicas: la reportada por Thompson (1998) y la de Attademo *et al.* (2007), bajo el esquema de la Figura 22, y se eligió la que presentó menor variabilidad y fue adaptable a microplaca de 96 pocillos.

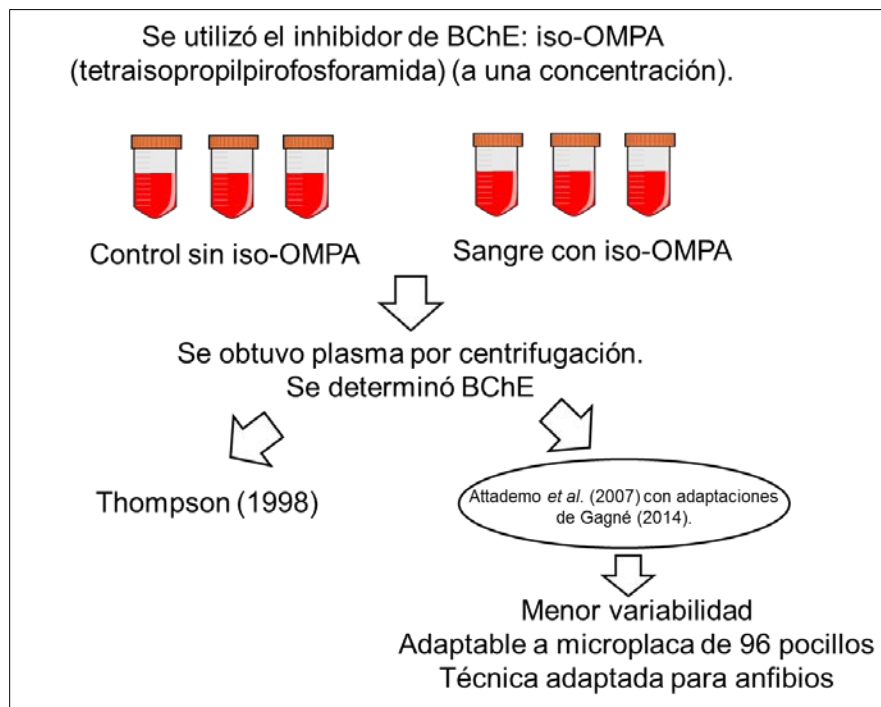


Figura 22. Elección de método para determinación de BChE en plasma de *R. marina*

Posteriormente para el primer diseño experimental de implementación de BChE se utilizó un compuesto organofosforado (malatión). La sangre completa de sapo gigante fue expuesta a concentraciones mínimas basadas en una investigación llevada a cabo por Alias *et al.* (2011). La implementación se realizó bajo el esquema de la Figura 23

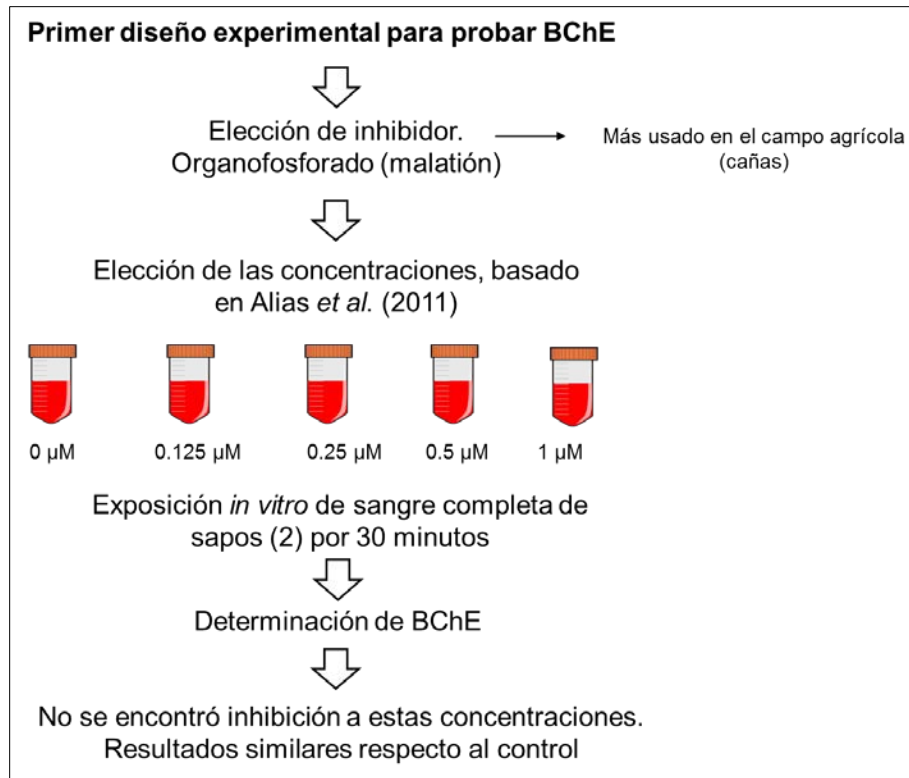


Figura 23. Primer diseño experimental para la implementación de BChE en plasma de sapo gigante.

Con este primer diseño experimental se encontró que las concentraciones utilizadas no mostraron inhibición de BChE en plasma de sapo gigante, por lo cual se procedió a elegir concentraciones mayores de malatión como se muestra en el esquema de la Figura 24. Posteriormente con las concentraciones obtenidas se procedió a realizarse la inhibición de BChE con un mayor número de individuos (7) de laboratorio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25. El análisis estadístico (ANOVA, $p < 0.05$) demostró una disminución significativa de BChE en la sangre de sapo gigante expuesta a $100 \mu\text{M}$ de malatión. De igual forma se observa una tendencia a disminuir la actividad de BChE al aumentar las concentraciones de malatión. Por lo cual se concluyó que BChE respondió como un biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados.

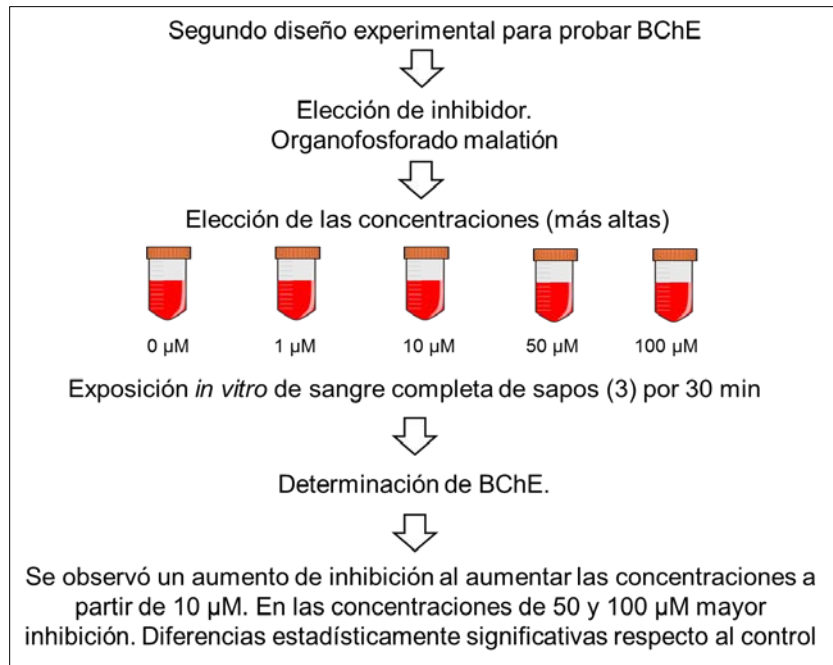


Figura 24. Segundo diseño experimental para la implementación de BChE en plasma de sapo gigante

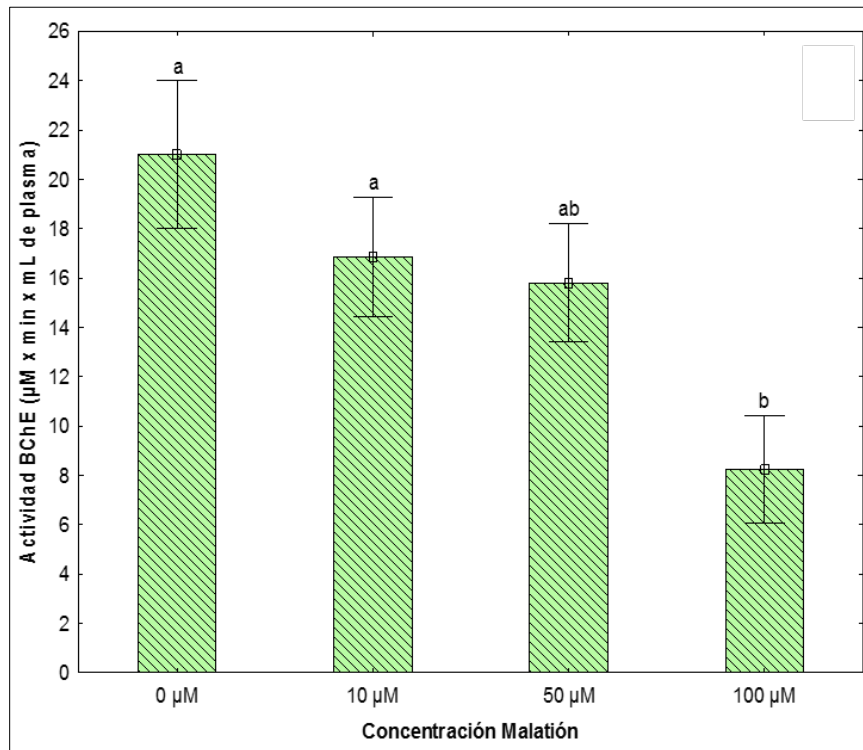


Figura 25. Actividad BChE en plasma de sangre completa expuesta a malatión comercial (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 7$).

B.2 Implementación de GST

En cuanto a la actividad de GST, para los experimentos preliminares no se utilizó ningún compuesto que ocasionara su inducción, debido a que no se encontró en la revisión bibliográfica ningún estudio donde *in vitro* (sangre completa) se indujera la actividad de GST, por lo cual era necesario exponer a los organismos a contaminantes *in vivo*, es decir, que tuvieran contacto por vía dermal o ingesta, esto podría haber ocasionado la muerte u otros efectos en los organismos, lo cual era indeseable. Por tal motivo, solo se hicieron pruebas para determinar que técnica era la ideal para la determinación de GST. Se procedió con el esquema de la Figura 26.

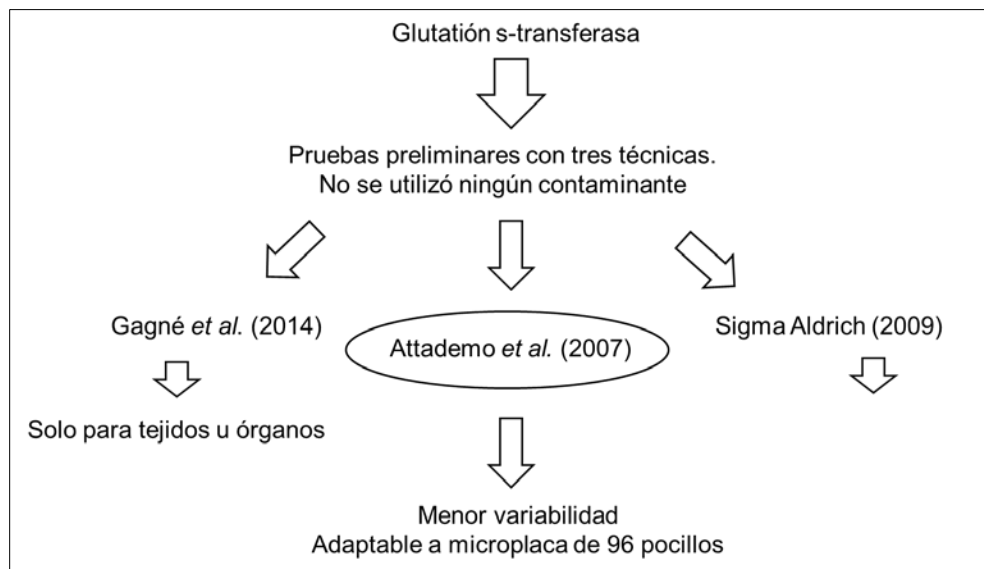


Figura 26. Elección de técnica ideal para determinación de actividad de GST en plasma de sapo gigante.

Se encontró que la técnica de Attademo *et al.* (2007), la cual era una adaptación de las técnicas propuestas por Habig *et al.* (1974) y Habous *et al.* (2002) para plasma de anfibios. Esta técnica obtuvo una menor variabilidad, y además fue adaptable a microplaca de 96 pocillos, la cual permite un mayor manejo de muestras y réplicas, además de realizar la determinación con mayor rapidez en el lector UV-Visible de placas, en comparación con cubetas de cuarzo. Posteriormente se procedió a realizar exposición *in vitro* (sangre completa) a

malatión para determinar en el plasma la actividad de BChE y GST, aunque este último podría ser que no mostrará respuesta alguna (Figura 27).

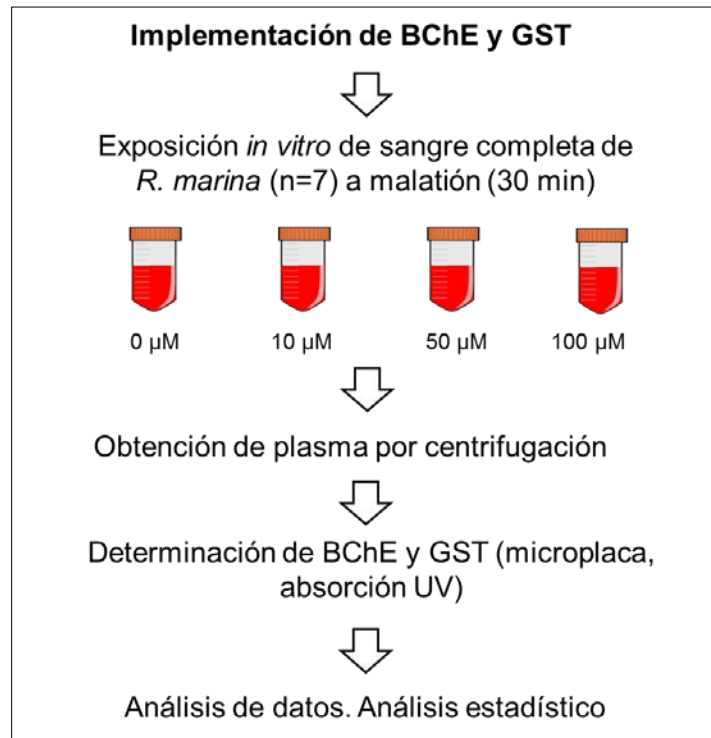


Figura 27. Implementación de BChE y GST en sangre de sapo gigante

Los resultados de actividad de GST mostraron una disminución significativa en la sangre expuesta a 100 µM de malatión en comparación al control (ANOVA, $p < 0.05$) (Figura 28).

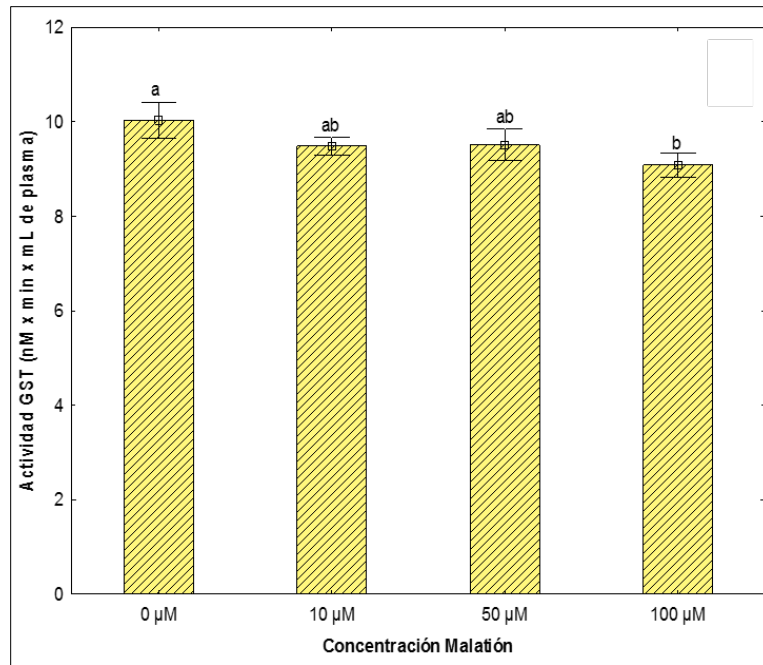


Figura 28. Actividad GST en plasma de sangre completa expuesta a malatión comercial (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 7$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE LOS ANEXOS

- Alias, S. A., Al-Zubaidy, H. I. M., Mousa, J. Y. y Mohammad, K. F. (2011). Plasma and whole brain cholinesterase activities in three wild bird species in Mosul, IRAQ: In vitro inhibition by insecticides, *Interdiscip. Toxicol.*, Vol. 4(3): 144-148.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna, M., y Fiorenza, G. (2007). Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology*, 16(8), 533–539.
- Fossi, M.C. y Leonzio, C. (1993). *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, CRC Press, EE. UU., p. 6.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S. y Siest, G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity, *Clinica Chimica Acta*, 326: 131-142.
- Habig, H. W., Pabst, J. M. y Jakoby, B. W. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, 249:7130-7139.
- Thompson, H. M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8(5), 369–384.