Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

TESIS

Evaluación de la exposición a plaguicidas organoclorados en el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) y su efecto en biomarcadores hematológicos.

POR

Carlos Eduardo Covantes Rosales

Tesis aprobada por la

UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestría en Ciencias

Mazatlán, Sinaloa, México. Enero de 2014

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director.

Dr. Pablo Wong Gonzáles
Director General del CIAD, A.C.
APROBACIÓN

APROBACIÓN

Los miembros de este comité designado para revisar la tesis de Carlos Eduardo Covantes Rosales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo ambiental.

Dra. Luz Maria García de la Parra
Directora de Tesis

Dr. Miguel Betancourt Lozano
Asesor

Dr. José Alfredo Castillo Guerrero
Asesor

M. en C. Gabriela Aguilar Zárate
Asesora

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico.

Al Centro de Investigación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán por permitirme realizar mis estudios de maestría.

A Los proyectos “Monitoreo ecológico y ecotoxicológico en la comunidad de aves marinas en la Bahía de Santa María (BSM): establecimiento de líneas base para el uso de bioindicadores en decisiones de manejo ambiental (FMCN – Pronatura)” y “Aves marinas como indicadores ambientales de sistemas costeros de importancia ecológica (Ciencia Básica – CONACYT)” por la aportación económica para realiza los viajes a campo y el análisis de los plaguicidas y los análisis de los biomarcadores.

A mi comité de tesis Dra. Luz María García de La Parra, Dr. José Alfredo Castillo Guerrero, Miguel Betancourt Lozano y Juan Pablo Ceyca Contreras, por sus valiosas aportaciones en la preparación de esta tesis.

Nuevamente a mi directora de tesis Dra. Luz María García de la Parra, por transmitirme su sabiduría, por toda su paciencia, las enseñanzas, consejos, por el tiempo que me dedicó y sobre todo por su entera disposición.

Nuevamente al Dr. Alfredo Castillo Guerrero, por su valiosa ayuda en la escritura y revisión de la tesis, particularmente por ayuda en los análisis estadísticos, por enseñarme y ayudarme en todo el trabajo de campo, sus consejos en los muestreos, consejos, por compartir su conocimiento y amistad.

A la Dra. Olivia Torres Bugarín por enseñarme la técnica de micronúcleos, despejar todas las dudas, compartir valiosa información bibliográfica y por recibirnos en su casa.

A la IBQ. Carmina Isabel Vargas Gómez y a la M.C Gabriela Aguilar Zárate por enseñarme la metodología de extracción y detección de plaguicidas organoclorados y por realizar en tiempo los análisis de los plaguicidas organoclorados, asimismo por su ayuda en la corrección de la metodología e interpretación de los resultados, a la M.C Irma Eugenia Martínez Rodríguez por su ayuda al resolver dudas, a las tres les agradezco su ayuda y los buenos momentos que tuve en el laboratorio de cromatografía.

Al laboratorio de parasitología CIAD Unidad Mazatlán y a la Universidad Politécnica de Sinaloa por permitirme usar los microscopios para los conteos diferenciales y el acceso a la sus instalaciones.

Al Dr. Pablo Almazán Rueda coordinador de postgrado y amigo, gracias por abrirme las puertas del CIAD, y por su ayuda durante todo el tiempo del postgrado.

A mis profesores, gracias por compartir su conocimiento y enseñanzas. Dr. Arturo Ruiz Luna, Dr. César Berlanga Robles, M.C Héctor G. Plascencia Gonzáles, Dr. Albert M. Van der Heiden, Dr. Omar Calvario Martínez, Dr. Juan P. Madrid Vera. Dr. Miguel Betancourt Lozano, Dra. Silvia Alejandra García Gasca y Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez.

A mis compañeros de laboratorio, M.C Anny B. Sánchez Garayzar, M.C Daniel Brito Rojas, M.C Jesús Efrén Astorga Rodríguez, M.C Juan Pablo Ceyca contreras, M.C José Belisario Leyva Morales y al M.C Edgar Cruz Acevedo, gracias por compartir bibliografía y por sus valiosas recomendaciones.

Nuevamente al M. en C Juan Pablo Ceyca contreras, por su amistad, por su ayuda en la colecta de muestras, por sus consejos para el manejo de las aves, por compartir información bibliográfica y por sus revisiones, observaciones y tiempo invertido en la tesis.

Nuevamente al M en C. Jesús Efrén Astorga Rodríguez, por su amistad, su entera disposición y ayuda en la redacción de la tesis, ayuda en la interpretación de resultados y sobre todo por el tiempo invertido en la tesis.

A mis compañeros de clase, África Paulina Gómez Castillo, Asahel Benítez Hernández, Cathy Valdéz Domínguez, Daniel A. Palacios Gonzáles, Emyr Saúl Peña Marín, Erika Y. Sánchez Gutiérrez. Julia Torres, María de los Ángeles M. Laurel Sandoval, Patsy Gómez Picos, Rodrigo Vieyra Bustos, por los muy buenos momentos que pasamos y sobre todo por su amistad.

A la MC. Elda Izaguirre Flores por su apoyo en la búsqueda bibliográfica y su amistad.

A mi familia (Francisco Covantes Camacho, Irene rosales Campos, Francisco y Rodolfo Covantes Rosales y Terry) por su apoyo incondicional en todo momento

A mis compañeros de campo, José Alfredo Castillo Guerrero, Juan Pablo Ceyca Contreras, Miriam Lerma Lizárraga, Carolina Espinosa, Alberto Piña Ortiz, por su ayuda en el trabajo de campo, colecta de muestras y compartir bibliografía.

A los Sres, pamboleros por los buenos momentos que pasamos en la cancha.

Al L.I.A. Jorge Alberto Duran Niebla por el apoyo en cuestión de ofimática y papelería.

DEDICATORIA

A mi familia, amigos y novia.

Contenido:

Índice de figuras ..... **ix**

Índice de tablas ..... **xii**

Indice de anexos ..... **xiii**

Resumen ..... **xiv**

I.- Introducción **1**

II.- Antecedentes **4**

2.1 Plaguicidas organoclorados 4

2.1.1 Plaguicidas organoclorados en la costa de Sinaloa 6

2.2 Efectos de los contaminantes en aves y otros organismos acuáticos. 9

2.3 Especie de estudio 10

2.4 Biomarcadores 12

2.4.1 Hematología 14

2.4.1.1 Relación Heterófilos-Linfocitos 17

2.4.1.2 Micronúcleos 19

III.- Problema **22**

IV.- Hipótesis **23**

V.- Objetivo General: **24**

5.1 Objetivos particulares: 24

VI.- Materiales y Métodos **25**

6.1 Zona de estudio 25

6.1.1 Isla El rancho 26

6.1.2 Isla El Farallón de San Ignacio 26

6.2 Muestreos 27

6.2.1 Captura de los organismos 28

6.2.2 Medidas morfométricas 29
6.2.3 Muestreo sanguíneo.....31
6.4 Análisis de plaguicidas organoclorados.....32
6.4.1 Extracción de plaguicidas organoclorados en plasma.....32
6.4.2 Limpieza EPA 3630c 33
6.4.3 Detección y cuantificación de pOCs (CG-DCE) 34
6.3 Análisis de biomarcadores.....35
6.3.1 Relación Heterófilo/Linfocito.....35
6.3.2 Análisis de los micronúcleos 36
6.3.3 Índice de condición IC 37
6.5 Análisis de datos.....38
6.5.1 Relación heterófilo-linfocito (H/L).....39
6.5.2 Frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares 39
6.5.3 Índice de condición.....40
6.5.4 Concentraciones de plaguicidas organoclorados 40
6.5.5 Relación entre las concentraciones de los pOCs y biomarcadores**¡Error! Marcador**
VII.- Resultados 42
7.1 Concentraciones de plaguicidas organoclorados 42
7.2 Relación heterófilo-linfocito (H/L).....56
7.3 Ensayo de micronúcleos.....62
7.4 Índice de condición 67
7.5. Relación entre las concentraciones de los pOCs y biomarcadores 69
VIII.- Discusión 73
IX.- Conclusiones.....85
X.- Recomendaciones.....87
XI.- Citas Bibliográficas.....88
XII.- Anexos 122

Índice de figuras

Pág.

Figura 2.1 Estructuras de algunos plaguicidas organoclorados, A: DDT y sus metabolitos DDD y DDE, B: Aldrín y dieldrín, C: HCHs (Harrison 2001). 6

Figura 2.2 Pareja de bobos de patas azules *Fotografía: Juan Pablo Ceyca Contreras* 11

Figura 2.3 Diagrama de la hematopoyesis en aves. Célula madre pluripotencial, unidades formadoras de colonias (CFU) multipotenciales, CFU restringidas y células maduras en sangre. Modificado de: Ross *et al.,* 2007 15

Figura 6.1 Isla el Rancho y Farallón de San Ignacio noroeste de Sinaloa, NW de México. Batimetría de la zona y dispersión de las colonias durante la alimentación (circulo) 25

Figura 6.2 Ubicación geográfica de isla el Rancho, en Bahía Santa María, Angostura Sinaloa 26

Figura 6.3 Ubicación geográfica de isla el Farallón de San Ignacio, Topolobampo, Ahome, Sinaloa 27

Figura 6.4 Captura e inmovilización del ave 29

Figura 6.5 Patas de un ejemplar de *Sula nebouxii*, la línea roja simboliza la ubicación del tarso del ave donde se tomó la medida morfométrica, para medir el tarso el ave se colocó boca arriba y se doblaba la pata para facilitar la medida 30

Figura 6.5 Cabeza de una hembra de *Sula nebouxii*, la línea roja simboliza el sitio donde se realizó la medida del culmen del ave, el culmen es la zona que comprende desde la punta del pico hasta la base del mismo donde comienza el plumaje de la cabeza del ave 30

Figura 6.7 Ejemplar de *Sula nebouxii* en vuelo, la línea roja simboliza el sitio donde se realizó la medida de la ulna del ave. Como se puede apreciar en la imagen la ulna es el hueso ubicado en la parte media del ala 31

Figura 6.8 Representación de la columna plástica preparada para la limpieza con silica gel, (EPA, 1996). 33

Figura 6.9 Frotis sanguíneo clásico. 35

Figura 7.1 Concentración (ng/ml) promedio de pOCs en plasma de *Sula nebouxii*, en adultos y pollos 43

Figura 7.2 Concentración (ng/ml) de plaguicidas organoclorados en las etapas reproductivas, en ambas islas. 43

Figura 7.3 Concentraciones de los grupos de plaguicidas las islas FSI e IER, respecto al día juliano estandarizado 55

Figura 7.4 Relación del índice H/L respecto al tiempo de manipulación 57

Figura 7.5 Comparación entre edades (Adultos y Pollos) en ambas islas respecto a H/L 58

Figura 7.6 Comparación entre sexos en ambas islas respecto a H/L 59

Figura 7.7 Comparación del índice H/L, para cada una de las etapas reproductivas en ambas islas. 60

Figura 7.8 Valores promedio del índice H/L, así como su desviación estándar para cada una de las etapas reproductivas en FSI e IER con la corrección de covariados. 61

Figura 7.9 Representación gráfica de los parámetros encontrados en el ensayo de Micronúcleos: Micronúcleos en Eritrocitos A) Policromáticos (MNEPC) y B) Normocromáticos (MNENC); y Prolongaciones Nucleares "*Bud Cells*" en Eritrocitos C) Policromáticos (BCEPC) y D) Normocromáticos (BCENC) 62

Figura 7.10 Índice de condición observada en etapa reproductiva y sexos en ambas islas, FSI n=72 arriba y IER n=54 abajo. 68

Figura 7.11 Relación entre la concentración de Σ DDT y el índice H/L. 69

Figura 7.12 Relación entre la concentración de pOCs y la frecuencia de BECT. 70

Figura 7.13 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC. 70

Figura 7.14 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC 71

Figura 7.15 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC 71

Figura 7.16 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC 72

Figura 7.17 Índice H/L (cortejo) respecto al tamaño de puesta observado (incubación). 72

Figura 8.1 Fechas de surgencias en el Golfo de California, en la costa de Sinaloa se presentan en invierno-primavera, Tomado de oceanografía de mares mexicanos, (De la Lanza Espino, 1991) 76

Figura 12.1 Frotis sanguíneo del bobo de patas azules (*S. nebouxii*) que muestra eritrocitos teñidos con la tinción Wright-Giemsa. (100x) 112

Figura 12.2 Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*, que muestra un linfocito con tinción Wright- Giemsa (100x) 113

Figura 12.3 Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*, mostrando dos heterófilos teñidos con la tinción Wright- Giemsa (100x) 113

Figura 12.4 Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*. Que muestra un Eosinófilo teñido con la tinción Wright-Giemsa (100x) 114

Figura 12.5 Frotis de la especie *Sula nebouxii*, que muestra a un Basófilo marcado con una flecha y a un heterófilo, bajo la tinción de Wright-Giemsa (100x) 115

Figura 12.6 Frotis de la especie *Sula nebouxii*, en la que se muestra un monocito teñido bajo la tinción de Wrigth-Gimesa (100x) 115

Figura 12.7 Frotis de la especie *Sula nebouxii*, que muestra un gran grupo de trombocitos, las células están teñidas con la tinción de Wright- Giemsa (100x) 116

Figura 12.8 Índice H/L entre las etapas reproductivas, se muestran los valores observados en los conteos y valores predichos por el modelo AIC 117

Figura 12.9 Zona de alimentación del bobo de patas azules, en IER, en la etapa de crianza 121

Índice de tablas

Pág.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de algunos plaguicidas organoclorados. (Walker, 2001). 5

Tabla 2.2 Clasificación taxonómica de *Sula nebouxii*. . 11

Tabla 2.3 Características del dimorfismo sexual del bobo de patas azules (Nelson, 1978). 200 11

Tabla 2.4 Tipos de células sanguíneas y sus diferentes funciones (Ross y Pawlina 16

Tabla 6.1 Número de muestras colectadas por época de la temporada reproductiva: cortejo, incubación y crianza, en Isla el Rancho (IER), e Isla el Farallón de San Ignacio (FSI); Además el organismo al cual se extrajo la muestra. H: hembra, M: macho, P: pollo. 28

Tabla 7.1 Resultados del modelo lineal generalizado de la sumatoria de cada grupo de plaguicida y la su sumatoria total Σ pOC's, calculadas para los diferentes factores e interacciones evaluadas. N.S: No significativa p>0.05, los valores en negrita (p<0.05). 51

Tabla 7.2 Concentración (ng ml $^{-1}$) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados y sumatoria de los grupos en plasma sanguíneo. H: Hembras, M: Machos. En ambas islas por separado. 52

Tabla 7.3 Concentración (ng/ml) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados en plasma sanguíneo, en las etapas de la temporada reproductiva (Co: Cortejo, In: Incubación, Cr: Crianza). 53

Tabla 7.4 Conteo diferencial de leucocitos e Índice H/L de aves marinas[1] y de *S. nebouxii*. 56

Tabla 7.5 Promedio y deviación estándar de los diferentes parámetros de la prueba de micronúcleos, en ambos sexos, etapas de la temporada reproductiva y edades. 66

Tabla 12.1 Bitácora de colocación de GPS. 121

Índice de anexos

	Pág.
Anexo I Conteo diferencial de leucocitos e índice H/L de distintas especies de aves marinas.	104
Anexo II Valor promedio de la proporción de micronúcleos (MN) en algunas especies de aves por cada 10,000 eritrocitos (tomada de Cruz-Acevedo 2012).	106
Anexo III Procedimiento para realizar el conteo diferencial de glóbulos blancos.	107
Anexo IV Procedimiento para realizar la pruebas de Micronúcleos y anormalidades nucleares	109
Anexo V Gráfica y coeficiente de regresión y de la ulna y peso para *Sula nebouxii*	111
Anexo VI Caracterización de las células sanguíneas	112
Anexo VII Modelo AIC	117
Anexo VIII Frecuencia y número total de muestras de los plaguicidas organoclorados y metabolitos detectados en ambas islas.	119
Anexo IX. Colocación GPS	120

Resumen

En Sinaloa, existen humedales costeros importantes donde habitan los bobos de patas azules, dentro de los cuales, isla El Rancho (IER) ubicada en Bahía Santa María y la isla El Farallón de San Ignacio (FSI) en Bahía de Topolobampo se encuentran influenciados por campos agrícolas donde se practica el cultivo intensivo y una de sus principales características es el uso de plaguicidas químicos, entre los que se usaron durante mucho tiempo, están los plaguicidas organoclorados (pOCs). El bobo de patas azules (*Sula nebouxii*), es un ave piscívora que habita en islas del Golfo de California, se encuentran en grandes grupos y son residentes de los sistemas a estudiar, resulta muy sencillo capturarlos y se puede contar con suficiente material biológico para su análisis. En el presente estudio, se determinaron las concentraciones de pOCs en plasma de bobo de patas azules, durante su época reproductiva (periodo 2012-2013) en ambas islas. Se tomaron muestras tanto de adultos (ambos sexos) como de pollos. Se utilizaron biomarcadores sanguíneos para evaluar la condición inmunológica (índice heterófilo-linfocito) y citogenética (ensayo de micronúcleos) de los organismos (en cortejo, incubación y crianza) y se detectaron 17 pOCs, donde cinco sobresalieron por frecuencia y cantidades detectadas (endrin ketona, HCH α y β, p-p' DDE y trans-Clordano), predominando, las mayores concentraciones durante el cortejo (al inicio de la temporada reproductiva) ($p= 0.002$), asimismo se encontraron diferencias entre adultos y pollos, siendo los adultos los que presentaron mayores concentraciones de pOCs ($p= 0.01$), encontrándose concentraciones de pOCs, muy similares entre las islas y sexos. El índice heterófilo-linfocito H/L, presentó valores relativamente bajos (0.77 ± 0.42) comparados con los reportados para otras especies de aves marinas, con diferencias significativas entre islas (FSI>IER; $p=0.00007$), edad (adultos>pollos; $p=0.0013$) y etapa reproductiva (co>in>cr; $p=0.026$). La frecuencia de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos (MNENC) mostró diferencias entre islas (IER>FSI; $p=0.038$), los micronúcleos en eritrocitos

policromáticos fueron diferentes entre las etapas reproductivas (co<in<cr; p=0.014). Mientras que las anormalidades nucleares en eritrocitos, tanto policromáticos y normocromáticos, presentaron diferencias entre islas, sexos y etapa reproductiva ($p<0.05$). La relación entre biomarcadores y concentraciones de pOCs, sólo la concentración del ΣDDE se relacionó con el índice H/L (GLM, b=0.223 F=5.784 p=0.0176). Se encontró que la concentración de ΣpOCs se relacionó con las anormalidades nucleares en 10,000 eritrocitos (BCET) (GLM, b=-0.017, F=6.025 p=0.01) Hubo relación entre los micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNEPC) y las concentraciones de ΣHeptacloro (GLM, b= F= 4.722, p= 0.032), ΣEndrín (GLM, b=-0.088, F=, p=0.0258) y ΣpOCs (b, -0.015, GLM, p=0.0150). Se observó que existe una relación entre la tasa de eritropoyesis y la concentración de ΣDDT (GLM, b=0.156, F= 5.868 p=0.0172).

Palabras clave: Plaguicidas organoclorados, *Sula nebouxii,* Inmunosupresión, genotoxicidad.

I.- Introducción

El noroeste de México tiene relevancia a nivel nacional, tanto por la importancia económica de sus agroecosistemas, donde se han utilizado plaguicidas de manera intensiva, como por la importancia de sus ecosistemas acuáticos (lagunas, bahías, esteros, marismas, etc.), los cuales son sitios de alta productividad. En Sinaloa hay humedales muy productivos que son usados por muchas especies de aves acuáticas (Howell y Webb, 1995), ya sea para la reproducción o para pasar el invierno. El estado de Sinaloa, es considerado como uno de los estados con mayor desarrollo agrícola. Es el primer lugar a nivel nacional en valor de producción, practicándose principalmente la agricultura intensiva. Los altos niveles de producción se deben en gran medida a los desarrollos de nuevas tecnologías, donde se usan, en la mayoría de las ocasiones, grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas para lograr el óptimo desarrollo de los cultivos (Astorga-Rodríguez, 2011).

Los plaguicidas son compuestos, utilizados para matar plagas. Existe una amplia variedad de plaguicidas, entre los que encuentran los organoclorados (pOCs), organofosforados, carbamatos, piretroides etc. En el caso de los pOCs, son compuestos que su uso ha disminuido, tanto por la aparición en el mercado de compuestos de nueva generación (más eficientes) así como por la presión internacional para evitar su uso (convenios de Róterdam y Estocolmo).Debido a su alta persistencia, el uso de estos compuestos implica que su destino final, son los ambientes terrestres y acuáticos, afectando negativamente a los organismos que los habitan, El efecto suele ser mayor en organismos depredadores, pues estos compuestos se acumulan y se magnifican a través de la cadena trófica.

En aves, los pOCs, se depositan en tejidos tales como el tejido abdominal, la molleja, el sartorio, el mesenterio o formando parte de otros tejidos grasos (hígado, esqueleto, piel) (Cahaner *et al*. 1987), donde suelen estar inactivos, sin embargo, cuando se usan las reservas almacenadas durante la migración o la reproducción, los depósitos adiposos se movilizan y de esta manera los pOCs son liberados al torrente sanguíneo, donde pueden ocasionar efectos tóxicos (Albert *et al*., 1990). Uno de los primeros efectos adversos reportados de los pOCs fue el adelgazamiento de los cascarones de los huevos, ocasionado por el DDT, específicamente por su metabolito DDE (King *et al.,* 2003). La exposición a éste y otros plaguicidas tiene efectos en la salud y esto puede acarrear fracasos reproductivos y reducción en las poblaciones de aves silvestres, incluso se ha observado la muerte por intoxicación aguda después de la aplicación de pOCs (Carson, 1962; Albert *et al*., 1990; Blus *et al*., 1997; Walker, 2001; Giesy *et al*., 2003).

El uso de pOCs genera problemas de salud, tanto a la fauna silvestre como a la población humana. Desde hace décadas, se ha generado información acerca de los efectos negativos de estos compuestos en los ecosistemas. Una de las herramientas utilizadas para evaluar los efectos sobre los ecosistemas, es el uso de organismos bioindicadores, los cuales reflejan cambios en la condición del ambiente o indicando la presencia de contaminantes. La salud los bioindicadores se evalúa a través de respuestas llamadas biomarcadores o marcadores biológicos. Según Shugart y McCarthy (1990), los biomarcadores son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante". Entonces, la combinación de una especie adecuada (bioindicador) y un biomarcador eficiente, facilitaría el monitoreo de contaminantes. En caso de encontrarse alteraciones en la salud de estos organismos, pueden servir como focos de alerta temprana de problemas por contaminación.

El bobo de patas azules (*S. nebouxii*) reúne una serie de condiciones para ser considerado como una especie bioindicadora o centinela, por ejemplo: 1) Durante la reproducción, anidan en el suelo, en grandes grupos, por lo que es sencillo capturarlos y darles seguimiento, 2) Tienen un intervalo de forrajeo definido, cercano a sus colonias, 3) Son aves piscívoras, que ocupan los niveles superiores de la cadena trófica, 4) Son residentes de los ecosistemas donde habitan, 5) Es una especie longeva, por lo que acumulan los pOCs. En este contexto, el objetivo de este trabajo o tesis fue evaluar la relación entre la concentración de pOCs y la salud del bobo de patas azules, para ser utilizado como organismo centinela de los ecosistemas costeros. El establecimiento de un monitoreo de este tipo también tendría implicaciones en la salud pública, pues las aves y los humanos son usuarios del mismo ecosistema, incluso pueden explotar recursos similares. El uso de las aves marinas como organismos centinelas, puede servir como un sistema de alerta de los problemas por contaminación.

II.- Antecedentes

2.1 Plaguicidas organoclorados

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas organoclorados (pOCs) son compuestos formados principalmente por átomos de carbono, hidrógeno y cloro. Son hidrocarburos cíclicos, de origen sintético con diferentes grados de cloración. Sus propiedades fisicoquímicas (Tabla 2.1), les confieren las propiedades de ser lipofílicos, resistentes a la degradación biológica y tendiente a la bioacumulación (Hurme y Puhakka, 1999; Iwate *et al.*, 1994).

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de algunos plaguicidas organoclorados. (Walker, 2001).

Compuesto químico	Descripción	S. A. (mg/L)	Log Kow	P. V (mmHg) (25°C)
p.p´-DDT	Sólido, p.f 108°C	<0.1	6.36	1.9×10^{-7} (20°C)
p-p´-DDE		7.97	5.70	
p-p´-DDD		4.81	6.00	
Aldrín	Sólido, p.f. 104 °C	<0.1	5.30	1.9×10^{-7}
Dieldrín	Sólido, p.f. 178°C	0.2	5.48	1.9×10^{-7}
Endrín		0.2	5.20	3×10^{-6} (20°C)
Heptacloro	Sólido, p.f. 93 °C	0.056	5.44	1.9×10^{-7}
Endrín	Sólido, p.f 226-230 °C	0.2	5.34	1.9×10^{-7}
Endosulfán α	Sólido, p.f. 79-100 °C	0.15	3.55	
Endosulfán β		0.06	3.62	
HCH- γ	Sólido p.f. 112 °C	7.0	3.78	1.9×10^{-7}

p.f: punto de fusión; S.A: solubilidad en agua; Log Kow: coeficiente de partición octanol-agua P.V: presión de vapor.

De los pOCs, el más conocido y estudiado es el DDT (Dicloro difenil tricloroetano), el cual fue sintetizado por primera vez en 1874, pero sus propiedades como insecticida se descubrieron hasta 1939, cuando se usó para proteger la lana contra la polilla. Desde entonces ha sido empleado para enfrentar todo tipo de plaga artrópoda (Restrepo, 1988). Después de la Segunda Guerra Mundial, los pOCs empezaron a ser usados de manera indiscriminada especialmente en Norte América, Gran Bretaña y Japón. En México, el empleo de estos plaguicidas se inició a mediados de la década de los 40´s (Rueda, 1993).

Los pOCs pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs), los cuales son sustancias químicas que permanecen en el ambiente por largos periodos de tiempo, se bioacumulan en los tejidos y se biomagnifican a través de la cadena trófica. Estos compuestos pueden causar efectos adversos a la salud humana y al medio ambiente. (European Commission, 2012).

Los pOCs, de acuerdo a su estructura química, son clasificados en cinco grupos: DDT y análogos, hexaclorociclohexano (HCH), cicloideos y compuestos similares (aldrín, dieldrín, endrín, heptacloro y endosulfán), toxafeno y compuestos relacionados, y estructuras tipo mirex y clordecone (Smith, 1991) la estructura quimica de algunos pOCs se muestra en la Figura 2.1.

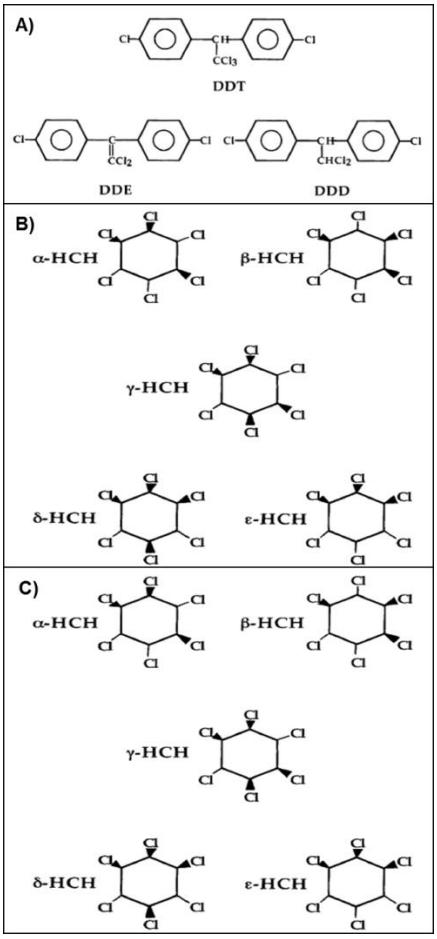


Figura 2.1 Estructuras de algunos plaguicidas organoclorados, **A**: DDT y sus metabolitos DDD y DDE, **B**: Aldrín y dieldrín, **C**: HCHs (Harrison 2001).

2.1.1 Plaguicidas organoclorados en la costa de Sinaloa

Se sabe que los pOCs causan daños a humanos y fauna silvestre. Gran cantidad de estudios han descrito sus efectos sobre las poblaciones de aves silvestres, prácticamente desde el momento en que empezaron a emplearse a partir de la década de los 40s (Albert *et al.,* 1996; Espín, 2010). Estudios de

campo han demostrado que tras la aplicación de grandes cantidades de DDT se producía una reducción inmediata (mortalidad) de las poblaciones de aves y algunos invertebrados (Hotchkiss y Pough, 1946; Albert *et al*., 1990). Sin embargo, en México los estudios de los efectos de compuestos clorados en fauna, en especial en aves, son más recientes. A partir de la década de los 60s hay estudios sobre el tema, la mayoría se enfocaron principalmente en la determinación cuantitativa y cualitativa de pOCs y metales pesados en el ambiente y en la biota (Galindo *et al*., 1992; Páez-Osuna *et al.,* 2002; Gonzáles-Farias *et al*., 2003; 2006).

En los ecosistemas costeros de Sinaloa, se ha demostrado la presencia de pOCs, tanto en agua y sedimento, como en biota. En los organismos estos compuestos son adquiridos, principalmente a través de la dieta, los valores de concentración mayores se han detectado en organismos de niveles tróficos superiores (aves piscívoras principalmente), aparentemente relacionado con procesos de bioconcentración y biomagnificación. (Albert *et al*., 1990; Galindo *et al*., 1992; 2002; Páez-Osuna *et al*., 2002; González-Farías *et al*., 2002).

Dos zonas costeras que se encuentran rodeadas de grandes superficies, donde se practica la agricultura intensiva, son Bahía Santa María y Bahía de Topolobampo. En estas zonas se han utilizado pOCs por mucho tiempo (más de 30 años) y aún hoy en día se siguen aplicando. Y es por medio de diversos mecanismos (arrastre durante por las lluvias, adsorción a partículas del sedimento, lixiviación, etc.) que pudieron ingresar a los ecosistemas acuáticos (García-González, 2007).

Entre los estudios realizados en la costa de Sinaloa se encuentran los siguientes:

- Galindo *et al* (1992), determinaron plaguicidas en agua, sedimentos, almejas (*Anadara sp.)* y camarones (*Penaeus sp*.) de ecosistemas costeros de Sinaloa, uno de ellos fue la bahía de Santa María. Encontrando niveles elevados de lindano, en los meses de mayo-junio.

- Por otro lado, Hernández y Fierro (1994) realizaron una evaluación de las concentraciones de pOCs en agua, sedimentos y almeja (*Chione qnidia*) recolectadas en descargas de drenes agrícolas, en dos sistemas lagunares en el norte de Sinaloa (Topolobampo y la Lechuguilla). En sedimento encontraron predominantemente endosulfán y heptacloro (325-396 y 1.5-39 ug/Kg, respectivamente), y en agua, de igual manera, encontraron los mismos pOCs, sin embargo, en concentraciones muy inferiores (0.33-33.7 ug/l) pero no lo suficiente para encontrarse en niveles permitidos de acuerdo a la Ley General de Protección al Ambiente.
- Gonzalez-Farias *et al* (1997) realizaron un estudio en el sistema lagunar Altata-Ensenada del Pabellón para detectar residuos de pOCs, en muestras de sedimento, peces, almejas, mejillónes y ostiones. Ellos encontraron altas concentraciones de DDT y sus metabolitos DDD y DDE, en promedio se encontraron niveles máximos, en peso seco, de 245 ng/g para peces, seguido por ostiones (127 ng/g), mejillones (56.7 ng/g) y almejas (1.3 ng/g). Además del DDT y sus metabolitos, se observaron altas concentraciones de endosulfán (α, β y sulfato) principalmente en las almejas.
- Osuna y Riva (2002), estudiaron la presencia y concentración de pOCs, en la bahía de Ohuira, en muestras de agua superficial, sedimentos y camarones, encontrando en el agua superficial que al DDT en concentraciones más elevadas, seguido por el heptacloro y el endosulfán-α (0.02-3.75, 0.01-1.480 y 0.010-0.132 ug/l, respectivamente). Para las muestras de sedimento, los plaguicidas con mayor concentración fueron el lindano (HCH-γ) y heptacloro epóxido (0.011-1.19 y 0.02-0.132 ug/g, respectivamente), y en menor concentraciones DDT, endosulfán-α y heptacloro. Mientras que en las muestras de camarón se presentaron altas concentraciones de endosulfán α (0.047-2.01 ug/g) y en menores concentraciones heptacloro epóxido y lindano, mientras el DDT no se detectó.

- Más tarde en otro estudio realizado por Galindo *et al* (2002), reportaron la presencia de pOCs en todos los ecosistemas de la costa Sinaloense, tanto en el agua como en los sedimentos y, en algunos casos, también en camarones y almejas. Los plaguicidas detectados en el agua y productos marinos fueron: clordano, lindano, DDT y sus metabolitos (DDE y DDD), aldrín, malatión, paratión, heptacloro, endosulfán, epóxido de heptacloro, hexaclorobenceno y dimentoato.
- En un estudio realizado por Carvalho *et al* (2002), detectaron y cuantificaron pOCs y plaguicidas organofosforados en los sistemas lagunares de Altata-Ensenada del Pabellón, en muestras de sedimentos, mejillones, ostiones, camarones, peces y en aves. Las aves de estudio fueron muestreadas en 1991, estas incluían cormoranes, garzas y patos *(Phalocrocorax sp; Egrettta sp. y Anas acuata*, respectivamente*)* y se tomaron muestras de musculo, hígado y huevos. Los autores concluyeron que entre la biota, las aves fueron las que presentaron mayores concentraciones (0.1 a 12000 ng/g peso seco), los autores concluyeron que se debe a los procesos de bioacumulación y biomagnificación.

2.2 Efectos de los contaminantes en aves y otros organismos acuáticos.

Debido a su amplia distribución, a la capacidad que tienen para persistir y magnificarse a través de la cadena trófica, los pOCs amenazan la salud pública y las formas de vida en todos los ecosistemas. En general son compuestos altamente tóxicos que pueden producir o inducir mutagénesis, teratogénesis, y un sinnúmero de alteraciones en funciones metabólicas y reproductivas (Albert *et al*., 1990; Hassall, 1990; Goldberg, 1995).

En humanos y otros organismos como las aves, una vez que los plaguicidas han sido incorporados al cuerpo, principalmente por medio de la dieta, se almacenan en el tejido graso donde suelen permanecer inactivos. Sin embargo,

en aves, en épocas de nutrición deficiente, como la migración y/o la reproducción, los depósitos adiposos se son utilizados y de esta manera son liberados al torrente sanguíneo (Albert *et al*., 1990) y otros tejidos (Bastidas-Bonillas, 2010). Diversos autores han descrito algunos de los efectos que provocan los pOCs en humanos, estos efectos incluyen, lesiones en el sistema nervioso central (donde se interfiere en el flujo de iones Na+ y Cl- a través de las membranas, de las células nerviosas, aumentando su sensibilidad e impulsos nerviosos), la afectación en los niveles de calcio y magnesio en plasma, efectos estrogénicos (como lo es la expresión de vitelogenina en machos de tortugas y peces), así como desórdenes en el hígado y leucemia, entre otros (Nasir *et al*., 1998; OMS, 1992; Naqvi y Vaishnavi, 1993; Herbst *et al*., 2003; Foster *et al*., 2001).

Debido a los distintos efectos adversos se propuso la reducción del uso de estos compuestos (Convenio de Róterdam y Estocolmo) y en los países industrializados se prohibieron desde 1971 (Albert *et al*., 1990). En México, el uso de pOCs se extendió hasta el año 2001, aunque recientemente compuestos como el DDT se ha utilizado durante campañas de fumigación contra el dengue, la malaria, también en la agricultura, aunque su uso está prohibido (Galindo, 2002; Carvalho *et al*., 2002; González-Farias, 2006).

2.3 Especie de estudio

S. nebouxii (Figura 2.2), presenta dimorfismo sexual evidente muy particular. Las características de este dimorfismo se presentan en la tabla 2.2 (Nelson, 1978).

Tabla 2.2 Clasificación taxonómica de *S. nebouxii.*

Reino	Animalia
Phyllum	Chordata
Clase	Aves
Orden	Pelicaniformes
Familia	Sulidae
Género	*Sula*
Especie	*Nebouxii*

Figura 2.2 Pareja de bobos de patas azules *Fotografía: Juan Pablo Ceyca Contreras*

Tabla 2.3 Características del dimorfismo sexual del bobo de patas azules (Nelson, 1978).

Característica		**Dimorfismo sexual**
Tamaño	81 cm	Hembras 20%>Machos
peso	1.5 kg	Hembras 32%>Machos
Ojos	Amarillos	Hembras iris grande y en forma de estrella, Machos iris pequeños y redondos
Sonido		Hembras graznan, Machos silban

La temporada reproductiva, de las aves en general está dividida en 3 etapas: cortejo, incubación y crianza. Normalmente, en esta especie, la temporada reproductiva tiene sus comienzos desde el mes de diciembre, hasta los meses de mayo y junio.

El trabajar con el bobo de patas azules conlleva muchas ventajas, una de ellas es que esta tiene la cualidad de anidar en el suelo, se agrupa en colonias

grandes (lo que permite su fácil captura), presentan un gran radio de alimentación aproximado de 30 km (Anderson y Rickleffs, 1987; Castillo-Guerrero, 2003: Weimerskirch *et al* 2009), además tienen gran tamaño (por lo que resulta sencillo obtener suficiente material biológico para ser analizados y aparentemente es fácil colocarles instrumentos como sistemas de posicionamiento global (GPS), relojes o tubitos rellenos de azúcar para medir su recorridos en busca de alimento y profundidad de buceo y anillos identificadores) (Castillo-Guerrero, 2003), Otra característica muy importante del bobo de patas azules, es que es residente de sistemas uno de los sistemas de interés (Isla el Rancho en Bahía Santa María) y posiblemente dado los hábitos de forrajeo reciban influencia de contaminantes en la Bahía de Topolobampo la población de Isla El Farallón de San Ignacio, por lo que es muy posible que incorpore contaminantes provenientes de la zona agrícola aledaña como el valle de Culiacán, valle de Guasave y el valle del carrizo (Figura 6.1) (González-Farías *et al*., 2006).

2.4 Biomarcadores

Los biomonitores o bioindicadores, son organismos vivos utilizados como indicadores de diversos contaminantes ambientales (Hoffman *et al*, 2003). Una de las maneras de avaluar la salud de los biomonitores es a través de respuestas llamadas biomarcadores o marcadores biológicos. Según Shugart y McCarthy (1990), los biomarcadores son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante".

Silbergeld y Davis (1994) mencionan que uno de los métodos para cuantificar la exposición a xenobióticos, y su posible impacto sobre las especies de estudio, es el uso de procedimientos de monitoreo biológico por medio de marcadores biológicos, de los cuales se distinguen tres tipos:

- **Biomarcador de exposición:** Este biomarcador evidencia la carga corporal del tóxico proveniente de la exposición. Un biomarcador de exposición valora la dosis interna determinando el agente o subproductos de su biotransformación en medios biológicos, permitiendo su cuantificación en el organismo (Christiani, 1996);
- **Biomarcadores de efecto:** Un biomarcador de efecto es el parámetro biológico que refleja la interacción de un químico con los receptores biológicos. Como estas alteraciones anteceden al daño estructural, su detección permite la identificación temprana de exposiciones excesivas o peligrosas;
- **Biomarcadores de susceptibilidad:** Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobióticos o grupo de compuestos tóxicos.

En las últimas décadas el uso de biomarcadores en conjunto con análisis químicos ha permitido evaluar y determinar los efectos adversos de los contaminantes en las aves marinas (Fossi *et al.*, 1994; Strum *et al.*, 2008; Quirós *et al.*, 2008; Mellink *et al.*, 2009; Barata *et al.*, 2010; Roos, 2011; Cruz-Acevedo, 2012).

Estudios recientes han involucrado variables celulares hematológicas como biomarcadores para inferir sobre los posibles efectos genotóxicos y de inmunosupresión producidos por la exposición a pOCs (Pastor, 2002.; Larrea, 2007; Cruz-Acevedo, 2012). Además, el uso de variables celulares provenientes de un tejido como la sangre, tiene sus ventajas ya que su extracción se realiza de forma sencilla, rápida y eficiente (un par de gotas es suficiente para observar variables hematológicas) y la concentración de pOCs en la sangre es proporcional a la concentración interna de los organismos (Radomski *et al*., 1971).

Las características morfológicas y valores hematológicos son biomarcadores de exposición y efecto a contaminantes (Clark et al. 2009; Cruz-Acevedo, 2012). Uno

de los aspectos más importantes de los biomarcadores hematológicos, es que no son considerados como un método invasivo ni destructivo, debido a la constante regeneración de este tejido (Fossi, 1994; LeBlanc y Bain, 1997; Handy y Depledge, 1999, van der Oost *et al*., 2003).

2.4.1 Hematología

La sangre es un tejido conjuntivo de matriz líquida, compuesta por una fase sólida (elementos formes conformada por eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y una fracción liquida (compuesta principalmente por el plasma sanguíneo). Cada tipo de célula en el organismo tiene un tiempo de vida dado, las células sanguíneas no son excepción, por lo que es necesario reemplazar las células que mueren, en el caso de las células sanguíneas son reemplazadas constantemente mediante un proceso de diferenciación y maduración llamado hematopoyesis (Figura 2.3), que ocurre en la médula ósea así como en otros órganos hematopoyéticos como el riñón, bazo, ganglios linfáticos, timo y en aves la bolsa de Fabricio) (Reagan y Sanders, 1999).

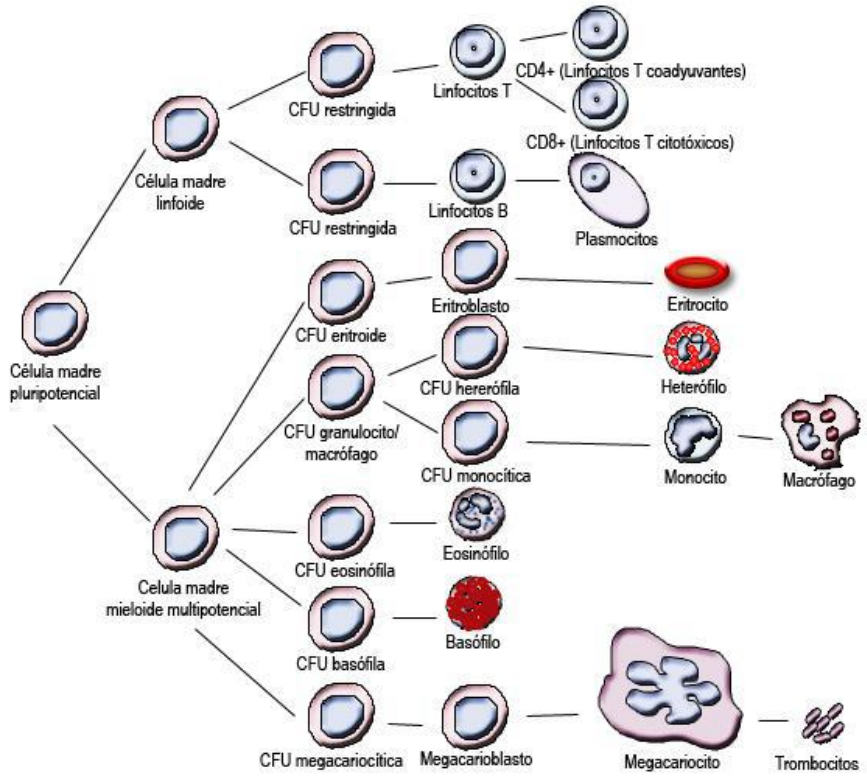


Figura 2.3 Diagrama de la hematopoyesis en aves. Célula madre pluripotencial, unidades formadoras de colonias (CFU) multipotenciales, CFU restringidas y células maduras en sangre. Modificado de: Ross *et al.,* 2007.

Una célula madre pluripotencial origina diferentes fases de células hijas multipotenciales, que posteriormente, se diferencian en células progenitoras, dando lugar a dos linajes: mieloide y linfoide (Tabla 2.4). El linaje mieloide da lugar a células de la serie eritrocítica (eritrocitos), granulocítica (eosinófilos, basófilos y heterófilos), megacariocítica (trombocitos) y agranulocítica (sólo monocitos). El linaje linfoide, como su nombre lo dice, da lugar a células de la serie agranulocítica (sólo linfocitos) (Reagan y Sanders, 1999).

Tabla 2.4 Tipos de células sanguíneas y sus diferentes funciones (Ross y Pawlina 2007).

Clasificación	Célula	Linaje celular	Función
Glóbulos rojos	Eritrocito	Mieloide	Transporta hemoglobina la cual tiene afinidad con oxígeno y bióxido de carbono, en su membrana interna tiene proteínas como espectrina y actina, otorgando a la membrana la rigidez y flexibilidad necesaria para filtrarse por capilares
Glóbulos blancos	Heterófilo	Mieloide	Pioneros en las respuestas a invasiones de algún agente externo, se les conoce también como macrófagos, presentan receptores de membrana que les permite reconocer el agente externo y activar los procesos de fagocitosis para la destrucción intracelular del agente externo.
	Eosinófilo	Mieloide	Interactúan con otras células mediante sus receptores, son células fagocitarias con afinidad antígeno-anticuerpo por lo que su atracción es mayormente por quimiotaxis, combaten los efectos inflamatorios en reacciones alérgicas e infecciones parasitarias.
	Basófilo	Mieloide	Difíciles de encontrar en un frotis sanguíneo, actúan sobre inflamaciones y reacciones alérgicas, fijan anticuerpo a través de sus receptores, liberando agentes vasoactivos que causan alteraciones vasculares importantes que se asocian con la hipersensibilidad y la anafilaxia.
	Linfocito	Linfoide	Difíciles de encontrar en un frotis sanguíneo, actúan sobre inflamaciones y reacciones alérgicas, fijan anticuerpo a través de sus receptores, liberando agentes vasoactivos que causan alteraciones vasculares importantes que se asocian con la hipersensibilidad y la anafilaxia.
	Monocito	Mieloide	Son las células fagocitarias más importantes, cuando se filtran al tejido se les conoce como macrófagos.
Trombocitos	Trombocito	Mieloide	Son residuos plasmáticos de la maduración de los megacariocitos, tiene relación con los mecanismos de coagulación y su tiempo de vida es de 5 a 9 días.

2.4.1.1 Relación Heterófilos-Linfocitos

Los linfocitos y los heterófilos son los dos tipos de leucocitos más abundantes en la sangre de los organismos. Un número alto de estas células en sangre se interpreta como una mayor capacidad para combatir contra las infecciones (Dufva y Allander, 1995). En un individuo bajo condiciones de estrés, la relación heterófilos/linfocitos aumenta, por lo tanto, puede ser utilizado como un indicador fisiológico de la respuesta de estrés. Los factores de estrés elevan el número de heterófilos y disminuye el número de los linfocitos (Gross y Siegel, 1983).

Hay diferentes estudios en los que demuestran que los pOCs provocan Inmunotoxicidad (Reppetto y Baliga, 1996), es decir, tienen la capacidad de afectar adversamente el sistema inmunológico y/o la respuesta inmune de los individuos afectados (Albert *et al*., 1990; Grasman y Scanlon, 1995; Repetto y Baliga, 1996). Esta respuesta puede presentarse como inmunosupresión, es decir una resistencia disminuida a las infecciones. La exposición a pOCs en el sistema inmune, ocasiona efectos que van desde la modulación de la respuesta inmune funcional hasta el desarrollo de hipersensibilidad (Lavoie *et al*., 2007; Repetto y Baliga, 1996).

Gross y Siegel (1993) sugieren valores de referencia para el cociente entre heterófilos y linfocitos de 0.2, 0.5 y 0.8 los cuales son reflejo de bajos, óptimos y altos niveles de estrés, respectivamente. La relación de heterófilos linfocitos es un método que ha sido usado ampliamente para determinar el nivel de estrés provocado por cambios en la alimentación y hacinamiento en gallinas (Gross y Siegel, 1983.), Asimismo, este método se ha usado para evaluar la presencia de contaminantes (plaguicidas) en el alimento de las aves de corral (Grasman y Scanlon, 1995) y más recientemente para determinar los efectos de contaminantes en aves acuáticas (Grasman y Fox, 2001; Verdugo, 2004, Skarphedinsdottir *et al*., 2010).

Son diversos los estudios que existen en la literatura, sobre la relación entre pOCs y su interacción con el sistema inmune (Reppetto y Baliga, 1996). Un parámetro del sistema inmune muy estudiado es la relación existente entre los números de heterófilos y de los linfocitos (H/L) y contaminantes.

Hassall (1990), menciona que las aves son más susceptibles a los efectos adversos provocados por compuestos organoclorados que otras especies, como peces y otros organismos ubicados en niveles tróficos inferiores. Estudios sobre la relación Heterófilos/Linfocitos (H/L) han probado su eficiencia en la determinación del estrés psicológico, físico y ambiental (Maxwell, 1993.) Los contaminantes interactúan en diversas partes del sistema inmune de las aves, provocando supresión o incremento de las actividades inmunes (Albert *et al*., 1990; Fairbrother *et al.,* 1994) y autoinmunes (Grasman, 2002).

Grasman y Fox (2001), estudiaron la relación entre los organoclorados y la supresión de las funciones de las células T (linfocitos) y la producción de anticuerpos en el Charran Caspio (*Hydroprogne caspia*), durante 1997 y 1999 en dos colonias del lago Huron, EU. Realizaron mediciones de compuestos organoclorados (PCBs y DDE) en plasma y huevo. En comparación con la colonia de referencia se observó una disminución del 42% de las funciones de los linfocitos, asimismo encontraron una correlación negativa entre los niveles de organoclorados en plasma y el porcentaje de monocitos y positivamente con el porcentaje de basófilos.

Bustnes *et al* (2004) evaluaron la relación entre la concentración en plasma de diferentes pOC's (HCB, oxiclordano y p-p´DDE, y una mezcla de congéneres de PCBs) y medidas relevantes en el estado inmune. Se hicieron conteos celulares de heterófilos y linfocitos así como también la función en la reproducción de gaviotas árticas (*Larus glaucas hyperboreus)* recolectadas entre los años 1997 y 2001. Estos autores reportaron que las concentraciones detectadas de pOCs y heterófilos presentaron una relación significativa, los autores concluyeron que los pOCs están causando alteraciones en el sistema inmunológico,

ocasionando una disminución de su eficacia al combatir patógenos y hacer que las aves sean más susceptibles a los parásitos y enfermedades.

Brito-Rojas (2013) estudió la relación existente entre los rasgos de historia de vida con variables hematológicas (índice H/L y frecuencia de micronúcleos en eritrocitos) de tres especies de aves marinas, entre las que se encuentra el bobo de patas azules (*S. nebouxii*), midiendo la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos así como también el índice H/L. Se encontraron valores promedio del índice H/L durante la etapa de incubación de 2.24 ± 0.23, mientras que durante la crianza (temprana y tardía) los valores del índice H/L oscilaron entre 2.17 ± 0.1 y 1.55 ± 0.11, respectivamente.

Finalmente, se revisó una base de datos de conteos de leucocitos (en línea; www.wildlifehematology.uga.edu), donde se obtuvieron valores de referencia de las distintas células (heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos), así como del índice H/L, de diferentes especies de aves marinas, las cuales se muestran en el Anexo I.

2.4.1.2 Micronúcleos

Un micronúcleo, como su nombre lo indica, son masas de cromatina que tienen forma de pequeños núcleos y aparecen fuera del núcleo principal en las células interfásicas. Las células micronucleadas se originan cuando las células mitóticas con rupturas de las cromátidas o aparato mitótico disfuncional sufren una distribución anormal de la cromatina durante la anafase. Después de la telofase, la cromatina desplazada puede ser excluida de los núcleos de las células hijas y queda en el citoplasma como un micronúcleo (Schmid, 1975).

Los micronúcleos se pueden originar de manera espontánea o como respuesta a la acción de determinados agentes genotóxicos (Fenech y Morley, 1985). Aunque esta prueba fue desarrollada inicialmente para los mamíferos (Dertinger *et al*., 1996), ha sido utilizado con éxito en peces (Llorente *et al*., 2002; Kim *et al*., 2003; Barsiene *et al*., 2004; Palma-Acuña, 2005; Bolognesi *et al*., 2006), anfibios (Fernández *et al*., 1993; Bouhafs *et al*., 2009.), aves (Stoncius y

Lazutka, 2003a; 2003b; Kim *et al*., 2003; Quirós *et al*., 2008; Barata *et al*., 2010), y algunos invertebrados (Wrisberg *et al*., 1992; Barsiene *et al*., 2004; Siu *et al*., 2004).

El ensayo de micronúcleos, para detectar anormalidades en células sanguíneas, particularmente en eritrocitos, se ha venido utilizando con más frecuencia para evaluar efectos genotóxicos ocasionados tanto por contaminantes orgánicos (como pOCs), como por la radiación (Muller *et al*., 1996; Ohe *et al*., 2004). Esta prueba ofrece resultados claros y contundentes, donde su principal ventaja es que sólo se necesita una gota de sangre para el estudio y la posibilidad de trabajarla in vivo (Suzuki, 1993).

Para realizar el ensayo de micronúcleos, obligatoriamente se debe contar con células que se estén dividiendo constantemente para que los micronúcleos se formen y puedan ser visualizados (Fenech y Morley, 1986). En tejido como el epitelio bucal o la sangre, sus células se reproducen continuamente para mantener la integridad y función del tejido.

El ensayo de micronúcleos permite detectar diferentes tipos de lesiones, por ejemplo:

- Roturas de doble cadena del ADN.
- Roturas de cadena simple del ADN que están mal reparadas o sin reparar.
- Alteraciones en las proteínas implicadas en la segregación cromosómica.
- Diferentes aberraciones cromosómicas, que pueden dar lugar a micronúcleos

La presencia de micronúcleos se traduce, en el ámbito celular, como pérdida del ADN. Esta técnica es muy eficaz para el monitoreo de compuestos genotóxicos de manera sencilla, rápida y con resultados contundentes. Esta prueba no da lugar a dudas que existe un daño producido en el ADN, ya que es

claro que la frecuencia de micronúcleos aumenta cuando los organismos son expuestos a genotóxicos.

La presencia de micronúcleos, en eritrocitos normocromáticos (ENC) pueden indicar una exposición crónica a contaminantes (Gómez-Meda *et al*., 2006), mientras que su aparición, en eritrocitos policromáticos (EPC), puede significar efectos en un periodo máximo de 24 horas (Schmid, 1975).

Existen estudios en los que buscan validar la aplicación de los micronúcleos en campo, tal es el caso de Sui *et al* (2004), donde evaluaron el efecto producido por la exposición, *in situ* (Bahía de Hong Kong), de pOCs, PHAs y PCBs en mejillones de labios verdes (*Perna viridis*) expuestos en agua de la bahía de Hong Kong. Los resultados mostraron que los micronúcleos aumentaron, su frecuencia, conforme el tiempo de exposición, y concluyeron que el uso del ensayo de micronúcleos es eficaz en estudios de campo.

En aves de la cuenca del Río Ebro, en España, se compararon las frecuencias de micronúcleos en eritrocitos de dos especies de aves (*Egretta garzeta y Ardea purpurea*) en sitios contaminados (zona influenciada de una industria cloro-álcali, donde se fabricaban pOCs y una zona agrícola) y un sitio de referencia. En los sitios contaminados la frecuencia de micronúcleos fue mayor que en el sitio de referencia. Demostrando la efectividad de la prueba de micronúcleos en aves acuáticas en programas de monitoreo ambiental (Quirós *et al.,* 2008; Barata *et al.,* 2010).

Brito-Rojas (2013) estudió la relación existente entre los rasgos de historia de vida con variables hematológicas (índice H/L y frecuencia de micronúcleos en eritrocitos) de tres especies de aves marinas, entre las que se encuentra el bobo de patas azules (*S. nebouxii*), midiendo la frecuencia de micronúcleos, encontró para machos y hembras una frecuencia de micronúcleos en 10,000 eritrocitos de 1.83 ± 0.95 y 1.5 ± 0.62, respectivamente.

Estos estudios y otros en los que se han usado micronúcleos se presentan en Anexo II.

III.- Justificación

La producción agrícola intensiva y tecnificada en el estado de Sinaloa, ocasiona un deterioro en la calidad del agua y del suelo, tanto en sus bahías como en sus costas. Este deterioro, puede deberse en gran medida al uso desmedido de plaguicidas químicos y otros contaminantes, los cuales degradan la calidad de hábitats, así como a las especies que residen en los mismos.

Dos ecosistemas, importantes por su productividad y su valor socio-ecológico son la Bahía Santa María e Isla el Farallón de San Ignacio, donde residen grandes poblaciones de aves acuáticas, de las que sobresale el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*). Por lo que este organismo, siendo un depredador tope, puede verse perjudicado por diversos factores antropogénicos, donde sobresale la exposición a pOCs.

En este contexto, el objetivo de este trabajo o tesis fue evaluar la relación entre la concentración de pOCs y en indicadores de salud en el bobo de patas azules, para ser utilizado como organismo centinela de los ecosistemas costeros.

El establecimiento de un monitoreo de este tipo también tendría implicaciones en la salud pública, pues las aves y los humanos son usuarios del mismo ecosistema, incluso pueden explotar recursos similares. El uso de las aves marinas como organismos centinelas, puede servir como un sistema de alerta temprana de los problemas ocasionados por la contaminación.

IV.- Hipótesis

1. En aves, así como otros organismos ovíparos, la puesta de huevos representa un mecanismo de destoxificación, por lo que las concentraciones de pOCs en las hembras adultas, de *Sula nebouxii*, serán menores a la de los machos. Además, la concentración de pOCs en la etapa de cortejo será mayor que en las etapas de incubación y crianza .Asimismo, debido al tiempo de exposición a estos compuestos, los pollos presentarán menor concentración, de pOCs, que en adultos. Por la cercanía a la costa IER será el sitio con más carga de pOCs que FSI.

2. Dado que los plaguicidas organoclorados son agentes inmunosupresores, genotóxicos y afectan la masa corporal, los individuos con mayor carga de pOC's presentarán mayor frecuencia de micronúcleos MN e índice H/L y menor índice de condición corporal (IC).

V.- Objetivo General:

Evaluar la concentración de contaminantes organoclorados y sus efectos mediante el uso de biomarcadores hematológicos de la especie *Sula nebouxii* durante las etapas de la temporada reproductiva, en Isla el Rancho, e Isla El Farallón de San Ignacio, Sinaloa.

5.1 Objetivos particulares:

1. Cuantificar los niveles de plaguicidas organoclorados en ambas islas en padres y pollos de *S. nebouxii.*
2. Determinar la presencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en los padres y pollos de *S. nebouxii*.
3. Estimar la relación heterófilo/linfocito (H/L) de padres y pollos en *S. nebouxii.*
4. Evaluar la relación entre las concentraciones de plaguicidas organoclorados con los parámetros hematológicos entre islas, etapas reproductivas, sexos y edades.

VI.- Materiales y Métodos

6.1 Zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos islas del Golfo de California, IER y FSI, forman parte del Área de Protección de Flora y Fauna Islas del Golfo de California (APFF Islas del Golfo de California), las cuales se encuentran ubicadas en el Noroeste de la República Mexicana, en la porción al centro y norte del Estado de Sinaloa (Figura 6.1). En la misma figura se muestra la batimetría de la zona, los círculos representan el área estimada de dispersión de las colonias durante la alimentación para la especie.

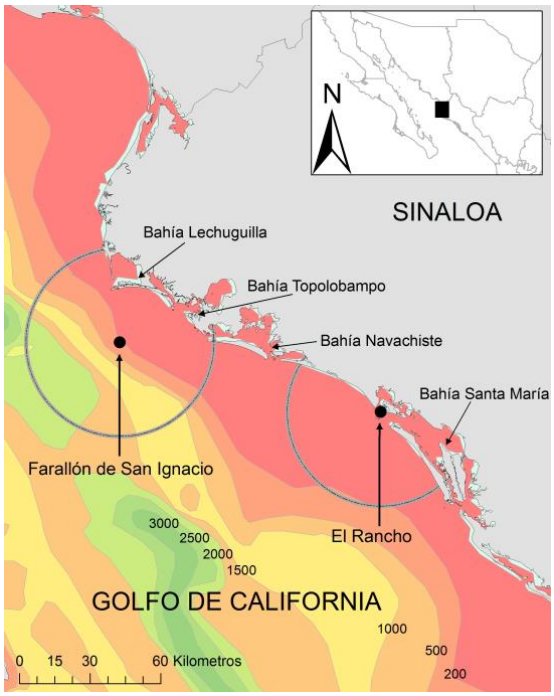


Figura 6.1 Isla el Rancho (IER) y Farallón de San Ignacio (FSI) noroeste de Sinaloa, NW de México. Batimetría de la zona y dispersión de las colonias durante la alimentación (circulo)

6.1.1 Isla El rancho

La Bahía Santa María, es un sistema lagunar que se encuentra en el municipio de Angostura, Sinaloa. Es un sitio de congregación para diversas especies de aves, entre las que se destacan las aves playeras, patos y aves marinas, presentándose en grandes grupos para la reproducción y durante la migración (Lyle-Fritch, 2003). Dentro de esta bahía, se encuentra la isla El Rancho, ubicándose en la boca norte del sistema, en las coordenadas (25°09´N, 108° 22´W) (Figura 6.2).

La Bahía Santa María, de acuerdo con la Conabio (2000), está incluida dentro de la Región Terrestre Prioritaria número 22 (RTP-22), denominada Marismas Topolobampo–Caimanero, y desde el año 2004, es reconocida como un sitio RAMSAR. Entre las especies de aves marinas que se reproducen en esta bahía, específicamente en Isla el Rancho se encuentra el bobo de patas azules *S. nebouxii.*

Entre las actividades, que se realizan en las zonas aledañas a esta bahía, destacan las actividades pesqueras, acuícolas y agrícolas, siendo esta última la actividad que predomina (Páez-Osuna *et al* 2007).

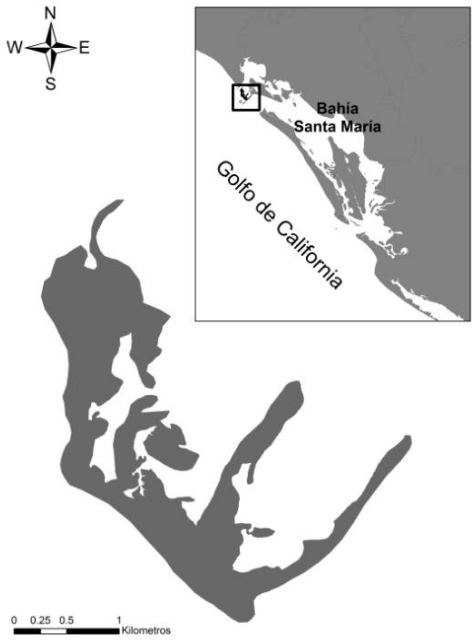


Figura 6.2 Ubicación geográfica de isla el Rancho (IER), en Bahía Santa María, Angostura Sinaloa.

6.1.2 Isla El Farallón de San Ignacio

La Isla El Farallón de San Ignacio (FSI), es un islote de 17 ha, su topografía es muy peculiar es relativamente plana en la parte superior, con paredes muy inclinadas que alcanzan los 137 msnm (González-Bernal *et al*., 2007) FSI, está localizado en la parte suroriental del Golfo de California, a 36 km de la costa de Topolobampo, en el municipio de Ahome, en la porción

norte del estado de Sinaloa (Figura 6.3). La isla está ubicada en las coordenadas (25º 26’ N, 109º 22’ W) (Guevara-Medina *et al*., 2008).

El FSI es un pequeño islote desprovisto de vegetación, *Sula nebouxii* es el ave anidante más abundante Guevara-Medina *et al*., (2008), estimaron que el número de parejas de esta especie fluctúa entre los 1,500 y 2,500. La dieta se compone principalmente de peces pelágicos menores, los más importantes son la anchoveta (*Cetengraulis mysticetus*) y la sardina crinuda (*Ophistonema sp*.).

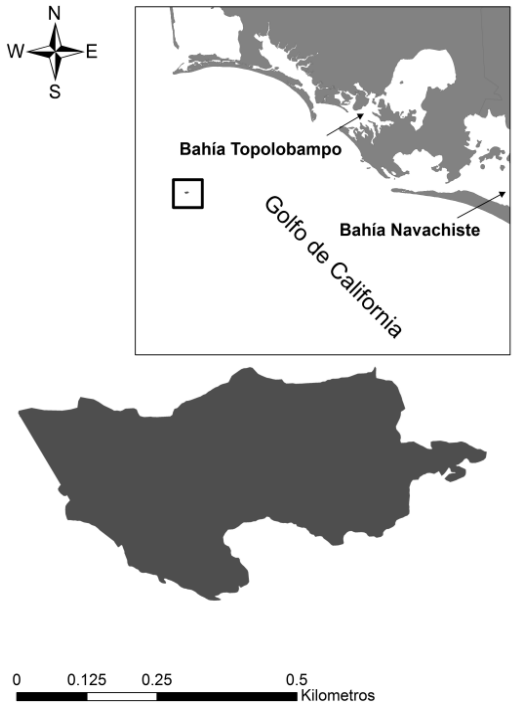


Figura 6.3 Ubicación geográfica de isla el Farallón de San Ignacio (FSI), Topolobampo, Ahome, Sinaloa.

6.2 Muestreos

Los muestreos se llevaron a cabo en la temporada reproductiva del 2012-2013, *s*e realizaron tres muestreos en ambas islas, los cuales fueron al inicio,

intermedio y al final de la temporada reproductiva (cortejo, incubación y crianza), respectivamente (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Número de muestras sanguíneas colectadas por etapa reproductiva: cortejo, incubación y crianza.

Isla	Organismo	Cortejo	Incubación	Crianza	Total
IER	M	10	6	4	20
	H	21	7	3	31
	P	-	-	4	4
FSI	M	20	10	3	33
	H	19	5	1	25
	P	-	-	3	3

Isla el Rancho (IER), e Isla el Farallón de San Ignacio (FSI); Diferenciando sexos. H: hembra, M: macho, P: pollo.

Para realizar las visitas a los sitios de estudio y muestreos, se contó con la autorización de la Dirección General de Vida Silvestre perteneciente a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) con el permiso de colecta de muestras científicas (Permiso: SGPA/DGVF/03292/13).

En cada salida al campo, se le notificó a las autoridades correspondientes las fechas de muestreo y/o visitas en las islas, contando con la autorización y/o acompañamiento de personal de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).

6.2.1 Captura de los organismos

Los organismos se capturaron e inmovilizaron con una red de mano, evitando que se enredaran, golpearan o sufrieran lesiones con el armazón de la red. Posteriormente, para sacar el ave de la red se le sujetaba la cabeza y culmen (Figura 6.4) y se colocaba el ave dentro de una bolsa de tela para su traslado a la estación de trabajo. En esta estación de trabajo, los organismos seleccionados se les tomaban las medidas morfométricas y se pesaron,

prosiguiéndose a la extracción de una muestra sanguínea, para realizarles análisis celulares y de pOCs.

Es importante mencionar, que durante los muestreos de incubación, se capturaron los adultos y se cubrieron los huevos para evitar la depredación. De igual manera, durante el periodo de crianza se capturaron los adultos junto con el polluelo para evitar que otros adultos lastimen a los pollos o fuera abandonado.

Figura 6.4 Captura e inmovilización del ave.

6.2.2 Medidas morfométricas

En la estación de trabajo, las aves capturadas fueron pesadas dentro de la bolsa de tela (±100 u 80 g, el peso de bolsa grande o chica) en una balanza electrónica (Ohaus ± 5 g) y utilizando un vernier (Stainless Hardened, 0.01 mm de precisión) se realizaron las mediciones de las estructuras corporales: el tarso (Figura 6.5) y el culmen (Figura 6.6) y con una cinta métrica (5 m.) se les midió la ulna (Figura 6.7).

S. nebouxii, una vez que llega a la adultez, sus medidas corporales (ulna, culmen y tarso) prácticamente son las mismas, por lo que las medidas morfométricas sólo se realizaron la primera vez que se capturó el ave, para los adultos corresponde a la etapa de cortejo, mientras que para los pollos a la etapa de crianza.

Durante el primer muestro (cortejo), a las aves capturadas se les colocaron anillos identificadores de plástico numerados, a los machos se les asignó anillos de color rojo mientras que a las hembras anillos de color verde, la colocación de los anillos tiene como finalidad el identificar a los organismos capturados y darles seguimiento a lo largo de la temporada reproductiva.

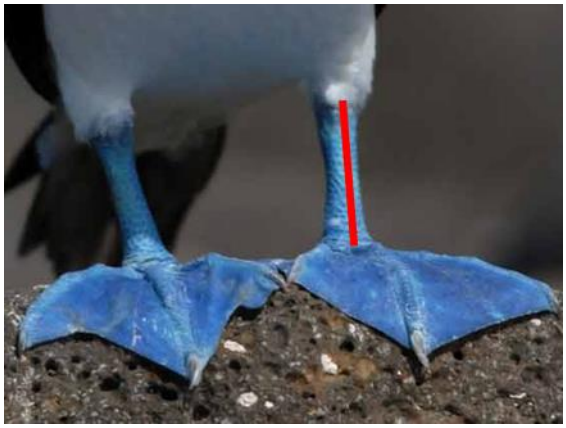


Figura 6.5 Patas de un ejemplar de *Sula nebouxii*, la línea roja simboliza la ubicación del tarso del ave donde se tomó la medida morfométrica, para medir el tarso el ave se colocó boca arriba y se doblaba la pata para facilitar la medida.

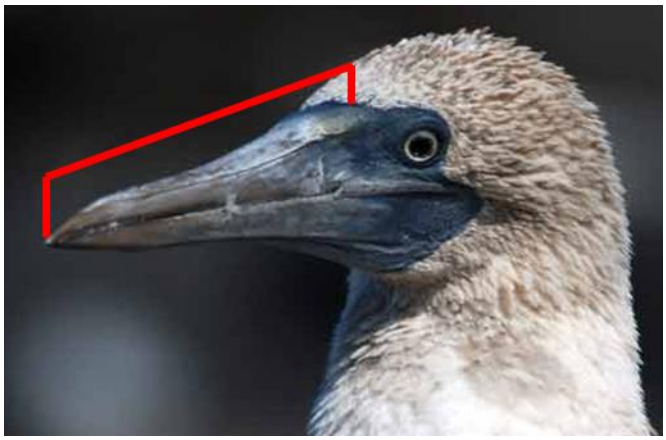


Figura 6.6. Cabeza de una hembra de *Sula nebouxii*, la línea roja simboliza el sitio donde se realizó la medida del culmen del ave, el culmen es la zona que comprende desde la punta del pico hasta la base del mismo donde comienza el plumaje de la cabeza del ave.

Figura 6.7 Ejemplar de *Sula nebouxii* en vuelo, la línea roja simboliza el sitio donde se realizó la medida de la ulna del ave. Como se puede apreciar en la imagen la ulna es el hueso ubicado en la parte media del ala.

6.2.3 Muestreo sanguíneo

La muestra sanguínea se obtuvo mediante extracción intravenosa en la vena braquial, la cual está ubicada en el ala del ave.

Procedimiento:

1. Sostener el ave del cuerpo en posición boca arriba (con una mano).
2. Con la otra mano, extender el ala, exponiendo así la vena braquial el ala extendida (con la otra mano) exponiendo así la vena braquial.
3. Posteriormente, el área de punción era frotada con un algodón con alcohol.
4. Después con la ayuda de otra persona, se extrajeron 2ml de sangre, con una jeringa de 3 ml con aguja 25G.
5. Se realizaron tres frotis *in situ:* el primero para determinar la relación heterófilos-linfocitos, un segundo para realizar el ensayo de micronúcleos y el tercero como repuesto.

6. Una vez realizados los frotis, se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente almacenarlas en cajas para portaobjetos (Fisherbrand).
7. La sangre restante se colocó en tubos eppendorf de 1.0 ml con anticoagulante EDTA K_2 (0.04 M, 100 µl). y se llevó a cabo un registro en la bitácora de campo.

8. Una vez acumulados 6 tubos eppendorf con muestras de sangre o en su defecto haber transcurrido 2 horas de la extracción de la primera muestra, se procedió a centrifugar las muestras (7,000 rpm 15 min.) con el fin de separar el plasma de las células.

9. El plasma se transfirió con una pipeta de 2 ml a tubos eppendorf de 1.0 ml. Los cuales se almacenaron en hielo, a aproximadamente 4°C para su conservación.

6.4 Análisis de plaguicidas organoclorados

6.4.1 Extracción de plaguicidas organoclorados en plasma

Para la extracción se siguió la metodología de Matos *et al*., (1988), extracción liquido-liquido donde se colocó un mililitro de plasma en un tubo de 10 ml, se le agregaron 0.2 gramos de cloruro de sodio, posteriormente 2.5 ml de una solución hexano/acetona 9:1 (v/v). El tubo se agitó en un vortex durante un minuto y se dejó reposar por 5 minutos, la muestra se separó en dos fases, la fase superior se colectó con una pipeta Pasteur y se coloca en otro tubo de 5 ml. Nuevamente se agregó 2.5 ml de la solución de hexano-acetona al tubo de 10 ml y se repitieron los pasos anteriormente descritos.

Una vez extraídas las fases superiores se evaporó en un minivap con flujo de N_2 hasta sequedad y se resuspendió en un mililitro de hexano.

6.4.2 Limpieza EPA 3630c

La limpieza para la extracción de pOCs en plasma, fue la descrita en la EPA 3630c “silica gel cleanup” (EPA, 1996) con algunas modificaciones. En breve se instala una columna plástica donde se le coloca en el fondo un tapón de fibra de vidrio, y se le agrega 1 g de arena comercial (Sigma Aldrich) previamente lavada con solventes (acetona/hexano 15:85). Posteriormente a la columna se le adicionaron 5 ml de hexano para acondicionarla.

Por cada ml de muestra se pesó 1 g de silica gel activada (3% en peso de agua ultra pura grado plaguicida y agitado por 3 horas) la cual se mezcló con hexano hasta formar el gel; el hexano restante se depuró y se agregó el extracto (muestra) dentro de la columna, y nuevamente se agregó1 g de arena (Figura 6.8).

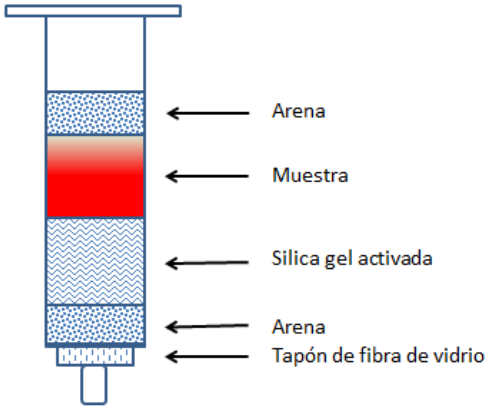


Figura 6.8 Representación de la columna plástica preparada para la limpieza con silica gel, (EPA, 1996).

Una vez preparada la columna (Figura 6.8) se dio inicio a la limpieza, se agregaron 5 ml de hexano al tubo de la muestra, para rescatar la mayor cantidad de muestra, y después con ayuda de una pipeta, se agregaron a la columna otros 5 ml de hexano, seguido de 10 ml de diclorometano-hexano 1:1 (v/v). Una vez concluida la limpieza se evaporan los extractos eluídos hasta sequedad por mini vap con un flujo de N_2 y finalmente se resuspendió con 200 µl hexano.

6.4.3 Detección y cuantificación de pOCs (CG-DCE)

La detección y cuantificación de pOC's, fue llevada a cabo por cromatografía de gases (EPA 8081B, EPA, 2007). Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) Hewlett-Packard 5890 Serie II equipado con dos detectores de captura de electrones (ECD por sus siglas en inglés) y dos columnas (RESTEK): Rtx-CLPesticides (cat. #11141) y Rtx-CLPesticides 2(cat.#11324) de 30 m x 0.25 ID x 0.2 µm de espesor de película, unidas con una “Y” universal desactivada Press-Tight® connector (cat. #20405261) a una pre-columna Rxi® guard (cat.#10039) de 5 m x 0.32mm ID. Nitrógeno UAP (INFRA®) como gas acarreador y gas auxiliar, inyección modo splitless, se inyectaron 2 µl del extracto.

El equipo trabajó bajo las siguientes condiciones: temperatura del inyector de 290° C; temperatura de los detectores de 300° C; temperatura inicial del horno 150° C, con una gradiente de temperatura de 5° C/min hasta 245° C/min; un segundo gradiente de temperatura de 10° C/min hasta 310° C durante 5 min.

Para la identificación de pOC’s se utilizó una solución estándar de pOC’s 48858-U (SUPELCO Analytical ®), que contiene los siguientes plaguicidas: HCH (α, β, γ y δ), Heptacloro, Aldrín, Dieldrín, Endrín, Endrín aldehído, Heptacloro epóxido, Endosulfán (α y β), p, p-’DDT, p, p’-DDE y p, p’-DDD.

Cada compuesto en el estándar tiene una concentración conocida que es proporcional a la respuesta obtenida en la detección por GC-ECD, por lo que conociendo la respuesta del estándar y la muestra se puede calcular su concentración. Para la cuantificación de los pOCs se empleará la siguiente ecuación:

$$Concentración\ \left(\frac{ng}{ml}\right) = \frac{Rm * Ce}{Re * Vm}$$

En donde:

Rm: Respuesta en área del pico de la muestra.

Ce: Concentración (ng) de estándar inyectado.
Re: Respuesta en área del pico del estándar.
Vm: Volumen (µl) de muestra inyectado.

6.3 Análisis de biomarcadores

6.3.1 Relación Heterófilo/Linfocito

Para realizar los cálculos de la relación Heterófilos-Linfocitos se usó la metodología descrita por Lucas y Jamroz (1961). Una vez extraída la sangre, se colocó una gota en tres portaobjetos (sección 6.2.3) y posteriormente en el laboratorio se procedió a fijarse con metanol (Espinosa-Reyes *et al* 2007).

La tinción de los frotis se realizó con Wright-Giemsa siguiendo el protocolo propuesto por Del Río-Zaragoza *et al.,* (2008), ANEXO III. Para la conservación de las muestras teñidas se colocaron un par de gotas de resina sintética Cytoseal ® sobre el frotis sanguíneo y posteriormente se colocó un portaobjetos (25 X 75 mm) y se guardaron hasta el momento de su lectura.
Todas las células sanguíneas fueron caracterizadas mediante el objetivo 100x en un microscopio (100x, Leica DM3000) y las imágenes de los leucocitos fueron capturadas con una cámara de microscopía. Para hacer el conteo diferencial de leucocitos, se contaron un total de 100 leucocitos, incluyendo los granulares (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y los no granulares (linfocitos y monocitos). Una vez realizado el conteo, simplemente se dividen el número de heterófilos entre el número de linfocitos (H/l) (Lucas y Jamroz, 1961).

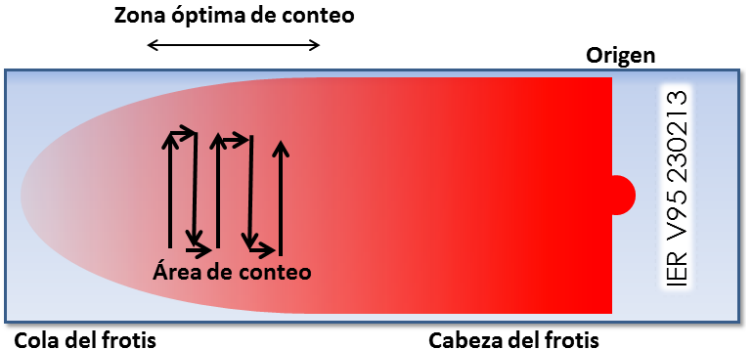


Figura 6.9 Frotis sanguíneo clásico.

6.3.2 Análisis de los micronúcleos

El análisis de micronúcleos, se llevó a cabo en Departamento de Investigación a cargo de la Dra. Olivia Torres Bugarín de la Facultad de Medicina, en la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Para el análisis de micronúcleos (MN) y prolongaciones nucleares en eritrocitos se procedió de la misma manera que para obtener la relación H/L, sólo que la fijación de las laminillas en metanol fue durante 10 min (Espinosa-Reyes *et al*, 2007). Luego se procedió acorde a la metodología propuesta por Zamora-Perez *et al.* (2004), Donde después de fijar las laminillas con metanol, se dejaron evaporar al aire libre, posteriormente se procedió a teñirlas con naranja de acridina disuelta en buffer de fosfato (pH 7.03; Hayashi *et al.,* 1983.).

Con esta tinción se identifican claramente los MN, los cuales se tiñen de verde amarillento al igual que el núcleo, también reconoce a los eritrocitos nuevos o Eritrocitos Policromáticos (EPC), y Eritrocitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) los cuales se tiñen de un color rojo fluorescente, mientras que los eritrocitos viejos o eritrocitos normocromáticos (ENC), se tiñen de un color verde opaco (Hayashi *et al.*, 1983). Posteriormente, se coloca una gota de buffer de fosfato sobre la muestra y se tapa con un cubre objetos; después se procede a realizar el recuento de las células con el objetivo de 100x de un microscopio de fluorescencia Marca Carl Zeiss Axiostar® con lámpara de fluorescencia HBO 50 y fuente de poder mbq, con el objetivo A-Plan® y se tomaron microfotografías de las células con una cámara digital. Para el recuento se consideraron 10,000 eritrocitos por laminilla (Anexo IV).

Para realizar el conteo de micronúcleos se siguieron los 3 criterios descritos por (Espinosa-Reyes *et al*. 2007):

1. El contorno de la membrana celular debe estar bien delineado.
2. El tamaño del MN debe ser por lo menos una tercera parte del tamaño del núcleo, pero debe ser suficientemente grande como para poder observar que los detalles sean similares al núcleo.

3. Por último el MN, se debe observar en el mismo plano focal y no traslaparse con el núcleo.

Dentro de las anormalidades nucleares se considerará como micronúcleos (MN), a pequeños cuerpos citoplasmáticos en forma redonda u ovoide, con el mismo plano óptico que el núcleo principal y que además, no estuviera conectado a él (Bolognesi *et al*., 2006), y como prolongaciones nucleares se considerará a los eritrocitos con núcleos que presenten protuberancias o deformidades en la membrana nuclear (Carrasco *et al*., 1990 en Cavas, 2008), además, esta prueba nos permite conocer la tasa de eritropoyesis, el cual es igual e eritrocitos policromáticos/10,000 eritrocitos (Serrano-García y Montero-Montoya 2001; Gómez-Meda *et al*. 2006).

Los parámetros considerados en la prueba de micronúcleos se obtuvieron de la siguiente manera:

- MNET- Micronúcleos/10,000 eritrocitos totales.
- BCET- Las anormalidades nucleares/10,000 eritrocitos totales.
- MNEPC- Micronúcleos/1,000 eritrocitos policromáticos.
- BCEPC- Anormalidades nucleares/1,000 eritrocitos policromáticos.
- MNENC- Micronúcleos en eritrocitos/ 1,000 normocromáticos.
- BCENC- Anormalidades nucleares en eritrocitos/ 1,000 normocromáticos

6.3.3 Índice de condición IC

El índice de condición corporal (IC), nos permite conocer la salud de los organismos, respecto a estado de energía almacenada. Un organismo con una buena condición, tiene mayores reservas energéticas que otro con una pobre condición (Schulte-Hostedde *et al*., 2005). Los organismos con mayores reservas energéticas pueden afrontar de mejor manera las inclemencias ambientales que aquellos con menores reservas energéticas (Millar y Hickling, 1990).

El índice de condición (IC), es un número utilizado para relacionar el peso del organismo con algún indicador del tamaño corporal. Este índice se basa en el supuesto que el peso del organismo se incrementa linealmente con los indicadores del tamaño del cuerpo, Para calcular este índice se realizaron correlaciones entre las medidas morfométricas (ulna, culmen y tarso) con respecto a el peso; De las tres medidas corporales la que mejor se correlacionó y mejor se ajustó a una regresión lineal fue la ulna (Anexo V), entonces al sustituir los datos de la ecuación de la recta obtenida en la regresión lineal entre ulna y peso del organismo, se obtuvo el peso esperado (PE). Finalmente sólo se sustituyeron los valores de la ecuación 1, para calcular el IC.

Para calcular el IC se empleó la siguiente ecuación (EC 1).

$$IC = \frac{PO - PE}{PE}$$

En donde:

IC es el índice de condición
PO es el peso observado
PE es el peso esperado.
La obtención del IC, se realizó usando una base de datos automatizada en Microsoft Excel.

6.5 Análisis de datos

6.5.1 Concentraciones de plaguicidas organoclorados

Los datos fueron transformados usando la transformación descrita por Zar, (1988) log10 (X+1), para así cumplir con las premisas de normalidad y homocedasticidad de varianzas, y así reducir la variabilidad que presentaron los datos.

Para analizar los datos (transformados) se usó el modelo lineal general (GLM), se seleccionó como variable dependiente la concentración de cada grupo de plaguicida por separado (Σ HCHs, Σ Drines, Σ Endrines, Σ Heptacloro, Σ DDTs, Σ Endosulfán, Σ Clordanos) y la suma de todos los plaguicidas (Σ pOCs). Como predictores categóricos, se utilizaron la Isla (IER y FSI), la etapa reproductiva

(cortejo, incubación y crianza) y el sexo (Machos y Hembras). Finalmente como predictor continuo se incluyó el día juliano estandarizado, de igual manera que el análisis de micronúcleos y anormalidades nucleares, se partió de un modelo completo, el cual consideraba todos los factores e interacciones y se fueron removiendo los factores no significativos, se removían valores de P mayores hasta simplificar el modelo, comenzando con los covariados, las interacciones de la más complicadas (tres factores) a las más simples (dos factores) y al final los factores categóricos.

Finalmente para evaluar la edad, sólo se pudo evaluar la concentración total de pOCs, para ello, se utilizó un método no paramétrico (U de Mann-Whitney).

6.5.2 Relación heterófilo-linfocito (H/L)

Se evaluó la relación H/L de *Sula nebouxii*, mediante un modelo lineal general (GLM). En este se consideraron el sitio, (dos islas: El Rancho (IER) y El Farallón De San Ignacio (FSI)), las etapas reproductivas (cortejo, incubación y crianza) y el sexo (macho y hembra) como factores fijos y el día juliano estandarizado y el tiempo de manipulación como covariados.

Para estandarizar el juliano se tomó en cuenta que la especie inicia su temporada reproductiva en diciembre así que se tomó el día primero de diciembre como día uno del calendario juliano, para observar si existen diferencias a través del tiempo (temporalidad).

6.5.3 Frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares

Se obtuvieron muestras provenientes de adultos de ambas islas, IER: 53, mientras que FSI: 62.Tambien se evaluaron los sexos: Hembras: 65, Machos; 50. Los pollos se excluyeron del análisis.

Se utilizaron modelos lineales generales para analizar los datos de micronúcleos y anormalidades nucleares, en diferentes análisis se incluyó como variable dependiente la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos totales, eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos (MNET, MNEPC y

MNENC, respectivamente) así como las anormalidades nucleares (Bud Cells) en eritrocitos totales, eritrocitos policromáticos y en eritrocitos normocromáticos (BCET, BCEPC y BCENC), además de la tasa de eritropoyesis (TEP). Para los modelos lineales se usaron como predictores categóricos, la Isla (IER y FSI), la etapa reproductiva (cortejo, incubación y crianza) y el sexo (Machos y Hembras) y como predictores continuos el día juliano estandarizado y el tiempo de manipulación. En todos los casos, se partió de un modelo completo, el cual consideraba todos los factores e interacciones y se fueron removiendo los factores no significativos, se removían valores de P mayores hasta simplificar el modelo, comenzando con los covariados, las interacciones de la más complicadas (tres factores) a las más simples (dos factores) y al final los factores fijos.

6.5.4 Índice de condición

Este índice se calculó usando todos los organismos muestreados en los muestreos, solamente se excluyeron los pollos y organismos a los que por alguna razón no se les tomó el peso (g) y/o la ulna (mm). Es decir de los 137 organismos sólo se pudieron considerar a 126 organismos.

De la misma manera que en los casos anteriores se usó un ANOVA de tres vías para analizar los datos, seleccionando como variable dependiente el índice de condición. Como factores, se consideró el sitio: (IER y FSI), la etapa reproductiva: (cortejo, incubación y crianza) y el sexo: (Machos y Hembras).

6.5.5 Relación entre las concentraciones de los pOCs y biomarcadores

Para evaluar la relación de los biomarcadores (índice H/L, IC, MN y BC) y las concentraciones de pOCs, se utilizaron modelos lineales generalizados, para realizar un análisis de la covarianza (ANCOVA), considerando como variables covariadas los grupos de plaguicidas (ΣHCH, ΣDrines, ΣEndrines, ΣHeptacloro, ΣDDT, ΣEndosulfán, ΣClordanos y ΣpOCs), se partió de un modelo complejo considerando los factores estudiados así como las interacciones. Para simplificar el modelo, se removían valores de P mayores, comenzando con las

interacciones y los predictores categóricos (sitio, etapa reproductiva y sexo). Finalmente se fueron removiendo los covariados con P mayor hasta simplificar el modelo.

VII.- Resultados

7.1 Concentraciones de plaguicidas organoclorados

De 137 de aves capturadas y muestreadas, sólo a 126 individuos se les logró extraer suficiente sangre (1 ml aprox.), para realizar los análisis de la concentración los compuestos organoclorados. Se utilizó una solución estándar que contenía 20 plaguicidas, de estos sólo se detectaron 17, esto se puede apreciar en el anexo VIII. Primeramente, se evaluó el factor edad, posteriormente los grupos afines de plaguicidas y por último la sumatoria de los compuestos organoclorados evaluados en este estudio, las tablas y figuras de esta sección, se localizan al final del apartado.

Edad

Dado que el factor edad se excluyó del modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés), para este factor solamente se analizó la concentración de la sumatoria de los pOCs, ya que solamente fueron pocas muestras de pollos (7), además sólo se encontraron en los pollos el grupo del endrín y el grupo del clordano. Se observaron diferencias entre adultos y pollos (U, $Z=2.090$, $p=0.0366$) (Figura 7.1).

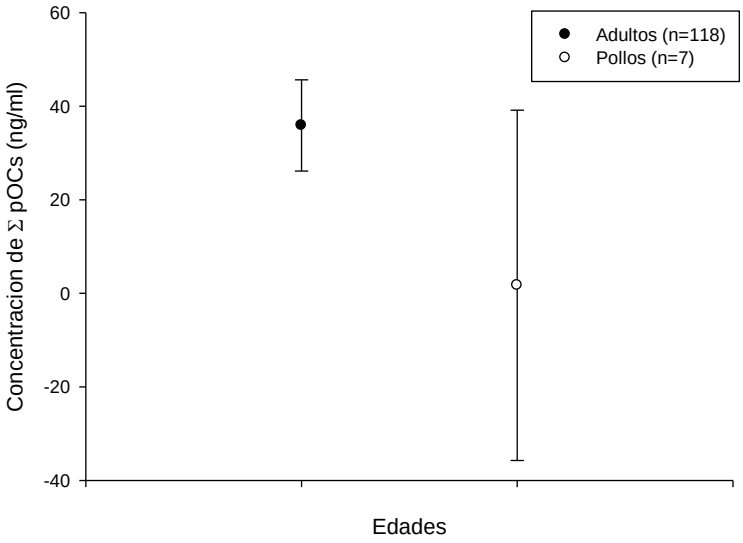


Figura 7.1 Concentración (ng/ml) promedio de pOCs en plasma de *Sula nebouxii*, en adultos y pollos.

Σ HCH

Para fines de este estudio, el grupo de los hexaclorociclohexanos (ΣHCH) se encuentra conformado por la sumatoria de los siguientes compuestos: HCH α, HCH β, HCH γ y HCH δ. Este grupo, fue el segundo con mayor presencia en las muestras (65 muestras, aproximadamente el 52 %).

Este grupo de compuestos se encontró en ambas **islas** (45.5 y 57.1% de las muestras provenientes de IER y FSI, respectivamente), siendo en la IER donde se presentó, en promedio, las mayores concentraciones (18.1 ± 89.1 ng ml^{-1}). Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre ambas islas (Tabla 7.1).

De acuerdo a la **temporada reproductiva**, la etapa de cortejo es la que presentó las mayores concentraciones, tanto en IER (30.5 ng ml^{-1}) como en FSI (9.6 ng ml^{-1}) (Tabla 7.3), en todos los casos se mantuvo el siguiente comportamiento co>in>cr. Debido a la predominancia de la etapa de cortejo, con las mayores concentraciones, es que se encontraron diferencias

significativas, por lo que se realizó la prueba *post-hoc* HSD de Tukey. Sólo se encontraron diferencias significativas entre las etapas cortejo y crianza, de la temporada reproductiva, mas no entre la interacción isla-etapa reproductiva (Tabla 7.1).

Entre **sexos**, no se encontró una predominancia por alguno en particular, ya que este grupo de compuestos se detectó, en la IER, en el 46.37 y 64.4% de las muestras de hembras y machos, respectivamente, mientras que en FSI se encontró en el 57.6 y 46.2%, en muestras de hembras y machos, respectivamente. En cuanto a las concentraciones, los machos de FSI presentaron las mayores concentraciones (11.4 ± 30.4 ng ml^{-1}) y las hembras en IER (20.04 ± 104.8 ng ml^{-1}). A pesar de las amplias desviaciones entre las concentraciones de las muestras (Tabla 7.2), no se encontraron diferencias significativas entre los sexos (en ambas islas), ni en la interacción isla y sexo (Tabla 7.1).

Σ Heptacloro

En este grupo se tomaron en cuenta el plaguicida heptacloro y su metabolito, el heptacloro epóxido, este grupo (Σ Heptacloro) fue detectado sólo en 9 muestras y lo convierte en el grupo con menor presencia correspondiendo al 8.73 %.

El grupo del Σ Heptacloro se detectó en ambas **islas** (7.14 y 6.01%) IER y FSI respectivamente, siendo IER (0.93 ± 4.67 ng ml^{-1}) la isla que presentó un promedio mayor que FSI (0.28 ± 1.19 ng ml^{-1}), no se encontraron diferencias significativas entre ambas islas (Tabla 7.1).

Para las **etapas reproductivas** las concentraciones del grupo del heptacloro se comportaron de la siguiente manera: co <in> cr (Tabla 7.3), sin que se encontraran diferencias significativas entre las etapas (Tabla 7.1).Tampoco la interacción isla-temporada reproductiva mostró diferencias significativas (Tabla 7.1), no obstante en IER, este grupo no fue detectado en la etapa de cortejo, mientras que en FSI en la etapa de crianza (Tabla 7.3).

Mientras que para los **sexos**, este grupo se encontró en el 4.3 y 13.6% de las muestras de hembras y machos, respectivamente, en general, se observó que las hembras presentaron un promedio mayor que los machos, no obstante en IER, se observó una mayor concentración en los machos (Tabla 7.2), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los sexos, tampoco entre la interacción isla y sexos (Tabla 7.1).

Σ DDT

En este grupo están incluidos el plaguicida DDT, y sus metabolitos DDD y DDE. Destacando el DDE, el cual fue el único compuesto de este grupo detectado, este metabolito, se detectó en 34 muestras de plasma sanguíneo, por encima del 20% de las muestras.

Este grupo, se encontró en muestras provenientes de ambas **islas**, correspondiendo al 24.2 y 22.8% en FSI e IER, respectivamente. FSI (1.87 ± 4.74 ng ml $^{-1}$) presentó mayor promedio que en IER (1.06 ± 3.09 ng ml $^{-1}$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las islas y la concentración del Σ DDTs (Tabla 7.1).

Para las **etapas reproductivas**, los niveles de Σ DDTs se comportaron de la siguiente manera: co> in> cr (Tabla 7.3), observándose diferencias significativas entre las etapas (Tabla 7.1). Se realizó la prueba *post hoc* HSD de Tukey, sólo se encontraron diferencias significativas entre cortejo y las etapas de incubación y crianza, mientras que no las hubo entre incubación y crianza. Para la interacción entre isla y temporada reproductiva se encontraron diferencias entre las islas (Tabla 7.1).

En relación a los **sexos**, el grupo se detectó en un tercio de las muestras provenientes de hembras, y sólo en el 15.25% de las provenientes de los machos, las hembras presentaron un mayor promedio que los machos (Tabla 7.2) encontrándose diferencias significativas entre los sexos y en la interacción islas-sexo (Tabla 7.1).

Σ Drines

El grupo de los drines está constituido por aldrín y el metabolito dieldrín, ambos fueron detectados en ambas islas, en las etapas reproductivas de cortejo e incubación pero no en crianza, se detectó en ambos sexos, el grupo fue detectado en 16 muestras, correspondiendo al 12.70 %.

En ambas **islas**, el grupo se detectó en un porcentaje muy bajo de muestras (en FSI 1.2%, mientras que en IER, 0.85%)**,** para las concentraciones promedio, FSI (2.84 ± 9.46 ng ml $^{-1}$) presentó ligeramente un mayor promedio que IER (2.52 ± 10.06 ng ml $^{-1}$), por lo tanto, como era de esperarse, no se encontraron diferencias significativas entre ambas islas (Tabla 7.1).

Para las **etapas reproductivas**, las concentraciones del grupo de los drines se comportaron de la siguiente manera: co> in> cr (Tabla 7.3), no obstante no se encontraron diferencias significativas entre las etapas reproductivas (Tabla 7.1), ni se observaron diferencias significativas entre la interacción isla-etapa reproductiva (Tabla 7.1).

Para los **sexos**, el grupo estuvo presente en el 14.49 y 10.17% de las muestras de hembras y machos, siendo las concentraciones entre ambos sexos muy similares, mostrando los machos un promedio mayor que las hembras (Tabla 7.2), por lo que no se encontraron diferencias significativas entre sexos ni en la interacción isla-sexo (Tabla 7.1).

Σ Clordanos

El clordano es una mezcla de varias sustancias químicas relacionadas, para los fines de este estudio, sólo se analizaron los isómeros Tras y Cis, el grupo fue detectado en 47 muestras. Ambos isómeros fueron detectados en las dos islas, a lo largo de la temporada reproductiva, en ambos sexos, después de los endrines, los clordanos fueron el segundo grupo de organoclorados detectado en pollos.

Entre las **islas**, el grupo fue detectado en un tercio de las muestras provenientes de FSI, mientras que en IER, un poco por encima de la tercera parte de las muestras, 33.33 y 35.71%, para la concentración promedio, IER (2.5 ± 8.21 ng ml $^{-1}$), presentó un promedio mayor que FSI (2.38 ± 5.4 ng ml $^{-1}$), como es de esperarse, al presentarse las concentraciones y números de muestras con este grupo similares entre ambas islas, no se encontraron diferencias significativas entre ambas islas (Tabla 7.1).

Para la **etapa reproductiva**, el grupo se comportó de la siguiente manera: co>in>cr (Tabla 7.3), sin que se encontraran diferencias significativas, ni se observaron diferencias significativas entre la interacción isla-etapa reproductiva (Tabla 7.1).

En relación al **sexo**, las hembras presentaron una frecuencia de 36. 23%, siendo menor en comparación con la de los machos 42.37%, aunque el grupo se presentó con mayor frecuencia en los machos, no obstante, las hembras tienen un promedio mayor que en los machos (Tabla 7.2), no se detectaron diferencias significativas entre los sexos, ni en la interacción isla-sexo (Tabla 7.1).

Σ Endrines

El grupo está compuesto por endrín y sus metabolitos el endrín ketona (endrín cetona) y endrín aldehído. Este grupo resultó ser el predominante entre los organoclorados debido a que fue detectado en 94 muestras, correspondiendo al 74.60% de las muestras. Fue detectado en ambas islas, a lo largo de la temporada reproductiva, en ambos sexos y en los pollos, es el grupo con mayor presencia en los pollos.

El grupo Σ Endrines, es muy predominante en ambas **islas**, especialmente uno de los metabolitos de este grupo el endrin ketona. Este grupo, en FSI, se encontró en el 60.6% de las muestras, mientras que en IER el 77.14%, En FSI el promedio fue (15.97 ± 54.2 ng ml $^{-1}$), mientras que IER, presentó un promedio

menor (7.3 ± 17.3 ng ml $^{-1}$), se encontraron diferencias significativas entre islas FSI>IER, (Tabla 7.1).

En el caso de la **temporada reproductiva**, las concentraciones del grupo de los Endrines se comportaron de la siguiente manera co> in> cr (Tabla 7.3), presentándose diferencias marginalmente significativas (GLM, F= 0.051) entre las etapas reproductivas (Tabla 7.1), por lo que se decidió realizar la prueba *post hoc* HSD de Tukey, la prueba encontró que existen diferencias significativas entre las etapas de cortejo y crianza, pero no existen diferencias entre las etapas de cortejo e incubación e incubación y crianza. Para la interacción entre la isla-temporada reproductiva, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 7.1).

En relación al **sexo**, los endrines de detectaron en el 72.46% de muestras provenientes de hembras, mientras que para los machos fue en el 69.49%. Los machos presentaron un promedio mayor que las hembras (Tabla 7.2), sin que se observaran diferencias significativas entre los sexos y la interacción sexo-isla (Tabla 7.1).

Σ Endosulfán

Este grupo está compuesto por endosulfán-α y endosulfán-β y su metabolito el endosulfán sulfato. El grupo sólo se detectó en 16 muestras alcanzando el 12.70% de las muestras. El endosulfán-β fue detectado en una sola muestra, el grupo Σ Endosulfán fue detectado en ambas islas, en las etapas de cortejo e incubación pero no en crianza y en ambos sexos.

El grupo del endosulfán, se detectó en pocas muestras de ambas **islas**, correspondiendo al 10.6 y 8.57% en FSI e IER, respectivamente. FSI (0.37 ± 1.4 ng ml $^{-1}$) presentó un promedio mayor que IER (3.83 ± 26.1 ng ml $^{-1}$), no obstante no se encontraron diferencias significativas entre islas (Tabla 7.1).

Para las etapas de la **temporada reproductiva**, los niveles del grupo describieron el siguiente comportamiento: co> in> cr (Tabla 7.3), no obstante,

no se encontraron diferencias significativas entre las etapas reproductivas (Tabla 7.1), de la misma manera no se observó entre la etapa reproductiva y la isla (Tabla 7.1).

Para los **sexos**, el grupo mostró porcentajes de detección similares en ambos sexos, 13.04 y 15.25% en hembras y machos, respectivamente. Siendo las hembras, las que presentaron valores mayores que machos (Tabla 7.2), sin embargo no existen diferencias significativas entre los sexos y la interacción isla y sexo (Tabla 7.1).

Σ pOCs (Suma de los plaguicidas organoclorados)

Finalmente, se evaluó la presencia de la suma total de plaguicidas y sus metabolitos en plasma sanguíneo, en total los plaguicidas fueron detectados en 112 muestras, lo que corresponde al 82.35 % de las muestras.

Si bien, no se encontraron diferencias significativas entre algunos grupos de pOCs, al evaluar el total de estos, si se encontraron diferencias significativas entre las **islas,** mostrando la siguiente jerarquía, IER>FSI, 35.01 ± 134.2 ng ml^{-1}, 31.6 ± 76.1 ng ml^{-1}, respectivamente. La frecuencia de detección de las sumas de los compuestos clorados, como era de esperarse fue alta, con un 75.75 y 88.57% en FSI e IER, respectivamente.

En cuanto a las **etapas reproductivas**, se observa una clara tendencia en la disminución de la concentración de los Σ pOC's conforme avanza la temporada reproductiva, se observa el siguiente comportamiento de las concentraciones de Σ pOCs: co> in> cr (Tabla 7.3), observándose diferencias significativas entre la etapa reproductiva y la concentración de Σ pOC's (Tabla 7.1) (Figura 7.2). Por lo que se realizó la prueba *post hoc* HSD de Tukey, encontrando que la etapa de cortejo es diferente de las etapas de incubación y crianza, pero la etapa de incubación y crianza no son diferentes. La interacción etapa reproductiva-isla fue significativa (Tabla 7.1), lo que sugiere que existen patrones temporales de las concentraciones de Σ pOCs entre las islas (Figura 7.3), observándose que

existe una tendencia a la baja de las concentraciones (ng ml^{-1}) de los Σ pOC's, en FSI.

La suma de pOCs, se detectó en proporciones muy similares entre ambos **sexos**, correspondiendo al 84.01 y 85.71% de hembras y machos. Los machos presentaron un promedio mayor que las hembras, mientras que las hembras presentaron un valor máximo mayor (Tabla 7.2), sin que se observen diferencias significativas entre los sexos y la interacción isla-sexo (Tabla 7.1).

Tabla 7.1 Resultados del modelo lineal generalizado de la sumatoria de cada grupo de plaguicida y la su sumatoria total Σ pOC's, calculadas para los diferentes factores e interacciones evaluadas. N.S: No significativa p>0.05, los valores en negrita (p<0.05).

Factor/Interacciones	Σ HCH	Σ Heptacloro	Σ Clordanos	Σ Drines	Σ Endrines	Σ DDTs	Σ Endosulfán	Σ pOCs
Isla	N.S	N.S	N.S	N.S	**0.013**	N.S	N.S	**0.012**
Etapa reproductiva	**0.021**	N.S	N.S	N.S	**0.050***	**0.000048**	**N.S**	**0.002**
Sexo	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	**0.0307**	N.S	N.S
Día Juliano estandarizado	N.S	N.S	N.S	N.S	**0.005**	N.S	N.S	N.S
Isla-Etapa reproductiva	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	**0.024**
Isla-Sexo	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
Etapa reproductiva-Sexo	N.S	**0.0198**	N.S	N.S	N.S	**0.0008**	N.S	N.S
Día Juliano estandarizado-Isla	N.S	N.S	N.S	N.S	**0.005**	N.S	N.S	**0.007**

*: Diferencia marginalmente significativa.

Tabla 7.2 Concentración (ng ml $^{-1}$) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados y sumatoria de los grupos en plasma sanguíneo. H: Hembras, M: Machos. En ambas islas por separado.

		FSI			IER		
Grupo de pOCs	**Sexo**	**Promedio**	**D.E.**	**Máximo**	**Promedio**	**D.E.**	**Máximo**
Σ HCHs	H	4.712	10.786	60.788	20.046	104.784	621.821
	M	11.438	30.393	159.317	11.373	39.837	182.419
Σ Heptacloro	H	0.320	1.515	8.778	0.088	0.481	2.845
	M	0.201	0.641	2.451	2.391	7.559	27.570
Σ DDTs	H	2.915	6.132	26.398	1.681	3.820	18.369
	M	0.608	1.627	7.225	0.071	0.324	1.483
Σ Drines	H	2.284	5.628	25.893	2.825	10.656	60.057
	M	3.424	12.351	62.492	2.012	9.222	42.260
Σ Clordanos	H	2.564	6.005	20.992	2.701	9.527	55.449
	M	2.185	4.814	18.479	2.146	5.552	21.053
Σ Endrines	H	9.491	16.285	95.869	6.218	8.101	30.184
	M	22.816	75.881	425.014	9.218	26.530	122.735
Σ Endosulfán	H	0.270	0.809	3.558	6.064	32.992	195.357
	M	0.474	1.890	10.824	0.099	0.454	2.082
Σ pOCs	H	22.556	41.683	229.230	39.623	159.364	951.053
	M	41.156	100.361	520.644	27.310	78.983	353.777

Tabla 7.3 Concentración (ng/ml) de los diferentes grupos de plaguicidas organoclorados en plasma sanguíneo, en las etapas de la temporada reproductiva (Co: Cortejo, In: Incubación, Cr: Crianza).

		FSI			IER		
Grupos	**Etapa reproductiva**	**Prom**	**D.E**	**Máx**	**Prom**	**D.E.**	**Máx**
Σ HCHs	Co	9.631	24.739	159.317	30.465	132.103	621.821
	In	7.176	20.816	83.951	10.988	37.311	182.419
	Cr	0.167	0.442	1.17	0.648	1.115	3.336
Σ Heptacloro	Co	0.342	1.37	8.778	nd	nd	nd
	In	0.153	0.613	2.451	2.211	7.082	27.57
	Cr	nd	nd	nd	0.021	0.068	0.214
Σ DDTs	Co	2.503	5.493	26.398	2.594	4.606	18.369
	In	0.406	0.921	2.9	0.074	0.253	0.948
	Cr	nd	nd	nd	0.148	0.469	1.483
Σ Drines	Co	3.962	11.234	62.492	2.73	12.804	60.057
	In	0.635	2.54	10.161	3.378	9.43	42.26
	Cr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ Clordanos	Co	2.824	5.957	20.992	3.838	11.908	55.449
	In	1.792	4.706	18.097	1.961	5.21	21.053
	Cr	0.615	1.628	4.307	0.812	1.807	5.889
Σ Endrines	Co	18.938	63.196	425.014	6.706	7.509	30.184
	In	12.945	31.46	127.948	10.41	25.228	122.735
	Cr	2.098	2.461	6.315	1.383	1.254	3.238
Σ Endosulfán	Co	0.497	1.698	10.824	9.393	41.599	195.357
	In	0.141	0.563	2.252	0.32	0.848	3.396
	Cr	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ΣpOCs	Co	38.426	86.64	520.644	55.726	200.363	951.053
	In	23.249	52.717	211.899	29.343	74.194	353.777
	Cr	2.881	3.156	7.368	3.012	3.989	12.674

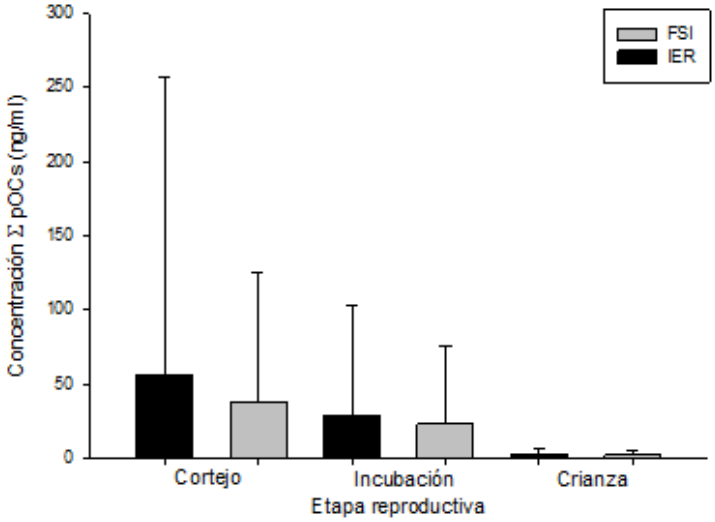
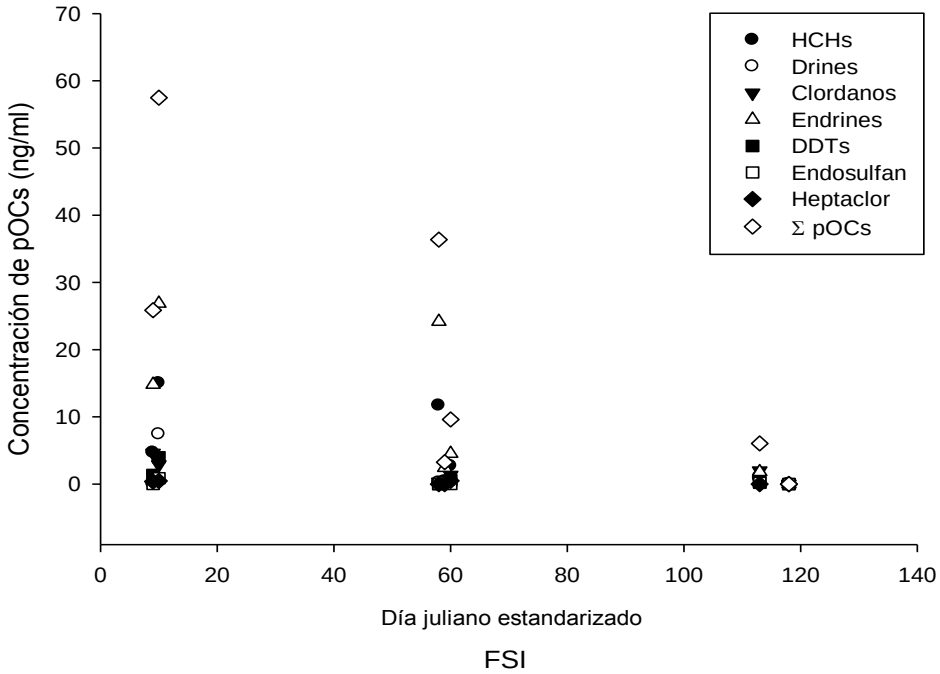
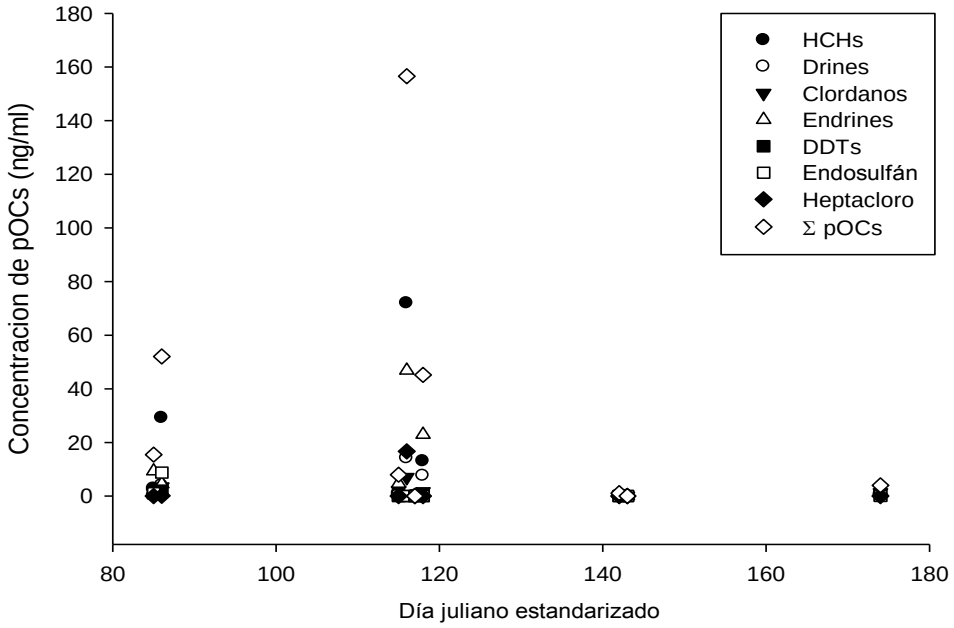


Figura 7.2 Concentración (ng/ml) de plaguicidas organoclorados en las etapas reproductivas, en ambas islas.



FSI



IER

Figura 7.3 Concentraciones de los grupos de plaguicidas las islas FSI e IER, respecto al día juliano estandarizado.

7.2 Relación heterófilo-linfocito (H/L)

Para realizar los cálculos de la relación H/L, primeramente se realizó la caracterización celular de los eritrocitos y los glóbulos blancos, es decir, los leucocitos (heterófilos, eosinófilos, linfocitos, basófilos, monocitos y trombocitos), sin embargo, en el conteo diferencial se excluyeron los trombocitos.

Las características encontradas en las células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos), para la especie *Sula nebouxii*, son similares a las descritas por el libro de hematología aviar de Ritchie *et al.,* (1994) y (Clark *et al.*, 2009), además de otros grupos de aves como anátidos (Ross-Muños, 2011) psitácidos (Campbell, 2010) y aves playeras (Cruz-Acevedo, 2012) (Anexo VI).

En la Tabla 7.4 se observa el conteo diferencial de leucocitos y la relación heterófilo/linfocito promedio para aves marinas[1], así como, los obtenidos en este estudio para los bobos de patas azules (*Sula nebouxii*) adultos, (n=128). Los datos muestran que, en general para aves marinas, existe una amplia variabilidad en el conteo leucocitario y por ende en la relación H/L.

Tabla 7.4 Conteo diferencial de leucocitos e Índice H/L de aves marinas[1] y de *S. nebouxii* obtenido en este estudio.

Aves marinas						
Variable	**He**	**Eo**	**Ba**	**Li**	**Mo**	**H/L**
Prom	42.83	7.48	1.72	45.31	2.44	1.46
D.E.	14.94	7.05	2.28	16.80	2.03	1.66
Max	72.00	26.10	10.10	71.10	8.00	6.45
Min	22.00	0.10	0.00	11.20	0.20	0.31
Sula nebouxii						
Prom	28.35	26.48	0.18	41.64	3.35	0.77
D.E.	9.20	11.86	0.40	12.61	2.12	0.42

[1] Fuente: Avian Leukocyte Profiles en The Wildlife Leukocytes Website. En línea www.wildlifehematology.uga.edu

Tiempo de manipulación

Debido a que el estrés en general (como temperatura, psicológicos, de contaminación, etc.), tiene influencia en la relación H/L, es que se deben descartar la mayoría de estos aspectos. Uno de los más importantes es el tiempo de manipulación de los organismos, al momento de la toma de muestra, por lo cual se miden los tiempos de manipulación, es decir el tiempo transcurrido desde la captura de los organismos, hasta su liberación.

Los tiempos de manipulación variaron ampliamente entre los muestreos, registrándose tiempos desde 3 min (como mínimo) hasta 62 min (máximo). El tiempo de manipulación mostró dependencia con el índice H/L, (R^2= 0.0001) (Figura 7.4), tampoco se observa que exista algún efecto en el índice H/L y el tiempo de manipulación (GLM, F=0.037, p=0.847).

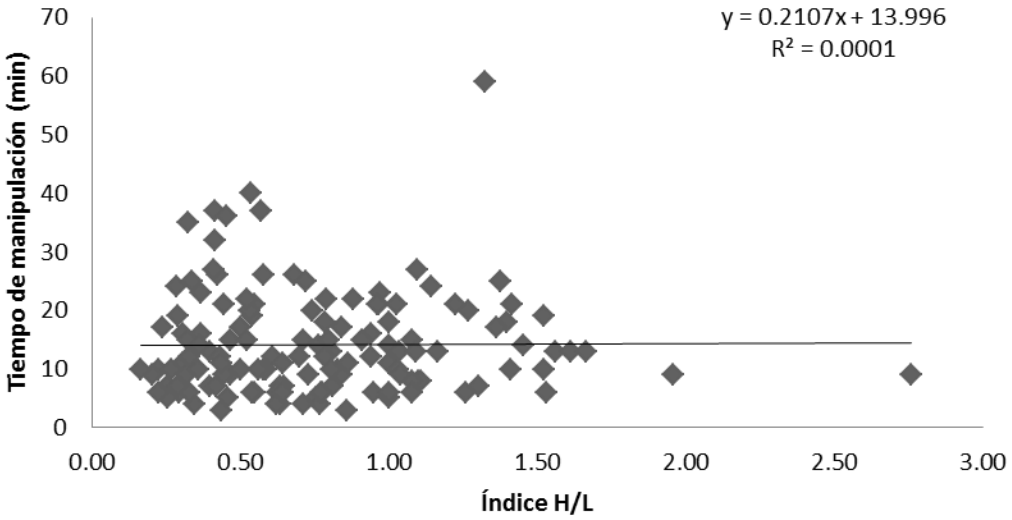


Figura 7.4 Relación del índice H/L respecto al tiempo de manipulación.

Variación del Índice H/L entre ambas islas

La relación H/L con respecto a las 2 islas, en este estudio, el promedio más alto de H/L se presentó en FSI (N=72) 0.88 ± 0.45, con un valor máximo y mínimo de 2.76 y 0.17 respectivamente. Mientras que en IER (N=56), el promedio del índice H/L fue 0.60 ± 0.39, con un valor máximo y mínimo de 1.45 y 0.20

respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre ambas islas (GLM, F=10.093, p= 0.0018).

Variación de la relación H/L entre edades.

Los resultados de H/L varían significativamente entre las edades (U, Z=3.218, p= 0.0012), sin embargo, esto se debe tomar con reservas, debido a que la diferencia en el número de organismos muestreados, entre edades, es muy grande (128 organismos adultos y solo 7 pollos).

En promedio, la relación H/L para adultos fue de 0.78 (con valores máximos y mínimos de 2.76 y 0.17, respectivamente) y para pollos es de 0.37 (con valores máximos y mínimos de 0.70 y 0.22, respectivamente) (Figura 7.5). No fue posible realizar una comparación entre edades e islas, debido a que el número de pollos en ambas islas fue muy bajo (2 y 5 para FSI y IER, respectivamente) en relación a los adultos

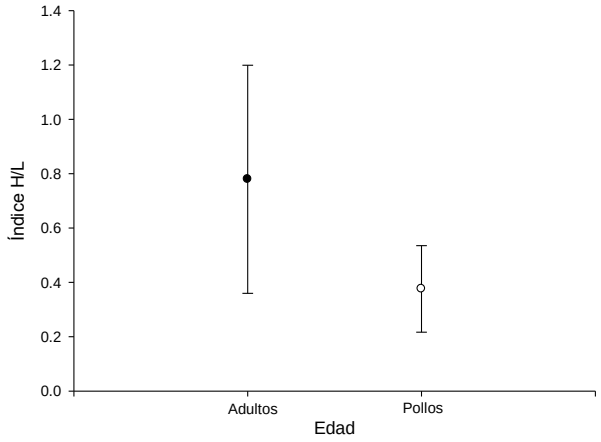


Figura 7.5 Comparación entre edades (Adultos y Pollos) en ambas islas respecto a H/L.

Variación de la relación H/L entre Sexos.

En cuanto a los resultados obtenidos de la relación H/L, tanto de machos como de hembras (de ambas islas), fueron muy similares. Para machos, el valor promedio se encontró en 0.8 (con valor máximo de 2.76 y mínimo de 0.20) y

para las hembras en 0.76 (con valor máximo de 1.56 y mínimo de 0.17), no se encontraron diferencias significativas entre el índice H/L y los sexos (GLM, F=0.268, p=0.60). Tampoco se encontró efecto en la interacción isla-sexo (GLM, F=3.362, p= 0.069)

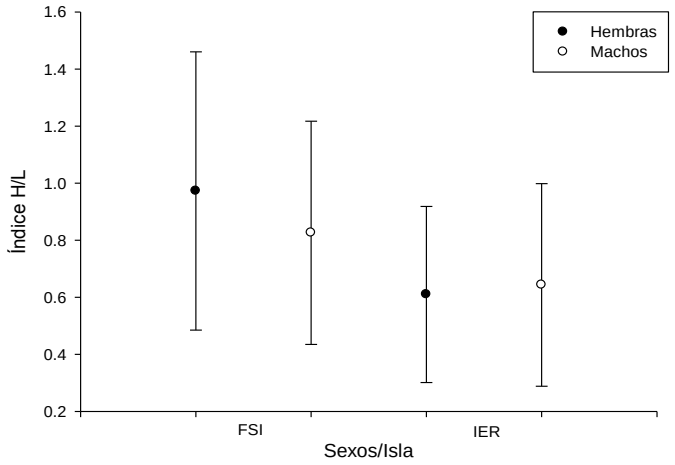


Figura 7.6 Comparación entre sexos en ambas islas respecto a H/L.

Temporada reproductiva

Para inferir si existen diferencias significativas entre las etapas de la temporada reproductiva, se evaluó la variación del índice H/L de ambas islas, se observaron diferencias significativas entre etapas de la temporada reproductiva (GLM, F=3.762, p=0.026). Se realizó una prueba *post-hoc*, usando el método de diferencia mínimas de Fisher, los resultados indicaron que la temporada de cortejo es diferente a incubación y crianza, mientras que estas últimas no presentan diferencias significativas (Figura 7.7).

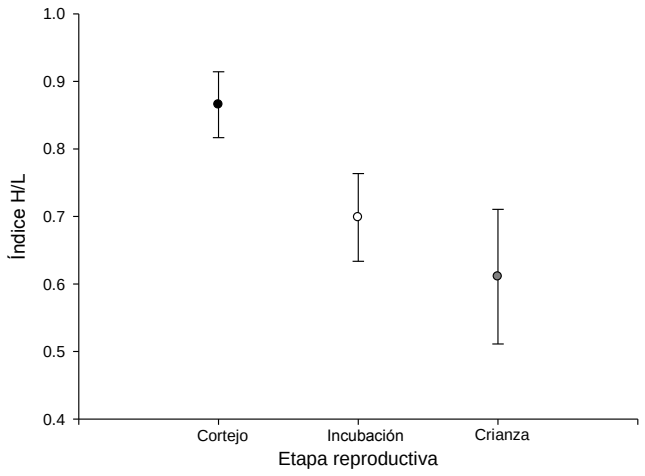


Figura 7.7 Comparación del índice H/L, para cada una de las etapas reproductivas en ambas islas.

Se presentaron diferencias del índice H/L en las etapas reproductivas entre islas, (GLM, F=6.798, p= 0.0015). Para IER, no se encontraron diferencias significativas ($F_{(2,53)}$=0.211, p= 0.81, mientras que para FSI si se encontraron diferencias significativas entre etapas de la temporada reproductiva (K-W, ANOVA H (2,72)= 6.733, p=0.034), (Figura 7.8). Se realizó la prueba LSD, entre las etapas de la temporada reproductiva y se encontró que sólo la etapa de crianza presentaba diferencias significativas de la etapa de cortejo e incubación (p=0.0474). Finalmente no se encontró que la interacción entre la etapa reproductiva y el sexo (GLM, F=0.0714, p=0.9256).

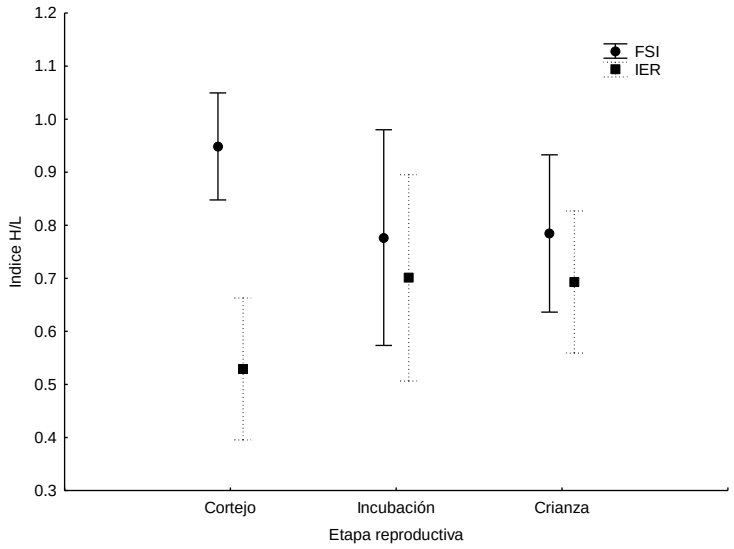


Figura 7.8 Valores promedio del índice H/L, así como su desviación estándar para cada una de las etapas reproductivas en FSI e IER con la corrección de covariados.

Finalmente, como parte complementaria a la descripción de las variaciones de las relaciones H/L por cada componente, se realizó un análisis para construir modelos mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés), el cual nos ayudó a determinar cuál de los posibles modelos es más simple y que explicó mejor la varianza (Anexo VII).

7.3 Ensayo de micronúcleos

De los 137 organismos, sólo a 123 (116 adultos y 7 pollos) se les realizo el ensayo de micronúcleos, debido a fallos en la metodología (elaboración del frotis). La tasa de eritropoyesis (TEP) sólo se determinó en 116 muestras. Durante la prueba de micronúcleos se contemplan distintos parámetros (Figura 7.9)

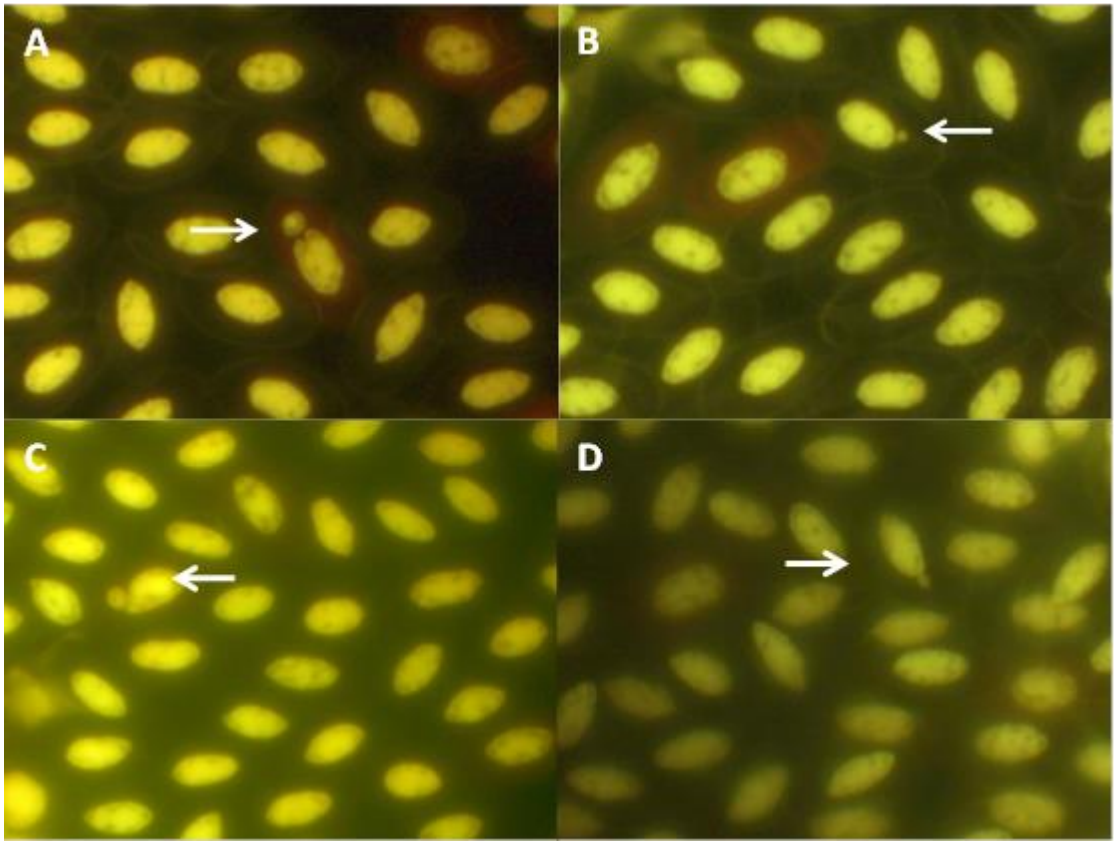


Figura 7.9 Representación gráfica de los parámetros encontrados en el ensayo de Micronúcleos: Micronúcleos en Eritrocitos A) Policromáticos (MNEPC) y B) Normocromáticos (MNENC); y Prolongaciones Nucleares "*Bud Cells*" en Eritrocitos C) Policromáticos (BCEPC) y D) Normocromáticos (BCENC).

Micronúcleos y prolongaciones nucleares en eritrocitos totales

- **Micronúcleos en Eritrocitos Totales (MNET)**

No hubo diferencias significativas entre islas (GLM, p>0.05) en IER hubo, 1.92±1.9 MNET que FSI 1.27±1.64. No hubo diferencias entre sexos (GLM, p>0.05), (Tabla 7.5), hubo un efecto significativo en la interacción isla-sexo (GLM, F=4.50, p=0.036).

Hubo diferencias significativas entre las etapas (GLM, F=6.877, p=0.0015), no hubo diferencias entre edades (adultos y pollos) (GLM, p>0.05). La interacción isla-etapa reproductiva no fue significativa (GLM, p>0.05) (Tabla 7.5).

- **Prolongaciones nucleares en Eritrocitos Totales (BCET)**

Hubo diferencias significativas entre islas en las BCET (GLM; F =7.2459, p=0.008). En IER fue mayor el número de BCET (8.32±7.01) que en FSI (5.23 ± 5.30). Hubo diferencias entre sexos (GLM: F=16.079, p=0.0001). Las hembras tuvieron promedio mayor de BCET que los machos (8.87 ± 7.1 y 3.76 ± 3.44, respectivamente). La interacción isla-sexo no fue significativa (GLM, p>0.05).

Hubo diferencias entre las etapas (GLM: F=3.41, p=0.037) mostrando el siguiente (co<in>cr), mostrando diferencias entre las etapas, la prueba post-hoc encontró que, solo entre incubación y crianza no presentaron diferencias entre ellas. No hubo diferencias entre edades (GLM, p>0.05).

Micronúcleos y prolongaciones nucleares en eritrocitos policromáticos (MNEPC) y (BCEPC)

- **Micronúcleos en Eritrocitos Policromáticos**

No hubo diferencias entre las islas en los MNEPC (GLM, p>0.05), FSI =0.32 ± 0.65, IER=0.53 ± 0.84. Tampoco entre sexos en la frecuencia MNEPC (GLM, p>0.05) (Tabla 7.5). La interacción sexo-isla no fue significativas (GLM, p>0.05).

Hubo diferencias en los MNEPC entre las etapas de la reproducción (GLM, F=4.39, p=0.014). La frecuencia de MNEPC se incrementó en el trascurso de la

temporada, siendo menor durante el cortejo e incubación de huevos que durante el periodo de crianza de pollos (Tabla 7.5), observándose diferencias entre las etapas (GLM: F=4.39, p=0.014), cortejo sólo es diferente a crianza. La interacción isla-etapa reproductiva, y la interacción etapa reproductiva-sexo no fueron significativas (GLM, p>0.05). Hubo diferencias significativas entre pollos y adultos (2.38 ± 3.16 y 1.57 ± 1.79) (GLM; F=16.84, p=0.00007) (Tabla 7.5).

- **Prolongaciones nucleares en eritrocitos policromáticos**

Hubo diferencias significativas entre las islas en la frecuencia de anormalidades nucleares (BCEPC) (GLM: F=10.32, p=0.002). IER la frecuencia de BCEPC fue mayor que en FSI (1.06 ±1.2 y 0.92 ± 1.322, respectivamente). No hubo diferencias entre los sexos (GLM, p>0.05), y la interacción isla-sexo no fue significativa (GLM, p>0.05) (Tabla 7.5).

Hubo diferencias significativas entre las etapas reproductivas (GLM: F=17.57, p=0.0001). La frecuencia de BCEPC se incrementó en el transcurso de la temporada reproductiva (co<in<cr), (Tabla 7.5), se encontró que todas las etapas reproductivas son diferentes entre sí. Las interacciones isla-etapa reproductiva y sexo-etapa reproductiva no fueron significativas (GLM, p>0.05). Hubo diferencias significativas entre pollos y adultos (9.38 ± 5.56 y 6.65 ± 6.31) (GLM; F=8.608, p=0.004) (Tabla 7.5).

Micronúcleos y prolongaciones nucleares en eritrocitos normocromáticos (MNENC) y (BCENC)

- **Micronúcleos en Eritrocitos Normocromáticos**

Hubo diferencias significativas entre las islas en MNENC (GLM: F=4.395, p=0.038).En IER (1.415 ± 1.49), está por encima de FSI (0.95 ± 1.31). No hubo diferencias entre sexos (GLM, p>0.05) hembras las que ligeramente, presentaron mayor promedio de MNENC que los machos, (Tabla 7.5) se observó un efecto entre la interacción isla-sexo (GLM: F=4.118, p=0.045).

No hubo diferencias significativas entre las etapas reproductivas (GLM, p>0.05). la frecuencia de MNENC, presentó el siguiente patrón co>in>cr (Tabla 7.5). Las interacciones isla-etapa reproductiva y sexo-etapa reproductiva, no fueron significativas (GLM, p>0.05). No hubo diferencia entre edades (GLM, p>0.05).

- **Prolongaciones nucleares en Eritrocitos Normocromáticos**

Hubo diferencias significativas entre islas en la frecuencia de prolongaciones nucleares en eritrocitos normocromáticos (BCENC) GLM: F=0.022, p=0.022). En IER, la frecuencia de BCENC fue mayor FSI (7.74 ± 6.86 vs 4.98 ± 4.99). Hubo diferencias significativas entre sexos (GLM: F=19.7, p=0.00002) (Tabla 7.5). La interacción isla-sexo, no fue significativa (GLM, p>0.05).

Hubo diferencias significativas entre las etapas reproductivas GLM: F=6.73, p=0.0018) las etapas presentaron el siguiente patrón: co<in>cr (Tabla 7.5). Sólo la etapa de cortejo es diferente a las etapas de incubación y crianza. La interacción isla-etapa reproductiva fue significativa (GLM: F=3.175, p=0.046) mientras que la interacción sexo-etapa reproductiva no fue significativa (GLM, p>0.05). No hubo diferencias significativas entre adultos y pollos (GLM, p>0.05).

Tasa de eritropoyesis (TEP)

Hubo diferencias significativas entre las islas y la tasa de eritropoyesis (GLM: F=5.51, p=0.02), FSI= 807.14±267.26, IER= 814.76±219.17. No hubo diferencias entre sexos y la tasa de eritropoyesis (GLM, p>0.05) (Tabla 7.5) Mientras que la interacción isla-sexo fue significativa (GLM: F=4.73, p=0.032).

Hubo diferencias entre las etapas reproductivas (GLM: F=6.63, p=0.001) presentando el siguiente patrón co>in<cr (Tabla 7.5). Sólo cortejo es diferente a las demás etapas. La interacción isla-etapa reproductiva, no fue significativo (GLM, p>0.05). La TEP es mayor en pollos (Tabla 7.5), no obstante no hubo diferencias significativas entre edades y TEP (GLM, p>0.05).

Tabla 7.5 Promedio y deviación estándar de los diferentes parámetros de la prueba de micronúcleos, en ambos sexos, etapas de la temporada reproductiva y edades.

		n	MNET		BCET		MNEPC		BCEPC		MNENC		BCENC		TEP	
			Prom	D.E.	Prom	D.E.	Prom	D.E.	Prom	D.E.	Prom	D.E	Prom	D.E.	Prom	D.E
Sexo	Hembras	65	1.492	1.769	8.877	7.094	0.354	0.648	1.015	1.293	1.169	1.364	8.492	6.806	815.632	223.384
	Machos	50	1.680	1.823	3.760	3.444	0.500	0.863	0.940	1.236	1.160	1.490	3.340	3.088	776.931	162.049
Etapa reproductiva	Cortejo	62	1.065a	1.366	4.081a	4.174	0.258a	0.599	0.532a	0.900	0.887a	1.332	3.774a	4.014	832.53a	166.64
	Incubación	38	2.000a	1.860	10.05b	7.414	0.658ab	0.938	1.158b	1.242	1.395a	1.366	9.711b	7.097	785.59b	227.14
	Crianza	15	2.522a	2.644	8.913b	5.861	0.913b	1.443	2.391c	1.559	1.826a	1.992	7.913b	5.334	786.21b	426.92
Edad	Adultos	116	1.57	1.79	6.65	6.31	0.42	0.75	0.98	1.26	1.17	1.41	6.25	6.06	798.43	198.55
	Pollos	7	2.38	3.16	9.38	5.58	1.75	2.12	2.38	1.77	2.00	2.62	8.25	4.74	1004.95	611.17

MNET: micronúcleos en 10,000 eritrocitos, BCET: prolongaciones nucleares en 10,000 eritrocitos, MNEPC: micronúcleos en 1,000 eritrocitos policromáticos, BCEPC: prolongaciones nucleares en 1,000 eritrocitos policromáticos, MNENC: micronúcleos en 1,000 eritrocitos normocromáticos, BCENC: prolongaciones nucleares en 1,000 eritrocitos policromáticos. Tasa de eritropoyesis TEP

7.4 Índice de condición

Para el cálculo del índice de condición (IC) son necesarios los datos de peso (g) y la ulna (mm), excluyeron algunos organismos, sólo se pudo calcular el índice de condición a 126 organismos (54 machos y 72 hembras).

Hubo diferencias significativas entre **islas** (Anova, F=5.2035, p=0.0244). En FSI, 1.57±1.26 mientras que IER, y 0.81±1.34. Hubo diferencias significativas entre **sexos** (Anova: F=6.263, p=0.0136), el IC en machos es menor que el de las hembras, -0.26±1.48 y 2.23±1.09, respectivamente. La interacción isla-sexo no fue significativa (Anova, p>0.05). Hubo diferencias significativas entre **etapa reproductiva** (Anova, F=4.758, p=0.01) cortejo N=71 (-1.64 ± 7.72) <incubación N=40 (1.87± 9.04) <crianza N=15 (2.6 ± 6.25). La etapa de cortejo sólo es diferente a incubación. La interacción isla-etapa reproductiva fue significativa (Anova: F=4.6522, p=0.011) (Figura 7.10).

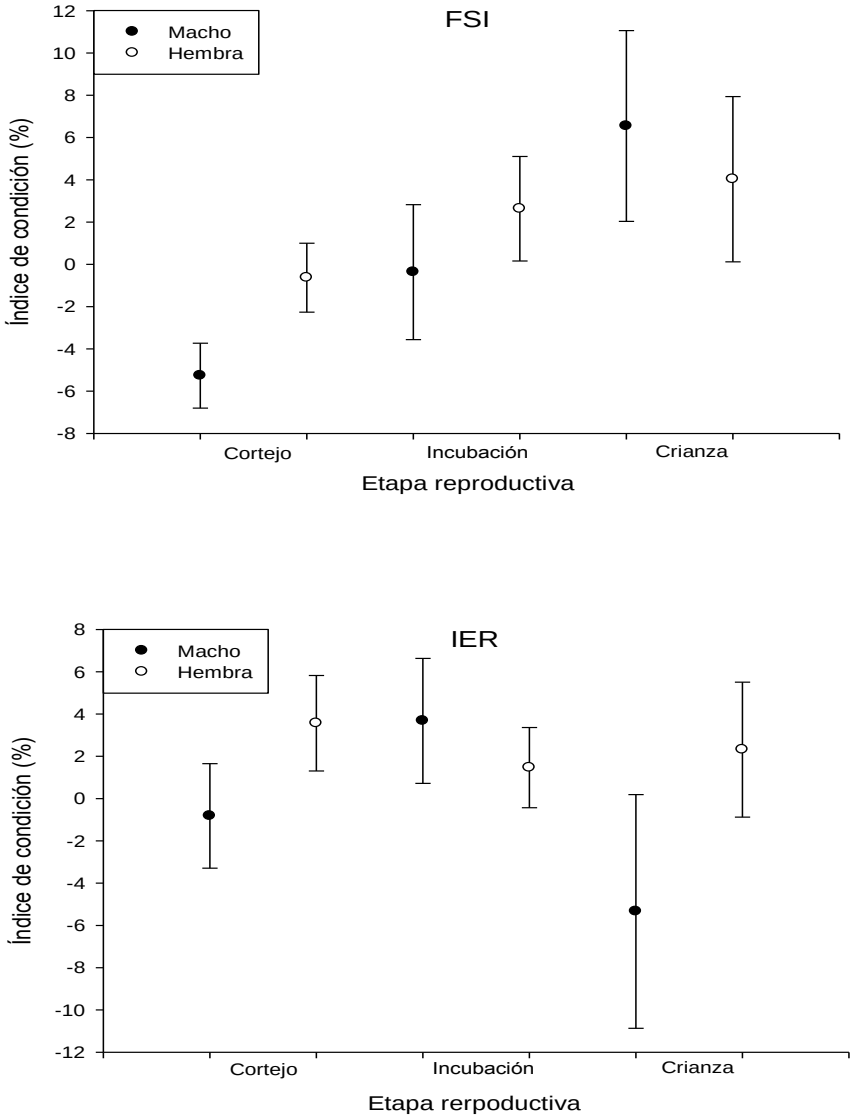


Figura 7.10 Índice de condición observada en etapa reproductiva y sexos en ambas islas, FSI n=72 arriba y IER abajo n=54.

7.5. Relación entre las concentraciones de los pOCs y biomarcadores

Índice H/L: De las concentraciones de pOCs, sólo un grupo dio significativo (**ΣDDT, GLM, b=0.223 F=5.784 p=0.0176)**, mientras que los demás grupos no: Σ Clordanos GLM, F=1.8942, p=0.17; Σ Endrines GLM, F=0.781, p=0.378; Σ Drines, GLM, F=0.249, p=0.618; Σ Endosulfán, GLM, F=0.0868, p=0.7688; Σ HCH, GLM, F=0.0689, p=0.7933; Σ Heptacloro, GLM, F=0.0038, p=0.9505; Σ pOCs, GLM F=0.2671, p=0.6063.

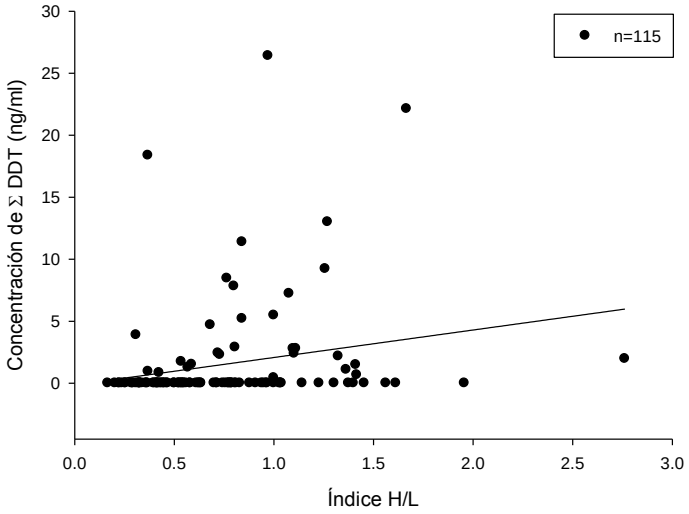


Figura 7.11 Relación entre la concentración de Σ DDT y el índice H/L.

IC: Ningún covariado dio significativo.

MNET: Ningún covariado dio significativo.

BCET: Sólo la sumatoria total de plaguicidas dio significativa (**ΣpOCs, GLM, b=-0.017, F=6.025 p=0.01)**; Σ Endosulfán, GLM, F=2.7158, p=0.1016; Σ Clordanos, GLM, F= 1.0123, p=0.3166; Σ HCH, GLM, F=1.915, p=0.169; Σ DDT, GLM, F= 0.163, p=0.687; Σ Endrines, GLM, F=0.308, p= 0.58; Σ Drines, GLM, F=0.246, p=0.621; Σ Heptacloro, GLM, F= 0.009, p=0.9243.

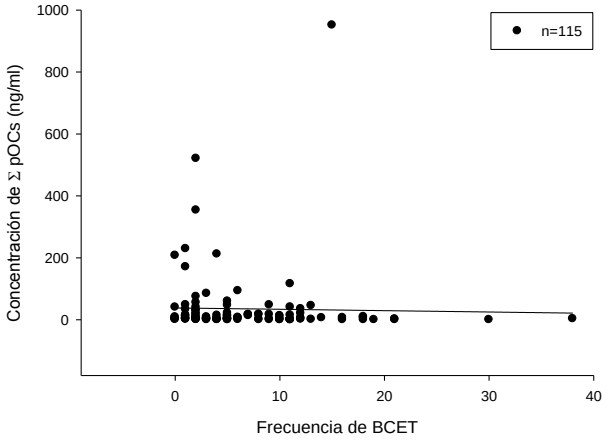


Figura 7.12 Relación entre la concentración de pOCs y la frecuencia de BECT.

MNEPC: Varios factores dieron significativos, **Σ Heptacloro, GLM, b= F= 4.722, p= 0.032; Σ Endrines, GLM, b=-0.088, F=, p=0.0258; Σ pOCs, b, -0.015, GLM, F=, p=0.0150**. Σ DDT, GLM, F=0.001, p=0.9764; Σ Endosulfán, GLM, F= 0.4712, p=0.494; Σ Drines, GLM, F= 0.774, 0.381; Σ Clordanos, GLM, F= 2.215, p=0.139; Σ HCH, GLM, F=1.995, p=0.161.

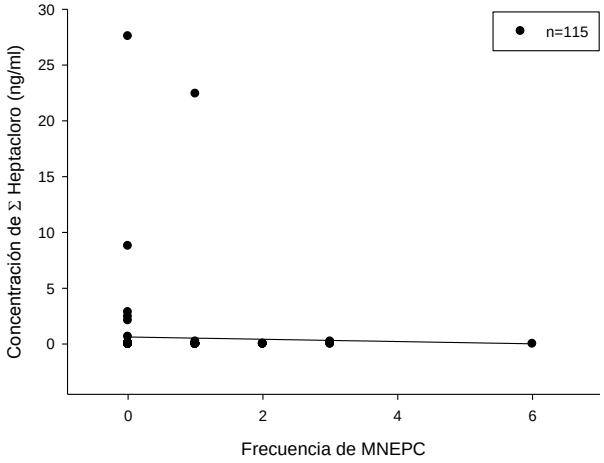


Figura 7.13 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC.

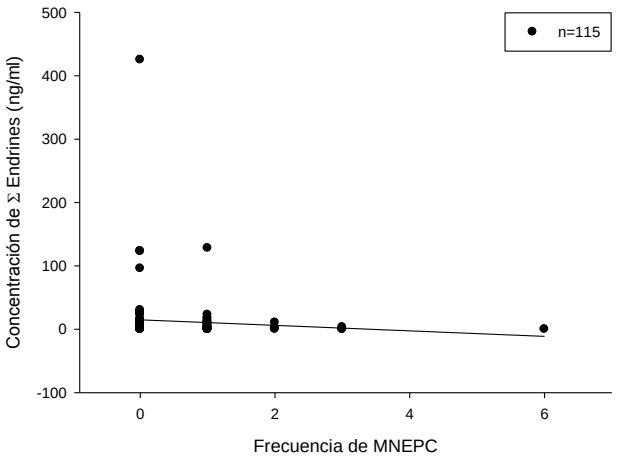


Figura 7.14 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC

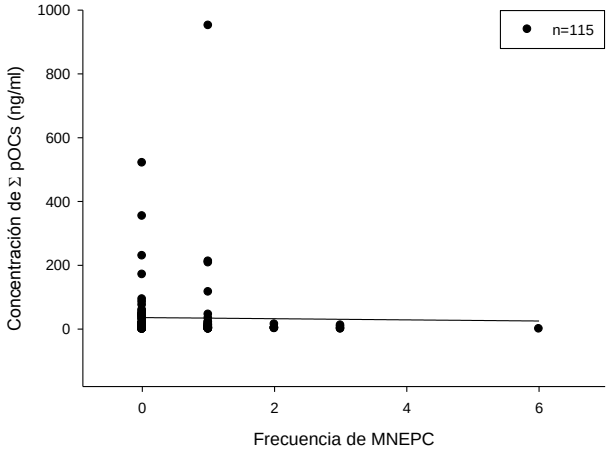


Figura 7.15 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC

BCEPC: Ningún covariado dio significativo.

MNENC: Ningún covariado dio significativo.

BCENC: Ningún covariado dio significativo.

TEP: Sólo un grupo fue significativo **ΣDDT, GLM, b=0.156, F= 5.868 p=0.0172**; ΣHCH, GLM, F=0.560, p=0.4562; Σ Heptacloro, GLM, F=0.542, p=0.4635; Σ

Clordanos, GLM, F=1.053, p=0.3076; Σ Drines, GLM, F=0.1296, p= 0.7197; Σ Endrines, GLM, F=0.4525, p=0.503; Σ pOCs, GLM, F=0.63, p=0.43..

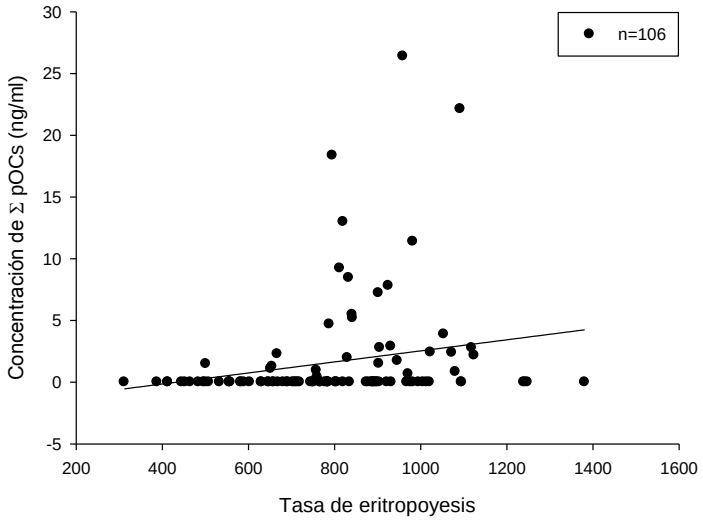


Figura 7.16 Relación entre la concentración de Heptacloro y la frecuencia de MNEPC

Durante los muestreos, se anotó el tamaño de la puesta de huevos (clutch) durante los muestreos. Se encontró que el tamaño de la puesta de huevo se correlacionó con la relación H/L de manera negativa (***r* = -0395, p=0.031**) (Fig. 7.14).

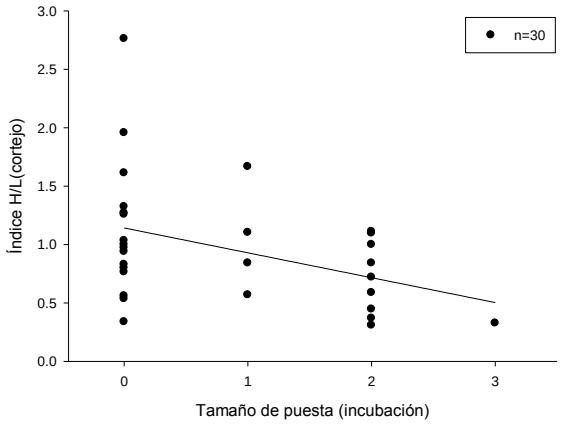


Figura 7.17 Índice H/L (cortejo) respecto al tamaño de puesta observado (incubación).

VIII.- Discusión

Frecuencia de plaguicidas

El plaguicida HCH, se usa en el cultivo de frutas y hortalizas, además tiene usos médicos para el control de piojos, garrapatas y sarna (ATSDR, 2005, Walker, 2001). En realidad es una mezcla de 8 isómeros, entre ellos el isómero HCH-γ, mejor conocido como lindano, es el único que posee propiedades de plaguicida es más tóxico que el HCH-α y HCH-δ, mientras que los isómeros HCH-β y HCH-ε son compuestos inertes, sin embargo se ha observado que el isómero HCH- β tiene efecto estratégico (Weber, 1976; ATSDR, 2005). El isómero metabólicamente más estable, más lipofílico y más persistente de este grupo es el HCH-β (Hassall, 1990; Li *et al.,* 2002), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio, donde la presencia de HCH-β se detectó con mayor frecuencia y concentración que otros isómeros, además, se tiene conocimiento que el HCH-γ también usa en la ganadería para proteger las cabezas de ganado de ectoparásitos.

El heptacloro se utiliza para el control de plagas de hormigas en cosechas de alimentos (ATSDR, 2005), para el control de termitas y generalmente como insecticida, La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) y la EPA han clasificado al heptacloro como posiblemente carcinogénico. El heptacloro se metaboliza a heptacloro epóxido, por lo cual se observa una mayor frecuencia del metabolito en los tejidos de los organismos (ATSDR, 2005), como peces (Bastidas-Bonillas, 2010). El comportamiento anterior presentó el patrón contrario, lo cual significa que si se encuentran

mayores concentraciones del compuesto original, sin metabolizarse, indica una aplicación reciente.

El grupo de los drines (aldrín y dieldrín), son insecticidas con estructuras químicas similares, son usados en las cosechas de maíz y algodón (ATSDR, 2002) y termitas (PISSQ, 1996). Se ha observado que el grupo produce afectaciones en el hígado así como efectos negativos capacidad de combatir infecciones (inmunosupresor) y se cree que afectan la capacidad reproductiva en humanos y poseen propiedades cancerígenas (ATSDR, 2002).

Otro plaguicida es el endrín, se utiliza como insecticida, rodenticida y avicida (Matsumura, 1985; ATSDR, 1996), es altamente tóxico, muy persistente en el medio ambiente (Barberá, 1989), en presencia de luz y altas temperaturas se degrada a sus metabolitos (endrín acetona/ketona y endrín aldehído) (ATSDR, 1996). El endrín ketona fue el metabolito que presentó mayor frecuencia en adultos, pollos y en ambas islas, sus concentraciones en plasma fueron altas, solamente superadas por los HCHs. Lo que concuerda con lo reportado por ATSDR, (1996), donde mencionan que el endrín y sus metabolitos son altamente estables y muy persistentes.

El endosulfán, es una mezcla formada por dos isómeros, endosulfán-α y endosulfán-β, siendo el isómero α el más tóxico de los dos (Ranga y Satyanarayana), sin embargo ambos compuestos poseen propiedades de plaguicidas, es usado principalmente como insecticida (ATSDR, 2013), es especialmente toxico en vertebrados, particularmente en peces (Peterson y Batkey, 1993) y su metabolito es el endosulfán sulfato (Hassall, 1990; ATSDR, 2013). En nuestro estudio se encontraron casi en la misma frecuencia los tres compuestos, lo que sugiere que los plaguicidas padres están siendo degradados a su metabolito.

El DDT y análogos, el DDT se utilizó para matar plagas en general (Rueda,1993; Walker, 2001; ATSDR, 2002) El hecho que no se detectó el DDT en ninguna muestra es una buena señal que nos indica que no ha sido utilizado

recientemente Hassall (1990), ya que la mitad del DDT se metaboliza lentamente en un lapso de 2-15 años (ATSDR, 2002) y de este grupo el metabolito DDE es el más persistente, Robinson (1969) menciona que es el metabolito del DDT que se encuentra con mayor frecuencia en autopsias y biopsias de tejidos de los animales, lo que concuerda con nuestro estudio, donde se observa sólo la presencia de este metabolito (DDE).

El clordano es un compuesto que se usó como plaguicida en campos agrícolas, es una mezcla de compuestos similares, entre ellos el Cis-Clordano y el Trans-Clordano (ATSDR, 1996), según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), no se descarta a los clordanos como compuestos cancerígenos.

ΣpOCs

Las fuente de plaguicidas en los sitios de estudio, claramente es la actividad agrícola del estado de Sinaloa, donde las zonas más productivas para la agricultura se encuentran en las zonas aledañas a los humedales costeros, el agua proveniente de los drenes agrícolas así como los arrastres de sedimentos agrícolas son la mayor fuente de contaminantes de organoclorados en la costa del estado de Sinaloa (Phleger y Ayala, 1969).

Dado que los sedimentos son el depósito final de los compuestos organoclorados, los pOCs en los sedimentos pueden ser afectados por movimientos oceánicos haciéndolos posibles dispersores de pOCs. Prestamos atención especialmente a los movimientos conocidos como surgencias, donde el viento desplaza la capa superior del agua y esta es sustituida por agua del fondo, este movimiento puede resuspender el sedimento liberando los pOCs, minerales y nutrientes en el agua quedando biodisponibles para la biota. En este estudio se observó que en los primeros muestreos, correspondientes a la etapa de cortejo e incubación, la concentración de pOCs en plasma fue mayor en FSI y IER, estos muestreos corresponden con la época de surgencias en la costa del estado de Sinaloa (De la Lanza, 1991) (Figura 8.1), estos movimientos

de agua y resuspensión de sedimento, puede ser una fuente de liberación de pOCs y otros contaminantes.

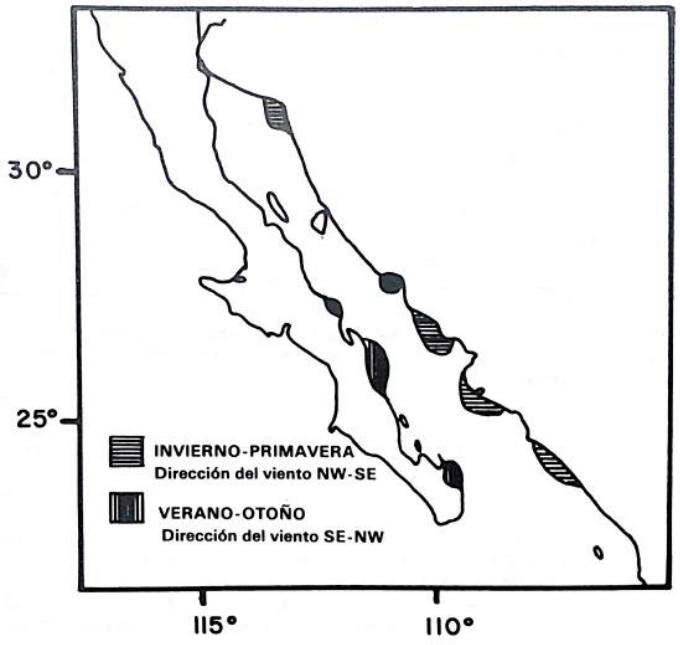


Figura 8.1 Fechas de surgencias en el Golfo de California, en la costa de Sinaloa se presentan en invierno-primavera, Tomado de oceanografía de mares mexicanos, (De la Lanza Espino, 1991).

La edad es un factor importante, dado que se encontraron claras diferencias entre los adultos y los pollos, estos patrones de acumulación de contaminantes han sido observados que la edad es un factor importantes de variación para las concentraciones de los contaminantes químicos (Dikshith, 1991; Aguilar *et al*., 1999). Se ha encontrado que en general los organismos más viejos como los adultos tienen una mayor carga de contaminantes que los organismos más jóvenes (O'Shea *et al*., 1980; Krahn *et al*., 2001; Valdez-Márquez, 2001; Debier *et al*., 2003; Evans *et al*., 2004), estos niveles más altos en adultos puede reflejar un periodo más largo de exposición en estos individuos y una baja tasa de eliminación de estos compuestos (Espín, 2010) lo que concuerda con este estudio, donde los organismos jóvenes presentaron menor carga de pOCs.

Las hembras desechan parte de su carga corporal de pOCs a través de la puesta de huevos (Bustnes *et al*., 2004; Moss *et al*.,2009), en general los diferentes autores observan que los machos presentan mayor concentración de pOCs que las hembras (Thies *et al*., 1996; Tanabe *et al*., 1998; Donaldson *et al*., 1999; Wienburg y Shore, 2004), lo que concuerda con lo observado en FSI, no obstante en IER, sucede el caso contrario, estas diferencias pueden atribuirse al dimorfismo sexual inverso que presenta la especie, es decir que las hembras son más grandes y capaces de capturar peces más grandes, con mayor carga de pOCs, sin embargo pueden destoxificarse.

La reproducción, representa un gran gasto energético (Albert *et al*., 1990; Borga *et al*., 2004), el hecho de que la etapa de cortejo sea más elevada la concentración de pOCs que la de incubación puede deberse al esfuerzo reproductivo, donde pueden ocurrir cambios en la masa corporal, esta alteración consecuentemente provoca que los compuestos alojados en los tejidos grasos, el organismo al usar las reservas lipídicas provoque que se liberen los pOCs al torrente sanguíneo y se redistribuyan, excreten parcialmente o aumenten su toxicidad (Addison 1982; Amado *et al*. 2006; Letcher *et al*. 2010; Bastidas-Bonillas, 2010).

Lerma-Lizarraga, (sin publicar) en un estudio en *S. nebouxii,* durante 2010-2012, descubrió que la especie se comporta como un “in come breeding”, es decir que el organismo cubre el gasto energético de la reproducción a través de la dieta, en lugar de utilizar sus reservas lipídicas, asimismo, las concentraciones más altas de pOCs en la etapa de cortejo, provienen del alimento que consume, correspondiendo a la época de surgencias en la zona, lo que explicaría las altas concentraciones en plasma de plaguicidas al comienzo de la época reproductiva y también explicaría el patrón temporal de pOCs observado en este estudio. Con lo observado en la literatura probablemente existe un efecto combinado de estos dos factores (surgencias y el uso del alimento para mediar los gastos reproductivos) .

Índice heterófilo/linfocito (condición inmunológica)

Se observó que el promedio eosinófilos en *S.nebouxii,* fue anormal (26.48%), el cual, es un número alto para el promedio de las aves marinas (7.48%) Tabla 7.4, aunque cada especie tiene niveles basales y la relación de las diferentes células se relaciona con aspectos filogenéticos y de historia de vida (Brito-Rojas, 2012), Campbell, 2010, menciona que la eosinófilia (aumento de eosinófilos), se asocia con parasitismo, en este estudio durante la caracterización celular y los conteos celulares se observó la presencia de parásitos sanguíneos intracelulares en eritrocitos, sospechamos que los parásitos intracelulares pertenecen a protozoarios del género Haemoproteus. Además, en un par de ocasiones se observaron otros parásitos, los cuales aparentemente viven en el torrente sanguíneo, sin embargo otros autores mencionan que un aumento de los eosinófilos, en circulación puede ser atribuidos al efecto de contaminantes ambientales posiblemente no considerados en este estudio como metales, organofosforados y carbamatos (Repetto y Baliga, 1996; Grasman *et al*., 2002; Karmaus *et al*., 2005; Fox *et al*., 2007).

Se observaron diferencias del índice H/L entre islas (FSI>IER), no obstante los hábitos de forrajeo descritos para la especie, hacen que la colonia de FSI, puedan ser influenciados por la contaminación costera, se observa que el índice H/L indica mayor estrés en la colonia de FSI, esto se puede deber a que la colonia de bobos en FSI puede tener organismos más viejos que los de IER, ya que los bobos de patas azules en FSI, se han reportado desde la década de los 70´s mientras que la colonia de IER, puede considerarse “nueva”, alrededor del año 2000 (Castillo-Guerrero (com pers)). Asimismo, el índice H/L, mayor en FSI, que IER, puede deberse a que las condiciones ambientales en FSI son más severas (Inclemencias clima, menor variedad de presas y vuelos de forrajeo más largos).

Los valores entre individuos sanos no suelen ser muy variables en individuos de una misma especie (Clark *et al*., 2009) entre los mismos sexos y rangos de edad difieren en sus respuestas al estrés y estresores ambientales (Burger *et al.,* 2007), consecuentemente el índice H/L puede presentar variaciones, lo cual concuerda con este estudio donde si bien no se encontraron diferencias entre sexos si se encontraron diferencias entre las edades (H/L: Adultos> Pollos), no obstante esta diferencia puede darse a que los pollos demandan alimento y los adultos tienen que esforzarse más, para mantenerse ellos mismos y sus pollos.

Aunque no existen diferencias entre sexos, las hembras presentaron índices H/L mayores, esto puede deberse a lo que comenta Laiolo *et al*., (2009) donde uno de los sexos es más vulnerable al estrés, ya que en (*Pyrrhocorax pyrrhocorax*), las hembras adultas tienen mayores índices H/L que los machos antes de la puesta de huevos, al parecer es cuando presentan mayor estrés por la época reproductiva, ya que se enfrentan a mayores costos energéticos, lo que concuerda con el este estudio, donde en la etapa de cortejo de ambos sexos presentaron mayores índices H/L, posteriormente en las etapas de incubación y crianza este índice se nivela en ambos sexos. Esto puede ser atribuido a la estrategia reproductiva de la especie, donde el cuidado de los pollos es biparental (Castillo-Guerrero y Mellink, 2011), por lo tanto las parejas de bobos enfrentan juntos los costos energéticos de la reproducción y consecuentemente comprometen su sistema inmunológico, dado que la reproducción es muy demandante puede comprometer otros aspectos fisiológicos entre ellos el sistema inmunológico (Folstad y Karter, 1992; Sheldon y Verhulst, 1996).

Clark *et al*. (2009), Menciona que la etapa reproductiva es un factor de variabilidad en valores hematológicos, esto se puede observar en este estudio *S. nebouxii* presentó diferencias del índice H/L entre etapas reproductivas, mostrando en ambas islas, el siguiente patrón: H/L: co>in>cr, donde, las parejas mejoran su condición inmunológica en el transcurso de la temporada reproductiva, siendo la etapa de cortejo la más demandante (en términos

inmunológicos). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado en esta misma especie por Brito-Rojas (2013), donde el índice H/L presentó un patrón similar durante la temporada reproductiva, así mismo se observó en el comienzo de la temporada reproductiva una mayor cantidad de pOCs, posiblemente la liberación de los contaminantes (no sólo de pOCs) almacenados en las reservas lipídicas provocaron el aumento del índice.

El índice H/L, solamente se relacionó la concentración de Σ DDT, en los adultos de ambas islas. Esto sugiere que las concentraciones detectadas son suficientes para generar reacciones adversas a nivel del sistema inmunológico (Grasman *et al*., 2002; Bustnes *et al*., 2004). Esto, puede afectar la capacidad de combatir infecciones parasitarias, por ejemplo en un estudio realizado por la AMAP, (2004), en gaviotas de Bjornoya, las cuales presentaron una invasión de nemátodos, las densidad de nemátodos se correlacionó con la concentración de p.p-DDT, mirex y PCBs.

La relación negativa encontrada entre el índice H/L y el tamaño de puesta, indica que la inversión reproductiva está regulada por la condición general de los adultos (Velando y Alonso-Álvarez, 2003; Apanius *et al*., 2008) y el riesgo que la inversión implica para la supervivencia y el éxito reproductivo de por vida (Stearns, 1992). Es posible que los organismos con mayor índice H/L (mayor estrés), restrinjan el tamaño de puesta para no comprometer su supervivencia, la de la descendencia o reproducciones futuras.

Además, Repetto y Baliga, (1996) y van der Oost *et al*., (2003) mencionan que el sistema inmunológico puede ser influenciado por un gran número de estresores, por ejemplo una exposición simultánea a un sinnúmero de agentes químicos y factores ambientales como la temperatura, disponibilidad de alimento, esto implica que los biomarcadores inmunológicos sean muy útiles y sencillos, no obstante no son específicos.

Presencia de micronúcleos y anormalidades nucleares

IER tuvo un mayor promedio de micronúcleos que FSI lo que concuerda con lo esperado, ya que la isla se localiza en una zona más cercana a las actividades agrícolas, donde potencialmente se liberan los genotóxicos, asimismo, IER presentó mayor cantidad de pOCs.

Se ha observado en otros organismos que se encuentran mayores frecuencias de micronúcleos en organismos jóvenes que en adultos, por ejemplo Zúñiga-González *et al*., (2001) reportaron que en la ardilla gris *Sciurus aureogaster,* encontraron mayores frecuencias de micronúcleos en ardillas jóvenes (menor peso) que en ardillas adultas (mayor peso), Esto concuerda con lo observado en este estudio, los pollos tuvieron valores de micronúcleos y anormalidades nucleares mayores que la de los adultos. El decremento de los micronúcleos con la edad, indica que el sistema retículoendotelial madura y puede retirar los eritrocitos dañados de manera más eficiente.

La frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos soló presentó diferencias entre las etapas reproductivas, siguiendo lo mencionado por los anteriores autores, se puede atribuir a la presencia de genotóxicos libres en la sangre de los organismos, durante los muestreos, se observó un patrón temporal de los pOCs, el cual concuerda con la época de surgencias, lo que no descarta la biodisponibilidad de pOCs y otros agentes químicos también se vean influenciados por los fenómenos de surgencias.

En este estudio se observaron más anormalidades nucleares que micronúcleos, esto puede indicar un mayor espectro de daños al ADN (Gómez-Meda *et al*. 2006; Cruz-Acevedo, 2012). Las anormalidades nucleares en eritrocitos totales y normocromáticos, fueron las únicas diferentes en los sexos, siendo las hembras las que presentaron mayores anormalidades nucleares, lo cual puede deberse a que los organismos presentan diferencias en su respuesta a estresores ambientales (Burger *et al*, 2007) ya que los organismos son diferentes a nivel fisiológico, así como diferencias en la eficiencia del funcionamiento del sistema reticuloendotelial, puede ser que el sistema reticuloendotelial de los machos sea más eficiente (Zúñiga-González *et al*,

2001). El hecho de que en este estudio se observaran mayores frecuencias de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos normocromáticos que en los policromáticos, indica que existe daño citogenético crónico en los organismos (Gómez-Meda *et al.,* 2006).

La tasa de eritropoyesis, mantuvo valores similares entre islas. No obstante en IER, fue mayor, se ha visto que los contaminantes incrementan la TEP (Gómez-Meda, 2006). Entre sexos, las aves más pequeñas normalmente tienen mayor actividad eritropoyética que las aves más grandes (Clark *et al*., 2009), en este estudio las hembras, las cuales son más grandes, presentaron mayor actividad que los machos, no obstante existe poca información de la actividad eritropoyética en especies con dimorfismo sexual inverso.

No obstante la temporada reproductiva, fue una de las más variables y notables, por ejemplo en cortejo se diferenció estadísticamente de las etapas de incubación y crianza, donde, se observó en cortejo, una TEP más alta, esto puede deberse a que la concentración de pOCs es más pronunciado en esta etapa reproductiva ya que los contaminantes almacenados quedan libres en el torrente sanguíneo. Se ha visto que la presencia de compuestos metálicos, como el mercurio, pueden producir un aumento en la TEP en peces (O´Connor y Fromm, 1975). Asimismo, la exposición a compuestos micronucleogénicos (Mitomicina-C) en aves provoca un aumento de la TEP (Gómez-Meda, 2006). Es posible que un aumento en la TEP, sea un mecanismo de compensación del estrés, particularmente el generado por la reproducción o migración así como por la exposición a algún contamínate (Cruz-Acevedo, 2012; Gómez-Meda, 2006).

Se observó una relación entre los BCET (ΣpOCs), MNEPC (ΣHeptacloro, ΣEndrines, ΣpOCs) y TEP (ΣDDT), no obstante se dio de manera contraria a la esperada, a mayor concentración menor frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares.

La nula relación entre las concentraciones de los contaminantes y los parámetros de la prueba de micronúcleos (MNET, BCEPC, MNENC y BCENC), se puede deber a que las concentraciones de contaminantes no son lo suficientemente elevadas como para inducir un efecto genotóxico que derive en la formación de micronúcleos. Asimismo por el efecto de contaminantes no considerados en este estudio que también afectan la condición citogenética como los organofosforados (Sailaja *et al*,2006; D´Arce y Syllos, 2000), metales (Bonacker *et al*.,2004; Cavas, 2008; Roos-Muñoz, 2011) y PHAs (Siu *et al*., 2004).

La frecuencia de micronúcleos en aves es un buen biomarcador, sin embargo en aves las frecuencias se presentan en valores más bajos que en otras clases de animales (Zúñiga-González *et al*, 2000; Skarphedinsdottir *et al.,* 2010). Lo anterior puede deberse a factores como los que reporta Martínez *et al*., 2009, estos autores realizaron un biomonitoreo genotóxico, usando diferentes biomarcadores de genotoxicidad, entre ellos la prueba de micronúcleos en humanos, usaron trabajadores agrícolas como grupo expuesto contra un grupo control. Sin embargo no encontró diferencias entre el tiempo de exposición a plaguicidas agrícolas y la frecuencia de micronúcleos, estos autores y otros como Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, (2007) concuerdan que estos resultados dependen de factores como la edad, la mezcla de plaguicidas, polimorfismo genético, métodos de aplicación de los plaguicidas, y la genotoxicidad de los compuestos usados y la interacción entre todos ellos, lo que puede explicar la nula correlación observada en este estudio.

Incide de condición corporal

A lo largo de la temporada reproductiva el índice de condición se comportó como lo esperado, al comienzo de la temporada reproductiva el IC muestra los valores más bajos, debido al gasto energético de la preparación para la reproducción y la puesta de huevos. Conforme avanzó la temporada reproductiva, los organismos recuperaron su masa corporal. En particular los cambios en la condición corporal (IC), es un factor determinante en la variación

y redistribución de contaminantes en los tejidos en aves (Colabuono *et al*., 2012) y peces (Bastidas-Bonilla, 2010), siguiendo lo descrito anteriormente, las aves utilizan las reservas lipídicas especialmente en la etapa de cortejo, antes de la puesta de huevo observándose una disminución del IC. Esto se observó a lo largo de la temporada reproductiva en ambas islas, las hembras presentan un mayor IC, excepto al final de la temporada reproductiva, esto se puede deber a que las hembras, al final de la temporada reproductiva invierten mayor energía en la reproducción que los machos. Además Castillo-Guerrero y Mellink, (2006), comentan que *S. nebouxii* disminuye la frecuencia de alimentación a los pollos, con el objetivo de alentar a los pollos para que empiecen a volar y así independizarse de los padres, lo que explicaría la recuperación de peso de los adultos al final de la etapa reproductiva.

IX.- Conclusiones

Con base a lo encontrado en este estudio se concluye que:

1. Existen diferencias significativas en las concentraciones de pOCs en plasma entre los sitios de estudio, siendo las concentraciones mayores en IER que en FSI. Para los sexos, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo los machos presentaron mayores concentraciones que las hembras. La edad presentó diferencias significativas ya que los adultos presentaron mayores concentraciones que los pollos.

2. El factor más influyente en la condición inmunológica, citogenética y de las reservas energéticas, así como las concentraciones de pOCs en plasma, es la etapa reproductiva, ya que presentó diferencias estas respuestas evaluadas.

3. El índice H/L fue diferente entre edad lo que indica que los organismos adultos sufren mayor estrés que los pollos, ya que de encargan de mantenerse a ellos mismos y al mismo tiempo a los pollos, también se presentaron diferencias significativas entre etapas reproductivas particularmente en cortejo, lo que sugiere que los adultos comprometen su sistema inmune de debido a los costos energéticos de la reproducción. Los niveles de ΣDDT observados en este estudio son lo suficientemente elevados para inducir un efecto a nivel inmunológico.

4. La condición citogenética (MNET, MNEPC, MNENC, BCET, BCEPC y BCENC), presentó mayores frecuencias en los organismos jóvenes, en especial los micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos policromáticos, estas diferencias se deben al grado de madurez en el sistema retículos-endotelial, asimismo las diferencias de la condición citogenética entre sexos y etapas reproductivas se debe a múltiples factores, como contaminantes no analizados en este estudio. *Sula nebouxii* presentó una tasa eficiente de remoción de eritrocitos dañados, dado que presentó valores inferiores a los reportados en otras especies de aves.

.

X.- Recomendaciones

Con la experiencia obtenida en este estudio se hacen las siguientes recomendaciones:

- Pueden existir variaciones debido al método utilizado para realizar el conteo diferencial de leucocitos, por lo que se recomienda hacer el conteo diferencial en 10,000 eritrocitos y compararlo con la metodología que se usó en este estudio.

- Dado que los leucocitos son generados en los órganos hematopoyéticos se les debe aplicar histología para así relacionar de una manera más adecuada el efecto de los pOC's sobre el sistema inmunológico.

- Particularmente para evaluar el factor edad, se deben recolectar más muestras de pollos.

- Es necesario hacer el muestro sanguíneo durante un periodo más largo de tiempo, para así evaluar los cambios temporales de los pOCs, y tratar de relacionarlo con cambios estacionales.

- Además del índice H/L, así como el ensayo de micronúcleos, se deben buscar otros biomarcadores que evalúen la condición inmunológica y citogenética de los organismos, con la finalidad de evaluar el mismo aspecto usando dos o más técnicas diferentes y tener más certeza en el resultado.

XI.- Citas Bibliográficas

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2002. Reseña Toxicológica del Aldrín/Dieldrín (edición actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 2005. Reseña Toxicológica del Alfa-, Beta-, Gama- y Delta-Hexaclorociclohexano (versión actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). 1994. Reseña Toxicológica del Clordano (edición actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2002. Reseña Toxicológica del DDT/DDE/DDD (edición actualizada) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2013. Reseña Toxicológica del Endosulfán (versión para comentario público) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 1996. Reseña Toxicológica de la Endrina (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2005. Reseña Toxicológica del Heptacloro y Epóxido de Heptacloro (versión para comentario público) (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.

Albert, A. L., Alpuche, L., Aranda, E., Bardillo, F., Bárcenas C., Chediack, R., Loera, R., Palomares, G. L., Rendón, J., Viveros, A. D., 1990.Los plaguicidas, el ambiente y la salud. México. 329 pp.

Anderson D. J. y R. Rickleffs. 1987. Radio Tracking Masked and Blue-footed Boobies (Sula spp.) in the Galapagos Islands. *National Geographic Research* 3: 152-163.
AMAP. 2004. AMAP Assessment 2002: Persistent organic pollutants in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Program (AMAP), Oslo, Norway, xvi + 310 pp.

Apanius V, Westbrock MA y Anderson DJ (2008). Reproduction and immune homeostasis in a long-lived seabird, the nazca booby (Sula granti). Ornithological Monographs 65: 1-46

Astorga-Rodríguez, J. E., 2011. Evaluación preliminar de riesgo ecológico por el uso de plaguicidas en una zona agrícola de Sinaloa. Tesis de maestría. CIAD. 163 pp.

Averbeck, C. 1992. Hematology and blood chemistry of healthy and clinically abnormal Great Black-backed Gulls (*Larus marinus*) and Herring Gulls (*Larus argentatus*). Avian Pathology 21: 215-223.

Barata, C.; Fabregat, M.C.; Cotín, J.; Huertas, D.; Solé, M.; Quirós, L.; Sanpera, C.; Jover, L.; Ruiz, X.; Grimalt, J. O.; Piña, B., 2010. Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to asses environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain).Environmental Pollution. 158: 704-710.

Barberá, C. 1989. Pesticidas agrícolas, 4ª edición, Ediciones Omega, Barcelona.

Barsiene, J., Lazutka, J., Syvokiene, J., Dedonyte, V. K., Rybakovas, A., Bagdonas, E., Bjornstad, A., Andersen, O. K., 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. Environ. Toxicol. 19, 365-371.

Bastidas Bonilla S.C. 2010. Transferencia trófica de compuestos organoclorados (OCs) en el pez dorado *Coryphaena hippurus* de la costa del sur de Sinaloa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán. 176 p.

Bearhop, S., Griffiths, R., Orr, K., Furness, R.W. (1999). The normal hematology of great skuas (Catharacta skua) in the wild. *Comparative Haematology International*, *9*(2), 107-109.

Betancourt, L., Díaz G. 2009. Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos omega-3 mediante la suplementación con semilla de lino (Linum usitatissimum) en la dieta. Rev. MVZ Córdoba 14(1): 1602-1610.

Blus, L.J., Wiemeyer, S.N., Bunck, C.M., 1997. Clarification of effects of DDE on shell thickness, size, mass, and shape of avian eggs. Environmental Pollution 95, 67–74.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. Aquat. Toxicol. 78 (Suppl. 1), S93-S98.

Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Böhm, K. J., Prots, I., Unger, E., Thier, R., Bolt, H. M. y Degen, G. H. (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. Archives of Toxicology. 78, 575-583.

Bouhafs N, Berrebbah H, Devaux A, Rouabhi R, Djebar J (2009). Micronucleus Induction in Erythrocytes of Tadpole *Rana saharica* (Green Frog of North Africa) Exposed to Artea 330EC. Am. Eur. J. Toxicol. Sci., 1: 7-12

Brito-Rojas, D., 2013. Relación de la condición corporal y hematológica con rasgos de historia de vida de tres especies de aves marinas dimórficas en temporada reproductiva. Tesis de maestría. CIAD. 99 pp.

Burger, J., Fossi, C., McClellan-Green, P. y Orlando, E. F. (2007). Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. Environmental Research. 104, 135-152.

Bustnes, J. O.; Hanssen, S. A.; Folstad, I.; Erikstad, K. E.; Hasselquist, D.; Skaare, J. U. 2004. Immune Function and Organochlorine Pollutants in Arctic Breeding Glaucous Gulls. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 530-541.

Cahaner, A., Dunnington, E. A., Jones, D. E., Cherry, J. A., Siegel, P.B. Evaluation of two commercial broiler male lines differing in efficiency of feed utilization. Poultry Science, v. 66, p. 1101–1110, 1987.

Campbell, T. W. (2010). Capítulo 123: Hematology of Psittacines. En: Douglas J. Weiss y K. Jane Wardrop (Editores). Schalm's Veterinary Hematology. Sexta edición. Wiley-Blackwell, USA, 968-976 p.

Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS. An assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian journal of fhisheries and aquatic sciences. 1990; 47: 2123–2136.

Carere, C., Drent, P. J. y Privitera, L. (2005). Personalities in great tits, *Parus major*: stability and consistency. Animal Behaviour. 70, 795-805.

Carson, Rachel (2002) [1st. Pub. Houghton Mifflin, 1962]. *Silent Spring*. Mariner Books.

Castillo-Guerrero, J. A. (2003). Respuesta del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) a las características del hábitat, con énfasis en las relaciones interespecíficas, en isla el rancho, Sinaloa, durante la temporada reproductiva 2003. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

Castillo-Guerrero, J., y Mellink, E. (2006). Maximum diving depth in fledging Blue-footed Boobies: skill development and transition to independence. The Wilson Journal of Ornithology, 118(4), 527–531.

Castillo-Guerrero, J., y Mellink, E. (2011). Occasional inter-sex differences in diet and foraging behavior of the Blue-footed Booby: maximizing chick rearing in a variable environment? Journal of Ornithology.

Cavas, T. (2008). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. Food and Chemical Toxicology. 46, 352-358.

Carvalho, F.P., F. González F., J.P. Villeneuve., C. Cattini., M. Hernandez G., L.D. Mee y S.W. Fowler., 2002. Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal Lagoons of Northwestern México. Environ. Tech., 23 (11): 1257-1270.

Christiani, D. C. 1996. Utilization of biomarkers data for clinical and environmental intervention. Environ Health Perspect; 104: 921-5.

Clark, P., Boardman, W., y Raidal, S. (2009). Atlas of Clinical Avian Hematology. Wiley Blackwell. (pp. 81– 82).

Cirule D., T. Krama, J. Vrublevska, M.J. Rantala e I. Krams. 2012. A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress?. J Ornithol., 153: 161–166.

Colabuono F.C., S. Taniguchi y R.C. Montone. 2012. Organochlorine contaminants in albatrosses and petrels during migration in South Atlantic Ocean. Chemos., 86: 701–708.

CONABIO, CIPAMES, CCA, FMCN, 2000. Áreas de importancia para la conservación de las aves. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Cruz-Acevedo, E. (2012). Evaluación de posibles efectos de contaminantes sobre la condición biológica de Calidris mauri (Scolopacidae) durante la temporada no reproductiva en Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México - Unidad Académica Mazatlán.

Cuevas E., A. Maldonado., V. Cobos. 2003. Determinación de DDT y DDE en huevos de tortuga blanca (*Chelonia mydas*) y de tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), en la costa de Yucatán, México. *Oceánides*, 18(2): 87-92.

D'Arce L.P.G. y de Syllos Colus I.M. (2000). Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. Teratogen. Carcin. Mut. 20, 161–170.

Díaz, A., M. A., Camacho I., V. F. y Díaz C., V., 1998. Contaminación por plaguicidas organoclorados en los sedimentos superficiales de la bahía de Santa María, Sinaloa. *Res. XI Congreso Nacional de Oceanografía.* UABC. Ensenada, B. C.

Del Río-Zaragoza, O., Hernández-Rodríguez, M. y Bücle-Ramirez, L. F. (2008). Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 41 (2): 135-145.

Dertinger, S. D., Torous, D. K., Tometsko, K. R. 1996. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer, Mutat. Res. 371, 283-292.

Dong, Y. H., Wang, H., An, Q., Ruiz, X., Fasola, M. Zhang, Y. M. 2004. Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. Environmental Geochemistry and Health 26: 259-268.

Dufva R, Allander K (1995). Intraespecific variation in plumage coloration reflects immune response in Great tit (Parus major) males. Functional Ecology 9: 785-789.

EPA, 1996. Método 3630c, Silica gel cleanup. En http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3630c.pdf

Espín, S. 2010. Plumas como herramienta de biomonitorizacion no destructiva de plaguicidas organoclorados: aplicación a la pluma de alca común (Alca torda). Tesis de maestría. Facultad de veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia, España. 71 pp.

Espinosa-Reyes G., D.J. González-Mille y C. Ilizaliturri-Hernández. 2007. Protocolo del ensayo de micronúcleos en células de humanos y fauna silvestre. Universidad Autónoma de San Luís Potosí. 13 p

European commission, 2012. POPs - Persistent Organic Pollutants. European commission. Environment. Chemicals POPs. Recuperado en Febrero del 2012. En: http://ec.europa.eu/environment/pops/index_en.htm

Fairbrother, A., Fix, M., O´Hara, T., Ribic, C. A. 1994. Impairment of grown and immune function of avocet chicks from sites with elevated selenium, arsenic and boron. Journal of Wildlife Diseases. 30 (2): 222-223.

Fernández, M., L'Haridon, J., Gauthier, L., Zoll-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. Mutat. Res. 292, 83-99.

Fenech, M., Morley, A. A., 1986. Citokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, Mutat. Res. 161, 193-198

Fiorello, C. V., I. C. T. Nisbet, J. J. Hatch, C. Corsiglia, and M. A. Pokras. 2009. Hematology and absence of hemoparasites in breeding common terns (*Sterna hirundo*) from Cape Cod, Massachusetts. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 40: 409-413.

Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. Am Nat 139:603–622

Fossi M. C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. Environ Health Perspect, 102 Supplement 12: 49-54.

Fossi, M.C., Massi, A., Leonzio, C., 1994. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies. Ecotoxicology 3, 11–20.

Foster, E. P., M. S. Fitzpatrick, G. W. Feist, C. B. Schreck, J. Yates, J. M. Spitsbergen y J. R. Heidel. 2001. Plasma androgen correlation, EROD induction, reduced condition factor, and the occurrance of organochlorine pollutants in reproductively immature white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the Columbia River, USA. Arch.Environ.Contam.Toxicol., 41: 182-191.

Fox G. A., K. A. Grasman y G. D. Campbell. 2007. Health of herring gulls (*Larus argentatus*) in relation to breeding location in the early 1990s. II. Cellular and histopathological measures. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 70. 1471–1491.

Galindo R., J. G., M. Guerrero I., C. Villagrama L. y L. G. Quezada U., 1992. Contaminación por plaguicidas en almejas y camarones, en dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. Ciencias del Mar 1 (12): 6-11

Galindo Reyes, G., Leyva, N. R., Millan, O. A. y Lazcano, G. A. 2002. Effects of pesticides on DNA and protein of shrimp larvae Litopenaeus stylirostris of the California Gulf. Ecotoxicology and Environmental Safety 53(2): 191-195.

García González, J. E., introducción a los plaguicidas, 2. Reimp. De la 1 ed. San José, Costa Rica.: EUNED, 2007. 472 p.

Giesy, J.P., Feyk, L.A., Jones, P.D., Kannan, K., Sanderson, T., 2003. Review of the effects of endocrine-disrupting chemicals in birds. Pure and Applied Chemistry 75, 2287–2303.

Grasman, K.A. y G.A. Fox (2001). Associations between Altered Immune Function and Organochlorine Contamination in Young Caspian Terns *(Sterna caspia)* from Lake Huron, 1997-1999. *Ecotoxicology*. 10 (2):101-114.

Goldberg, D. E. 1995. Emerging Problems in the Coastal Zone for the Twenty-first Century. Mar. Pollut. Bull. 31:152-158.

Gómez-Arroyo S, Noriega-Aldana N, Osorio A, Galicia F, Ling S, Villalobos-Pietrini R. (2007) Sister chromatid exchange analysis in a rural population of Mexico exposed to pesticides. Mutat Res 1992;281:173–9.

Gómez-Meda B., A.L. Zamora-Pérez, J. Luna-Aguirre, A. González-Rodríguez, M.L. Ramos-Ibarra, O. Torres-Bugarín, C. M. Batista-González y G.M. Zúñiga-González. (2006). Nuclear abnormalities in erythrocytes of parrots (*Aratinga canicularis*) related to genotoxic damage. Avi. Path., 35(3): 206-210.

Gonzalez-Farias, F. Carvalho, F.P., Fowler, S.W., Mee. L.D. (1997) A tropical coastal lagoon affected by agricultural activities: The importance of radiolabelled pesticide studies. Environmental behavior of crop protection chemicals; 289-299.

González-Farias, F., Cisneros, E. X., Fuentes, R. C., Díaz, G. G., Botello, A. V. 2002 Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest México. Environ Technol. 23 (11), 1247-1256.

Gonzalez-Farias, F. Hernández-Garcza M. R., Díaz-Gonzalez, G., (2006), Organic carbón and pesticide pollution in a tropical coastal lagoon-estuarine system in Northwest México, Int. J. Environmental and Pollution, Vol. 26 No. 1/2/3, pp. 234-253.

González–Bernal MA, Castillo–Guerrero JA, Hernández–Celis CR, Mellink E. 2007. Notew

Grasman, K. A. (2002). Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. Integrative And Comparative Biology. 42, 34-42.

Grasman, K. A. y Scanlon, P. F. 1995. Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in japanese quail. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 28 (2): 161-167.

Grasman, K. A. y Fox G. A., 2001. Associations between altered immune function and organoclhorine contamination in young Caspian terns (*Sterna caspia*) from Lake Huron, 1997-1999. Ecotoxicology. 10 (2): 101-14.

Gross, W.B. and H.S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian Dis. 27:972 - 979.

Gross, W. B., and P. B. Siegel. 1993. General principles of stress and welfare. In Livestock, Handling and Transport. T. Grandin, ed. CAB International, Wallingford, UK. 21–34

Guevara-Medina, M. A; Castillo-Guerrero, J. A. y González-Bernal, M. A. Presencia y abundancia de aves de la isla Farallón de San Ignacio, Sinaloa. Huitzil. Revista de Ornitología Mexicana [en línea] 2008, vol. 9 [citado 2012-11-30].

Hall, J.E., Greichus, Y.A., Severson, K.E. 1971. Effects of aldrin on young Pen-Reared Pheasants. Journal of Wildlife Management 35(3): 429-434.

Handy R. D., Depledge M.H. 1999. Physiological responses: their measurements and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. Ecotoxicology, 8: 329-349.

Hassall, K.A., (1990). The biochemistry and uses of action and uses in crop protection (2nd ed). Maclillan Press Ltd.

Harrison R.M. 2001. Pollution: Causes, Effects and Control. 4ta Edición. The Royal Soc. of Chem. 579 p.

Hayashi, M., Sofuni, T., y Ishidate, M. (1983). An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutation research, 120(4), 241–7.

Herbst, L. H., L. L. Siconolfi-Baez, J. H. Torelli, P. A., Klein, M. J., Kerben y I. M. Schumacher, 2003. Induction of vitellogenesis by estradiol-17 and development of enzyme-linked immunosorbant assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). Comp. Biochem. Physiol., B, 135: 551-563.

Hernández R., M.T., Fierro M., A. J., 1994. Evaluación preliminar de contaminación por plaguicidas en el norte de Sinaloa. Res V. Congreso de la Asoc. de Investigadores del Mar de Cortés, A.C.

Hoffman, D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Carns, J., 2003. Handbook of ecotoxicology. Second Edition. Lewis Publisher. USA. 1290 p.

Hotchkiss, N., Pough, R.H. 1946. Effect on forest birds of DDT used for gypsy moth control in Pennsylvania. J Wildl Manage 10:202-207.

Howell, S.N.G., Webb, S., 1995. A Guide to the Birds of Mexico and Northern Central America. Oxford Univ. Press.

Hurme T.S. y J.A. Puhakka (1999). Characterization and fate of polychlorinated biphenyl contaminants in Kernaalanjärvi sediments. Boreal Environment Research 4,331–342.

Iwate, H., S. Tanabe, N. Sakai, A. Nishimura, R. Tatsukawa. 1994. Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. Environmental Pollution. 85: 15-33.

Jakubas, D., K. Wojczulanis-Jakubas, and R. Kreft. 2008. Sex differences in body condition and hematological parameters in Little Auk *Alle alle* during the incubation period. Ornis Fennica 85: 90-97.

King, K.A., Zaun, B.J., Schotborgh, H.M., Hurt, C., 2003. DDE-induced eggshell thinning in white-faced ibis: a continuing problem in the western United States. Southwestern Naturalist 48, 356–364.

Kim, S.R., Kim, T.H., Ryu, S.Y., Lee, H.J., Oh, H., Jo, S.K., Oh, K.S., Park, I.C., Kim, J.C., Kang, C.M., Kim, S.H., 2003. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. In Vivo 79, 433-438.

Karmaus W., K.R. Brooks, T- Nebe, J. Witten, N. Obi-Osius y H. Kruse. 2005. Immune function biomarkers in children exposed to lead and organochlorine compounds: a cross-sectional study. Environmental Health: A Global Access Sci. Sour., 4 (5): 10 p.

Krams A, Vrublevska J., Cirule D., Kivleniece I., Krama T., Rantala M. J., Sild E., Hõrak p. 2012. Heterophil/lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (Parus major). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 161: 422-428

Kursa M., y V. Bezrukov. 2007. Health Status in an Antarctic Top Predator: Micronuclei Frequency and White Blood Cell Differentials in the South Polar Skua (*Catharacta maccormicki*). Polarf., 77 (1): 1-5.

Larrea, M. M. 2007. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. Tesis de licenciatura. Fac. De ciencias farmacéuticas y bioquímicas. Universidad Mayor de San Ándres. La Paz, Bolivia. 150 pp.

Lavoie E. T., Wiley F., Grasman K. A., Tillit D. E., Sikarskie J. G., Bowerman W. W. 2007. Effect of in Ovo exposure to an organochlorine mixture extracted from double crested cormorant eggs (*Phalacrocorax auritus*) and PCB 126 on immune function of juvenile chickens. Arch Environ Contam Toxicol. Nov; 53 (4): 665-61.

Laoilo, P., Banda, E., Lemus, J. A., Aguirre, J. I. y Blanco, G. (2009). Behaviour and stress response during capture and handling of the red-billed chough *Pyrrhocorax pyrrhocorax* (Aves: Corvidae). Biological Journal of the Linnean Society. 96, 846-855.

LeBlanc G. A., Bain L.J. 1987. Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers. Environ Health Pespect, 105: 65-80.

Li Y.F., R.W. Macdonald, L.M.M. Jantunen, T. Harner, T.F. Bidleman y W.M.J. Strachan (2002) The transport of b-hexachlorocyclohexane to the western Arctic Ocean: a contrast to a-HCH. The Science of the Total Environment 291, 229–246.

Llorente, M. T., Martos, A., Castano, A., 2002. Detection of cytogenetic alternations and blood cell changes in natural populations of carp. Ecotoxicology 11, 27-34.

Lyle-Fritch L. P. 2003. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR): Laguna Playa Colorada-Santa María. SEMARNAT. 14 p.

Lucas, A. M., and C. Jamroz. 1961. Atlas of Avian Hematology. Agric. Monogr. USDA, Washington, DC.

Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. Environ. Monit. Assess 71, 187-205.

Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. Rev Int Contam Ambiental 2007;23:185–200.

Martínez–Valenzuela C., Gómez–Arroyo S., Villalobos–Pietrini R., Waliszewski S., Félix–Gastélum R. y Álvarez–Torres A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa state, México. Environ. Int. 35, 1155–1159.

Matsumura, F. 1985. Toxicology of Pesticides,2 ª edición, Plenum Press, New York.

Maxwell, M. H., 1993. Avian blood leucocyte responses to stress. World´s Poultry Science Journal 49: 34-43.

Medina-Osuna I. M., (2005). Determinación de plaguicidas organofosforados en diferentes especies de tiburón del sur del estado de Sinaloa, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Mellink E., M. E. Riojas López y J. Luevano Esparza. 2009. Organchlorine content and shell thickness in brown booby (*Sula leucogaster*) eggs in the Gulf of California and the southern Pacific coast of Mexico. Environ. Poll., 157: 2184–2188.

Millar, J. S. y Hickling, G. J. (1990). Fasting endurance and the evolution of mammalian body size. Functional Ecology. 4, 5-12.

Muller, W. U., Nusse, M., Miller, B. M., Slavotinek, A., Viaggi, S., Streffer. C., 1996. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. Mutat. Res. 366, 163-169.

Nasir. K., Bilto, Y. Y., Al-Shuraiki. 1998. Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in human milk of Jordanian women. Environ. Pollut. 99(2): 141-148

Naqvi. S., Vaishnavi, Ch. 1993. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan an insecticide to non-target animals. Mini-review. Comparative Biochemistry and Physiology. 105 C: 347-361.

Nelson, J. B. 1978. *The Sulidae: Gannets and Boobies.* Oxford University Press, London.

Newman, S.H., J.F. Piatt, and J. White. 1997. Hematological and plasma biochemical reference ranges of Alaskan seabirds: their ecological significance and clinical importance. Colonial Waterbirds 20: 492-504.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. Environ. Health Perspect. 74, 3-9.

O´Connor, D. V. y Fromm, P. O. (1975). The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of rainbow trout. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 13 (4): 406-411.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutat. Res. 567, 109-149.

Osuna, F. I., Riva, M. C., (2002). Organochlorine pesticide residue concentrations in shrimp, sediments, and surface water from Bay of Ohu ira, Topolobambo, Sinaloa, Mexico. Bull Environ Contam Toxicol 68:532-539.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1992. Consecuencias Sanitarias del Empleo de Plaguicidas en la Agricultura. Ginebra, Suiza. 128 p.

Padilla, L.R., K.P. Huyvaert, J. Merkel, R.E. Miller, and P.G. Parker. 2003. Hematology, plasma chemistry, serology, and Chlamydophila status of the waved albatross (*Phoebastria irrorata*) on the Galapagos Islands. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 34: 278-283.

Páez-Osuna F., A.C. Ruiz-Fernández, A.V. Botello, G. Ponce-Vélez, J.I. Osuna-López, M. Frías-Espiricueta, G. López-López y H.M. Zazueta-Padilla. 2002. Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. Mar. Poll. Bull., 44: 1296–1313.

Páez-Osuna F., G. Ramírez-Reséndis, A.C. Ruiz-Fernández y M.F. Soto-Jiménez. 2007. La contaminación por nitrógeno y fósforo en Sinaloa: Flujos, fuentes, efectos y opciones de manejo. U.N.A.M. México, D.F. 304 p.

Palma-Acuña S. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguén. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Temuco Para Optar al Grado de Licenciatura en Recursos Naturales. 2005.

Pastor, S., 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis Doctoral. Fac. De ciencias. Departamento de genética y de microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. 107 pp.

Peterson S. M. y G.E. Batkey (1993). The fate of endosulfán in aquatic ecosystems. Environmental Pollution 82, 143 – 152.

PISSQ, Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Quimicas, (1996). Aldrín y dieldrín. Guía para la salud y la seguridad. Centro Panamericano de Ecología humana y Salud. Ornanisación Mundial de la Salud. México. pp 47.

Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Piña, B., 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (NE Spain). Environmental Pollution 155, 81–87.

Radomski, J. L., Deichmann Wm. B., Rey, A. A., Merkin, T., 1971. Human pesticide blood levels as a mesure of body burden and pesticide exposure. Toxicology and Applied Pharmacology 20:175-185.

Ranga Rao M. y A. Satyanarayana (1980). Persistence of endosulfan in soils. Agriculture food & Chemistry 28, 1099 – 1101.

Reagan, W. J., y Sanders, T. G. (1999). Hematología veterinaria: Atlas de Especies Domésticas Comunes. J.M. Sastre Vida.

Restrepo, I. 1988. Naturaleza Muerta: Los plaguicidas en México. Andrómeda. México, D.F. 221 pp.

Repetto, M. 1997. Diagnóstico de la intoxicación. En: Repetto M (ed). Toxicología Fundamental. Díaz de Santos, Madrid, pp. 327-333.

Reppetto, M., Baliga S. S. 1996 Pesticides and the immune system: The Public Health Risks. World Resources Institute. 109 pp.

Ritchie, B.W.; Harrison, G.J. y Harrison, L.R. Avian Medicine: Principles and application. Florida, Ed. Wing ers Publishing In c., 1994. pp.865-74.

Robison, J. (1969) Can. Med. Assoc. J., 100, 180

Ross, M.S., Verreault, J., Letcher, R.J., Gabrielsen, G.W., Wong, C.S. 2008. Chiral organochlorine contaminants in blood and eggs of glaucous gulls (Larus hyperboreus) from the Norwegian Arctic. Environ Sci Technol 42 (19): 7181-6.

Ross, M. H., y Pawlina, W. (2007). Histology. A text and Atlas with correlated cell and molecular biology. (5th ed., p. 974). Lippincott Williams y Wilkins.

Ross-Muñoz S. 2011. Utilización de biomarcadores para evaluar los efectos de Hg y Pb en aves migratorias del noroeste de México. Tesis de maestría. CIAD. 127 pp.

Rueda, Q. 1993. Determinación de Plaguicidas Organoclorados en Sedimentos y Organismos (moluscos y peces) de Lagunas Costeras en el Sureste de México. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. 78 pp.

Sailaja N., Chandrasekhar M., Rekhadevi P., Mahbooba M., Rahmana M., Saleha B., Vuyyuri B., Danadevi K., Hussain S. y Paramjit G. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutat. Res. 609, 74–80.

Sánchez-Chardi A., C.A. Oliveira-Ribeiro, y J. Nadal. 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. Chemos., 76: 387-394.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutat. Res. 31, 9-15.

Serrano-García L. y R. Montero-Montoya. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. Environmental and Molecular Mutag., 38: 38-45.

Schulte-Hostedde A.I., B. Zinner, J. S. Millar y G.J. Hickling. 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. Ecol., 86 (1): 155-163.

Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. Trends Ecol Evol 11:317–321

Shugart, L. 1990. Biological monitoring: testing for genotoxicity. In: McCarthy JF, Shugart LR, editors. Biomarkers of environmental contamination. Lewis, Chelsea; p. 217–27.

Skarphedinsdottir H., G. T. Hallgrimsson, T. Hansson, P. Hagerroth, B. Liewenborg, U. Tjarnlund, G. Akerman, J. Barsiene y L. Balk. 2010. Genotoxicity in herring gulls (*Larus argentatus*) in Sweden and Iceland. Mut. Res., 702: 24–31.

Smith, A. G. 1991. Handbook of Pesticides Toxicology. Academic Press, Inc., Burlington (USA).

Silbergeld E. K., Davis D. L. 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. Clin Chem 40: 1363-1367.

Siu, W.H.; Mak, E.; Cao, J.; De Luca-Abbott, S.B.; Richardson, B.J;. Lam, P.K., 2004. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (Perna viridis) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1317-1325.

Stearns, S. C. (1992). The evolution of life histories. Behavioural Ecology. Oxford: Blackwell (Illustrate., p. 264). Oxford University Press, USA.

Stoncius, D., Lazutka, J.R., 2003. Spontaneous and benzo a pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (Larus ridibundus L.). Mutat. Res. 538, 31-39.

Stoncius D. y S. Sinkevicius. 2003. Spontaneous micronuclei in the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.) embryos in relation to parameters determining nestling survival, Act. Zool. Lit., 13: 294–298.

Strum, K.M., Alfaro, M., Haase, B., Hooper, M.J., Johnson, K.A., Lanctot, R.B., Lesterhuis, A.J., López, L., Matz, A.C., Morales, C., Paulson, B., Sandercock, B.K., Torres-Dowdal, J., Zaccagnini, M.E., 2008. Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in nearctic-neotropical migratory shorebirds. Ornitologia Neotropical 19, 641–651.

Suzuki, Y. 1993. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens, Environ Mol Mutagen. Vol 22, pp. 101-106.

Svendsen, T.C., Vorkamp, K., Frederiksen, M., Ronsholdt, B., Frier, J.O. 2007. Body burdens of persistent halogenated compounds during different development stages of anadromous brown trout (Salmo trutta). Environ Sci Technol 41 (17): 5980-5.

The Wildlife Leukocythes Website, 2012, Avian Leukocyte Profiles, recuperado en Noviembre del 2013, en http://wildlifehematology.uga.edu

Turgeon, M. L. (2011). Clinical Hematology: Theory y Procedures (5th ed., p. 632). Lippincott Williams y Wilkins.

Van Den Brink, N.W. 1997. Preen gland oil and blood samples: non-destructive methods for monitoring organochlorine levels in Antartic top predators. In: B. Battaglia, J. Valencia y D.W.H. Walton, Editors. Antarctic communities, species structure and survival. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 413-416.

Van den Steen, E., Jaspers, V.L., Covaci, A., Neels, H., Fens, M., Pinxten, R. 2009. Maternal transfer of organochlorines and brominated flame retardants in blue tits (Cyanistes caeruleus). Environ Int 35 (1): 69-75.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149.

Velando, A. y Alonso-Álvarez, C. (2003). Differential body condition regulation by males and females in response to experimental manipulations of brood size and parental effort in the blue-footed booby. Journal of animal ecology, 72(5), 846–856.

Verdugo, C. M., 2004. Valores hematológicos del cisne negro (*Cygnus melanocoryphus*, Molina 1972) en una población silvestre, Valdivia Chile. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Austral de Chile. 77 pp.

Walker C.H. 2001. Organic pollutants: An ecotoxicological perspective. Taylor y Francis. USA. 282 p.

Weber J.B. 1976. The pesticide scorecard. Enviromental Science and Technology. 11 (8), 756-776.

Weiss, B., Amler, S. and Amler, R.W. 2004.Pesticides. *Pediatrics*. 113: 1030 -1036.

Weimerskirch H.**,** LE CORRE M., GADENNE H., PINAUD D., KATO A., ROPERT-COUDERT Y., BOST C.A**.** Relationship between reversed sexual dimorphism, breeding investment and foraging ecology in a pelagic seabird, the masked booby. *Oecologia***.** 2009, 161, 637-649

WHO, International Programe on Chemistral Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

Work, T.M. 1996. Weights, hematology, and serum chemistry of seven species of free-ranging tropical pelagic seabirds. Journal of Wildlife Diseases 32: 643-657.

Work, T.M. 1999. Weights, hematology, and serum chemistry of free-ranging brown boobies (*Sula leucogaster*) in Johnston Atoll, Central Pacific. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 30: 81-84.

Wrisberg, M.N., Bilbo, C.M., Spliid, H., 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of Mytilus edulis and statistical analysis. Ecotoxicol. Environ. Saf 23, 191-205.

Yamashita, R., Takada, H., Murakami, M., Fukuwaka, M., Watanuki, Y. 2007. Evaluation of Noninvasive Approach for Monitoring PCB Pollution of Seabirds Using Preen Gland Oil. Environ Sci Technol 41 (14): 4901–4906.

Zamora-Peréz, A. (2004). Ensayo de micronúcleos en células exfoliadas de descamación de la vagina de rata en proestro; Una alternativa para evaluar genotóxicos. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara.

Zar, J. 1999. Biostatistical analysis. 4a Edición. Prentice Hall. USA. 663 p.

Zúñiga-González G., O. Torres-Bugarín, J. Luna-Aguirre, A. González-Rodríguez, A. Zamora-Pérez, B.C. Gómez-Meda, A.J. Ventura-Aguilar, M.L. Ramos-Ibarra, A. Ramos-Mora, G.G. Ortiz y M.P. Gallegos-Arreola. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. Mut. Res., 467: 99–103.

Zúñiga-González G., O. Torres-Bugarín, M.L. Ramos-Ibarra, A. Zamora-Pérez, B.C. Gómez-Meda, A.J. Ventura-Aguilar, A. Ramos-Mora, G.G. Ortiz, C. Álvarez-Moya, A. González-Rodríguez, J. Luna-Aguirre y M.P. Gallegos-Arreola. 2001b. Variation of Micronucleated Erythrocytes in Peripheral Blood of *Sciurus aureogaster* in Relation to Age: An Increment of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes after the Administration of Colchicine. Environ. and Mol. Mutag., 37:173-177.

XII.- Anexos

Anexo I. Conteo diferencial de leucocitos e índice H/L de distintas especies de aves marinas.

Nombre común	Nombre científico	He	Eo	Ba	Li	Mo	H/L	N	Fuente:	Nota
Mérgulo lorito	*Aethia psittacula*	37	2	0	59	2	0.63	21	Newman *et al*. 1997	
Mérgulo Atlantico	*Alle alle*	37	9	5	38	8	0.97	23	Jakubas *et al*. 2008	*
Mérgulo jaspeado	*Brachyramphus sp.*	26	9	2	63	1	0.41	11	Newman *et al*. 1997	
Pégalo grande	*Catharacta skua*	44.9	1.4	2.8	34.4	5.5	1.31	49	Bearhop *et al*. 1999	
Arao colombino	*Cepphus columba*	47	5	0	47	1	1.00	9	Newman *et al*. 1997	
Frailecillo coletudo	*Fratercula cirrhata*	37	4	1	57	3	0.65	30	Newman *et al*. 1997	
Frailecillo corniculado	*Fratercula corniculata*	32	7	1	57	4	0.56	18	Newman *et al*. 1997	
Fragata común	*Fregata minor*	70.7	16.8	0.2	11.9	0.2	5.93	10	Work 1996	
Gaviota argéntea	*Larus argentatus*	35.5	0.9	2	60.9	1.3	0.58	103	Averbeck 1992	
Gaviota aliglauca	*Larus glaucescens*	53	3	0	43	1	1.23	8	Newman *et al*. 1997	
Gavión del Atlántico	*Larus marinus*	35.2	0.7	2	61	2.2	0.58	34	Averbeck 1992	
Charrán sombrío	*Onychoprion fuscatus*	24.7	5.8	1.3	67.3	0.8	0.37	34	Work 1996	

Rabijunco colirrojo	*Phaethon rubricauda*	53.4	18.3	1	27.1	0.3	1.97	52	Work 1996
Albatros de Galapagos	*Phoebastria irrorata*	66.1	1.7	0	30.5	1.7	2.17	50	Padilla *et al*. 2003
Petrel Hawaiano	*Pterodroma sandwichensis*	31	18.2	10.1	39.9	0.9	0.78	27	Work 1996
Pardela del pacifico	*Puffinus pacificus*	22	2.6	1.7	71.1	2.5	0.31	45	Work 1996
Pégalo antártico	*Stercorarius maccormicki*	51.2	0.1	2.1	45.8	0.8	1.52	162	Kursa y Bezrukov 2007
Charrán común	*Sterna hirundo*	38	9.1	0	51	5.6	0.75	33	Fiorello *et al*. 2009
Bobo café	*Sula leucogaster*	72	10.6	2.1	11.2	4.2	6.45	35	Work 1999
Bobo de patas rojas	*Sula sula*	57.8	5.8	1.6	32.9	1.9	1.76	35	Work 1996
Bobo de patas azules	*Sula nebouxii*	27.9	26.1	0.2	42.5	3.3	0.76	137	Este estudio (2012-2013)

* Machos incubación temprana.

Anexo II Valor promedio de la proporción de micronúcleos (MN) en algunas especies de aves por cada 10,000 eritrocitos (tomada de Cruz-Acevedo 2012).

Especie	MN (prom)	Min	Max	Referencia
30 especies	-	0.2	10.6	Zúñiga-Gonzales *et al*. 2000
Larus ridibundus	37.00 ± 0.44	5.7	470	Stoncius (2003a; 2003b)
Catharacta maccormicki	0.07 ± 0.02	0	2	Kursa y Bezrukov (2007)
Aratinga canicularis	3.00 ± 3.60	-	-	Gómez Meda *et al*.(2006)
Ardea purpurea	2.00 ± 14.00	1	29	Quiros *et al*. (2008)
Egretta garzeta	3.00 ± 5.00	2	42	Quiros *et al*. (2008)
Bulbucus ibis	7.00	1	15	Quiros *et al*. (2008)
Crocidura russula	1.22 ± 0.17 (sitio contaminado)	-	-	Sánchez-Chardi *et al*. (2009)
	0.25 ± 0.12 sitio no contaminado	-	-	
Larus argentatus	-	18	28	Skarphedinsdottir *et al*. (2010)

Anexo III. Procedimiento para realizar el conteo diferencial de glóbulos blancos.

El conteo diferencia de glóbulos blancos se realizó llevando a cabo la metodología propuesta por Ross-Muñoz (2011).

Una vez obtenida la muestra sanguínea, se colocó una gota de sangre de aproximadamente 15 µl en un portaobjeto por triplicado y con un segundo portaobjeto formando un ángulo de 30-45° se puso en contacto con la gota, y se deslizo un poco hacia atrás y luego hacia adelante para formar una película. Se secó el frotis al aire libre y luego se fijó con metanol y se esperó a que se evaporara, después se almacenaron en cajas para portaobjetos (Fisherbrand).

Preparación de los reactivos

Para preparar Tiosulfato de sodio (Na2O3S2) a (0.025 N), se pesaron 6.2045 g , se colocó en un matraz y se afloro a 1 litro con agua destilada.

Para preparar solución de lavado, se prepara una solución con metanol (CH_4O), se colocaron 5 ml de metanol por cada 200 ml de agua destilada.

Tinte Wright-Giemsa, se utilizó una preparación comercial del tinte ACCUSTAIN WRIGHT-GIEMSA STAIN, MODIFIED marca SIGMA-ALDRICH.

Procedimiento de la tinción

1. Se colocaron los portaobjetos en canastillas de plástico (racks) para su tinción.
2. Se coloca la canastilla con los portaobjetos en la solución comercial de tinte durante 5 minutos.
3. Una vez trascurrido el tiempo, se sacude el rack para quitar el exceso de tinte, posteriormente se coloca en tiosulfato de sodio durante 20 minutos (cambiar el tiosulfato después de 2 baños).
4. Una vez transcurrido ese lapso de tiempo, se sumerge el rack 10 veces en la solución de lavado (cambiar después de cada lavado).

5. Una vez lavadas las laminillas, se les quito el exceso de tinte con papel absorbente.
6. Posteriormente se deja secar al aire libre.
7. Una vez que se secaron las laminillas se colocaron 2 gotas de resina (Cytoseal 60 de baja viscosidad) y se colocó encima el cubreobjetos (25 X 75 mm), se dejó secar y se contaron 100 células para obtener el recuento diferencial de leucocitos.

Anexo IV. Procedimiento para realizar la pruebas de Micronúcleos y anormalidades nucleares

Se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Zamora-Pérez *et al*. (2004).

Preparación del buffer de fosfato:

En un matraz de 1000 ml se agregó fosfato de sodio dibásico anhidro (Na2HPO4) y fosfato monobásico de sodio monohidrato (NaH2PO4 H2O), 2.16 g y 11.49 g respectivamente, después se aforó a 1 litro con agua destilada.

Se recomienda recolectar una parte de la solución con una jeringa de 20 ml y refrigerarla para su posterior uso.

Preparación de la tinción con naranja de acridina

1. En dos cajas de tinción se vaciaron aproximadamente de 500 ml buffer de fosfato en cada una.
2. Acondicionar el área de tinción para evitar contaminar con naranja de acridina y adaptarla para trabajar en condiciones de oscuridad.
3. Una vez que se obtienen condiciones de oscuridad disolver 0.02g de naranja de acridina en una de las cajas.

Procedimiento de tinción

1. Colocar las laminillas en una gradilla.
2. Sumergir durante 5 minutos la gradilla con las laminillas en la caja de tinción a la que se le agrego naranja de acridina, a la gradilla se le dio movimiento frecuentemente.
3. Una vez transcurrido el tiempo , se sacó la gradilla y se eliminó el exceso del líquido sacudiéndola suavemente sobre papel absorbente.
4. Una vez que se le retiro el exceso de líquido, se colocó durante 10 minutos en la caja que contenía únicamente buffer de fosfato.

5. Una vez transcurrido el tiempo, se sacó la gradilla y se pasaron las laminillas a una caja con tapa para portaobjetos (Ficherbrand) hasta el momento de su lectura.

Recuento de micronúcleos y prolongaciones nucleares

Para leer las laminillas fue necesario colocar una gota de buffer de fosfato (jeringa de 20 ml que se preparó y guardó anteriormente), y cubrirlas con un portaobjetos (25 x 75 mm); el exceso del buffer se eliminó mediante una presión suave por ambos lados con una gasa y un papel absorbente. Después se colocó una gota de aceite de inmersión para fluorescencia Immersol Carl Zeiss 518 N, para ser observada en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 100x.

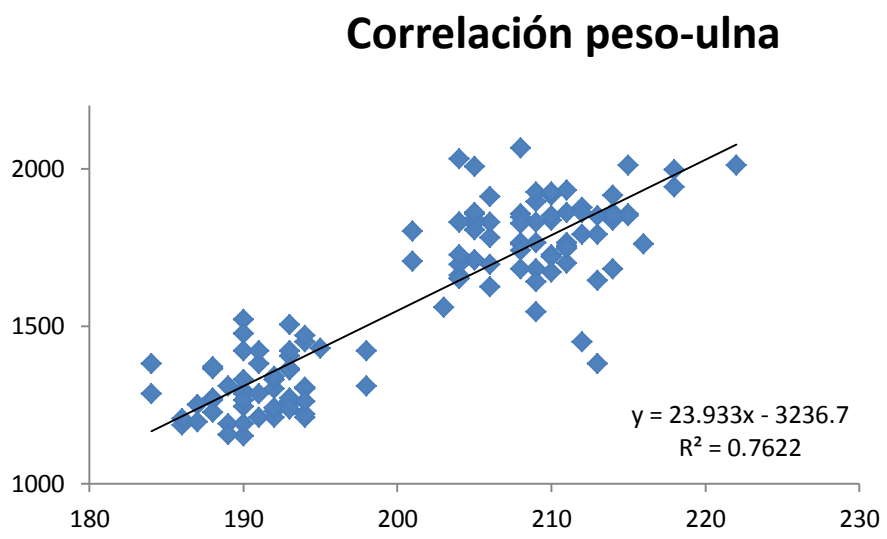
Para el conteo se cuantificaron 10,000 eritrocitos identificando MN, BC, MNEPC, BCEPC, MNENC y BCENC, (Zúñiga *et al*., 1996; Zúñiga-González *et al*., 2000; Gómez-Meda *et al*., 2006).

Anexo V Gráfica y coeficiente de regresión y de la ulna y peso para *Sula nebouxii*

Se realizó una regresión lineal entre la medida morfométrica que presentó un mayor ajuste en este caso fue la ulna y el peso de *S nebouxii* (**R^2= 0.7622**).

Para obtener el peso esperado se utilizó la ecuación resultante de la recta (**y= 23.933x-3236.7**), donde “x se sustituye con el tamaño de la ulna.

Finalmente es importante mencionar que para obtener la ecuación del índice de condición de excluyeron los pollos o cualquier organismo que se le haya medido la ulna o el peso.



Anexo VI Caracterización de las células sanguíneas

La caracterización celular y los conteos de las células blancas (leucocitos) se realizaron con la tinción Wright-Giemsa. Con un amento de 100x.

Eritrocitos

Los eritrocitos (Figura 12.1), fueron las células más abundantes en la sangre, presentan forma elipsoidal con su núcleo centrado, usando la tinción Wright-Giemsa el citoplasma se tiñe de un color azul grisáceo pero regularmente de observa de color rosado, mientras que el núcleo se tiñe de color azul marino hasta púrpura, su citoplasma es muy abundante, el tamaño promedio de estas células es de 15.16 ± 1.60 µ de largo y 8.50 ± 0.72 µ de ancho.

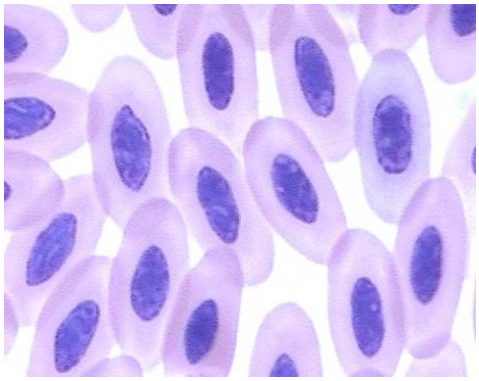


Figura 12.1 Frotis sanguíneo del bobo de patas azules (*S. nebouxii*) que muestra eritrocitos teñidos con la tinción Wright-Giemsa. (100x).

Leucocitos

Linfocitos

Los linfocitos fueron los leucocitos con mayor presencia, ya que estas células sanguíneas representaron el 42.5 % (Tabla 7.1) del total de los glóbulos bancos.

Los linfocitos tienen forma redonda, su núcleo es por lo general centrado, abarcando casi la totalidad del citoplasma. La cromatina se encontró muy concentrada y varió de color desde azul cielo hasta púrpura (Figura 12.2). El

citoplasma de los linfocitos fue muy escaso y presentaba un color azul claro. Los linfocitos serán utilizados para poder conocer el cociente de heterófilos/linfocitos.

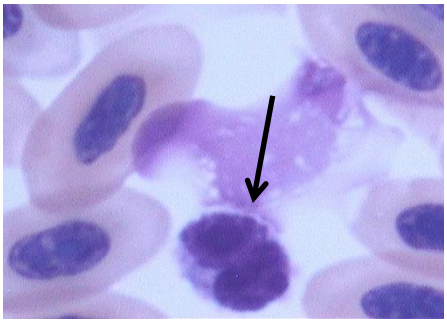


Figura 12.2. Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*, que muestra un linfocito con tinción Wright- Giemsa (100x).

Heterófilos

Después de los linfocitos, los heterófilos son el tipo de leucocito más abundante, representando el 27.9% del total de leucocitos en S. nebouxii (Tabla 7.4). Las células presentaron formas asimétricas con adaptación morfológica a su entorno, pero en la mayoría de las ocasiones presentaron forma redonda. El núcleo de estas células es multilobulado, puede estar cubierto parcial o totalmente de gránulos citoplasmáticos, los cuales fueron teñidos de color rojizo o rosado y presentan forma de bastoncitos. La cromatina no se presentó condensada y es de color azul cielo o púrpura, mientras que el citoplasma de estas células es incoloro presentando en ocasiones colores ligeramente rosa (Figura 12.3). Al igual que los linfocitos, los heterófilos se utilizaron para calcular la relación de Heterófilos/Linfocitos.

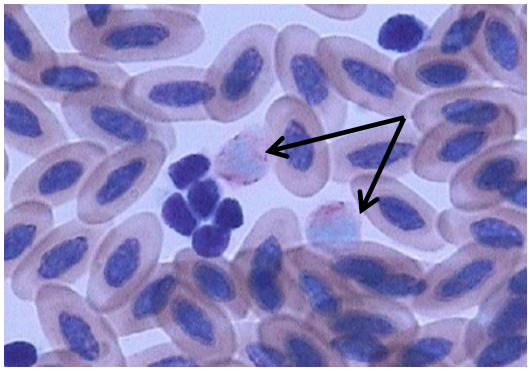


Figura 12.3. Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*, mostrando dos heterófilos teñidos con la tinción Wright- Giemsa (100x).

Eosinófilos

Los Eosinófilos representaron el tercer tipo de leucocito más abundante en la sangre de S. nebouxii, con una frecuencia de aparición del 26.1 % del total de leucocitos (Tabla 7.4). Por lo general son de forma redonda, presentaron núcleo bilobulado pero en ocasiones trilobulado o más, de color púrpura. Presentaron gránulos redondos de color rojo intenso, los cuales están dispersos sobre el núcleo y el citoplasma (Figura 12.4). El citoplasma es incoloro o en ocasiones de rosa. Notamos que la tinción Wright-Giemsa tiñe más intensamente a los Eosinófilos que a los heterófilos.

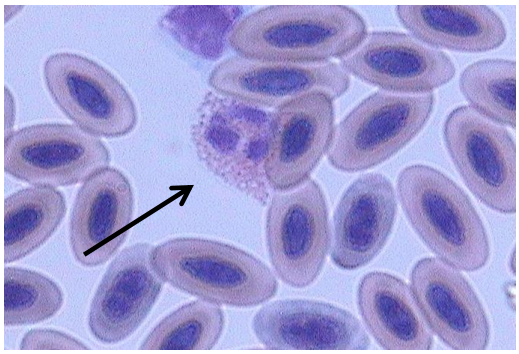


Figura 12.4 Frotis sanguíneo de la especie *Sula nebouxii*. Que muestra un Eosinófilo teñido con la tinción Wright-Giemsa (100x).

Basófilos

Los basófilos, fueron el grupo celular sanguíneo menos abundante, solo representaron el 0.2% de frecuencia del total de leucocitos (Tabla 7.4), son células redondas, debido a él gran número de gránulos que presentan, cubren casi en su totalidad núcleo y citoplasma, los gránulos son de color purpura intenso a rosa fuerte. Dado que están totalmente cubiertos de gránulos no se puede apreciar el color del núcleo y del citoplasma (Figura 12.5).

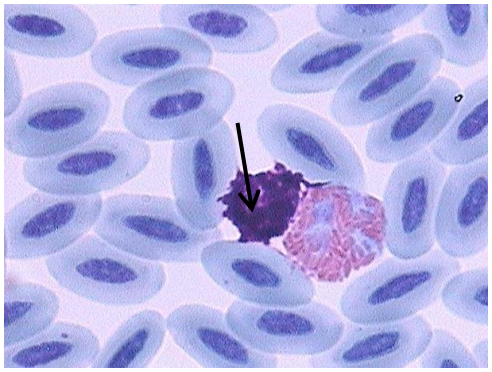


Figura 12.5 Frotis de la especie *Sula nebouxii*, que muestra a un Basófilo marcado con una flecha y a un heterófilo, bajo la tinción de Wright-Giemsa (100x).

Monocitos

Después de los basófilos, los monocitos fueron el tipo celular menos abundante, representando solamente el 3.3 % del total de los leucocitos (Tabla 7.4). Los monocitos fueron las células sanguíneas más grandes. Los monocitos son células de forma redonda a amiboidea frecuentemente presentó seudópodos, se distinguen fácilmente por su tamaño y su núcleo ovalado o bilobulado generalmente con forma lunada, de color violeta. Su cromatina es ligeramente condensada. Su citoplasma es muy abundante de color azul cielo (Figura 12.6).

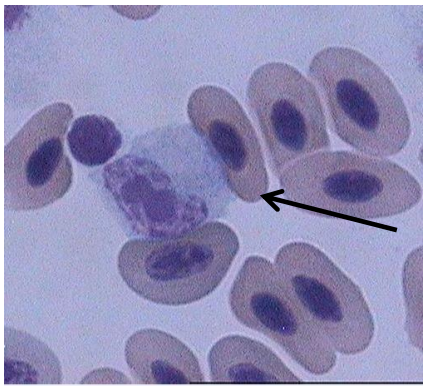


Figura 12.6. Frotis de la especie *Sula nebouxii*, en la que se muestra un monocito teñido bajo la tinción de Wrigth-Gimesa (100x).

Trombocitos o plaquetas

Los trombocitos son las células sanguíneas más pequeñas, presentaron forma redonda o elíptica, por lo general se encontraban presentes en grupos de 3 o más, inclusive en decenas. Su núcleo es de color púrpura intenso y su citoplasma de color purpura (Figura 12.7).

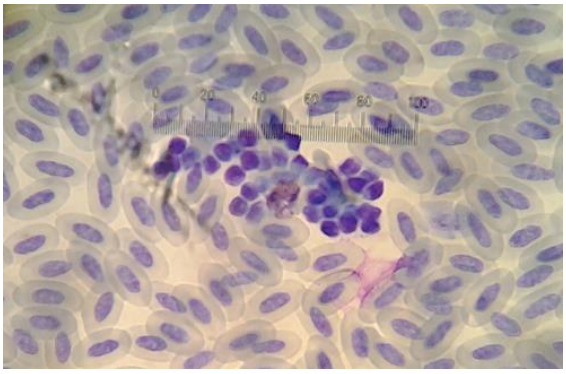


Figura 12.7. Frotis de la especie *Sula nebouxii*, que muestra un gran grupo de trombocitos, las células están teñidas con la tinción de Wright- Giemsa (100x).

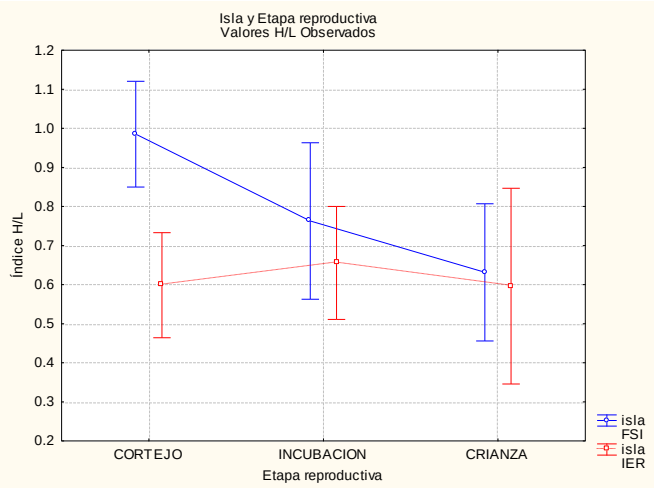
Anexo VII Modelo AIC

Formula obtenida: Y$= \mathbf{0.739103} + \boldsymbol{ISLA} + (\boldsymbol{ISLA} * \boldsymbol{ETAPA\ REPRODUCTIVA})$

Dónde:

- 0.739103 es el intercepto calculado por el modelo
- **ISLA**, es el valor asignado a cada isla, para **FSI: 0.104279**, mientras que para **IER: -0.059712**
- **Isla*etapa reproductiva** es un valor específico de cada temporada reproductiva en cada isla:
- **Isla El Farallón de San Ignacio** (**FSI** $_{\text{CORTEJO}}$**: 0.109136; FSI** $_{\text{INCUBACIÓN}}$**: -0.044568, FSI** $_{\text{CRIANZA}}$**:-0.064567**).
- **Isla El Rancho** (**IER** $_{\text{CORTEJO}}$**: -0.213415; IER** $_{\text{INCUBACIÓN}}$ **-0.059712; IER** $_{\text{CRIANZA}}$ **-0.039712**).

A continuación se observan los valores del índice H/L observados en ambas islas durante las diferentes etapas de la temporada reproductiva y los valores del índice H/L estimados con el modelo (Figura 12.8).



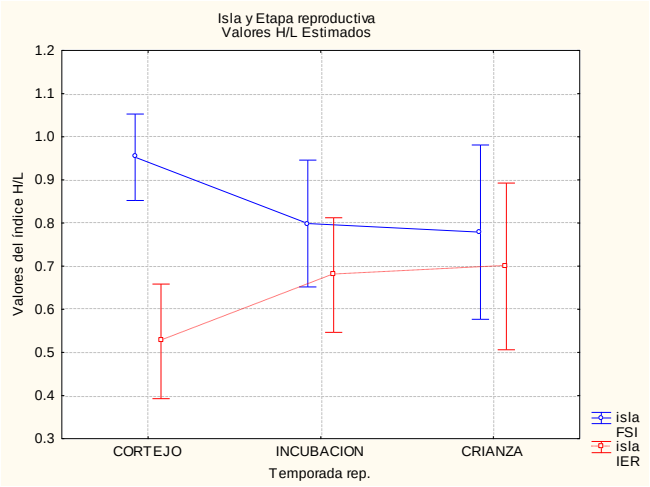


Figura 12.8 Índice H/L entre las etapas reproductivas, se muestran los valores observados en los conteos y valores predichos por el modelo AIC.

Anexo VIII Frecuencia y número total de muestras de los plaguicidas organoclorados y metabolitos detectados en ambas islas.

Compuesto	Muestras	Frec. %
Metoxiclor	0	0.00
pp-DDD	0	0.00
pp-DDT	0	0.00
Endosulfán β	1	0.79
Endrín	2	1.59
Endrín Aldehído	2	1.59
Heptacloro Epóxido	4	3.17
HCH γ	5	3.97
Dieldrín	7	5.56
Endosulfan Sulfato	8	6.35
Endosulfan α	9	7.14
Heptacloro	9	7.14
HCH δ	10	7.94
Aldrín	13	10.32
CIS-clordano	13	10.32
HCH α	25	19.84
pp DDE	34	26.98
TRANS-clordano	49	38.89
HCH β	64	50.79
Endrín Ketona	94	74.60
Σ Heptacloro	11	8.73
Σ Drines	16	12.70
Σ Endosulfán	16	12.70
Σ DDT´s	34	26.98
Σ Clordanos	52	41.27
Σ HCH´s	65	51.59
Σ Endrines	94	74.60
Σ pOCs	109	86.51

Anexo IX. Colocación GPS

Como adicional a este estudio, durante las últimas visitas a IER se llevaron GPS Bug LOTEK ® los cuales son especiales para aves. El objetivo de esto es conocer cuál es el área de alimentación del bobo de patas azules en esta zona de estudio (IER).

El GPS, fue programado con el software proporcionado por el fabricante, se le programó para tomar una lectura cada 10 minutos durante todo el tiempo que duraba la batería 12 horas aprox. La manera de colocar el GPS, fue la siguiente, primero se inmovilizó el ave seleccionada, posteriormente con la ayuda de cinta de tela se le adhería el GPS en una de las plumas de la cola, y se soltaba el ave.

Finalmente, una vez recuperado el GPS, los datos se visualizaban en el programa Google Earth, la información de la bitácora del GPS se describe en la siguiente Tabla.

Como se puede observar en la imagen la mayoría de los puntos se ubican en IER, esto se debe a que la mayoría del tiempo las aves permanecían en el nido cuidando a sus polluelos, el punto más alejado que registró el GPS se localiza a 50 Km de la colonia en isla Meléndez al sur se Bahía Santa María.

Tabla 12.1 Bitácora de colocación de GPS

	Colocación				Recuperación	
serie	**Hora**	**Fecha**	**Sexo**	**Anillo**	**Fecha**	**Hora**
1059	18:02	01/05/13	Macho	R73	02/05/13	18:30
1061	19:30	01/05/13	Hembra	V83	02/05/13	17:30
1059	06:35	03/05/13	Hembra	V71	03/05/13	19:00
1061	06:40	03/05/13	Macho	R128	03/05/13	19:00
1061	17:22	23/05/13	Hembra	-	24/05/13	17:00
1059	07:00	24/05/13	Macho	R180	24/05/13	18:00
1061	07:00	25/05/13	Macho	R128	25/05/13	20:00
1059	07:00	25/05/13	Hembra	V71	25/05/13	20:20

Figura 12.9 Zona de alimentación del bobo de patas azules, en IER, en la etapa de crianza.