

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A.C.**

**EVALUACIÓN DE ALTERACIONES BIOLÓGICAS EN
CANGREJO VIOLINISTA *Uca princeps* (SMITH, 1870)
EXPUESTO A SEDIMENTOS CONTAMINADOS**

POR

DIANA CORONA VADILLO

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

MAZATLÁN, SINALOA

FEBRERO DEL 2005

APROBACIÓN.

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Bióloga Diana Corona Vadillo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.

Dr. Miguel Betancourt Lozano
Director de Tesis

Dra. Silvia A. García Gasca
Comité

Dra. Luz María García de la Parra
Comité

Dra. Emma J. Fajer Ávila
Comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé, el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General del CIAD, A.C.

AGRADECIMIENTOS.

- A mis hermanos Adriana, Claudia y Jorge por seguir corriendo aventuras conmigo.
- Al Dr. Miguel Betancourt Lozano por aceptar ser mi maestro y entregarse a la tarea de sacar adelante este trabajo.
- A los miembros del comité revisor Dra. Alejandra García Gasca, Dra. Luz María García de la Parra y Dra. Emma Fajer por sus aportaciones y enseñanzas.
- A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Ecotoxicología y Manejo Ambiental por el trabajo tan armonioso que llegamos a tener y sobre todo por el tiempo tan agradable que siempre compartimos.
- A Cipatli Meza Cueto, Julián Ríos Sicarios, Daniel Leyva Cota y Rosario Agapito por regalarme consejos, aliento, pero sobretodo sonrisas. Gracias.
- A el M. en C. Héctor Plascencia González por sus invaluable enseñanzas, ayuda y consejos tanto en campo como en laboratorio. Muchas Gracias.
- A la M. en C. Elsa Isela Bojorquez Mascareño y a las alumnas de servicio social Elva Esmeralda Cota Arroyo y Liliana Lizbeth López Zambrano por su valiosa ayuda para la realización del presente trabajo.

- Al Dr. Arturo Ruíz Luna, M. en C. César Berlanga, Dr. Hugo Aguirre Villaseñor, Dr. Juan Madrid Vera por haberme formado académicamente y por no olvidar que fueron alumnos alguna vez, ofreciendo la ayuda necesaria a quien la requiera.
- A la M. en C. María Soledad Morales, M. en C. Carmen Bolán Mejía, M. en C. Rubí Hernández Cornejo por compartir su conocimiento en los laboratorios de Microscopia, Bacteriología y Biología Molecular.
- Al Dr. John Christie del Instituto Smithsonian, Unidad Panamá por su entusiasta colaboración para la construcción de trampas para atrapar cangrejos violinistas del género Uca.
- Al Ing. Ignacio Romero Castro, Fac. de Ingeniería, UNAM por sus aportaciones para la construcción del sistema de marea.
- Al Dr. Andrew Collins de la Universidad de Oslo, Noruega y Dr. Omar Francisco García Lima del Centro de Protección e Higiene de las Radiaciones (CPHR), La Habana, Cuba, por sus constantes asesorías para llevar a cabo el análisis estadístico del Ensayo Cometa.
- A la M. en C. Ellie Fairbairn de la Universidad de California-Davis por puntualizar y ayudar al entendimiento de la técnica del ensayo cometa.
- A la M en C. Joanna Acosta Velázquez y Familia por ofrecerme una de las mejores cosas de la vida que muchos no llegan a tener... una invaluable amistad.

- A la Sra. Marcela de Soto y Familia por otorgarme un pedacito de cielo en el que viven, por una incandescente amistad y hospitalidad.
Definitivamente las mejores cosas de la vida vienen inesperadamente
Gracias.
- Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán por brindarme el espacio para trabajar y realizar el presente trabajo.
- A todo el personal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, por lograr que el presente estudio se llevara a cabo, especialmente a María del Socorro Sarabia Estrada y Felipe Hernández Peinado. Asimismo a los laboratorios de Genética y Reproducción, Nutrición, Química del agua e Ictiología y Biodiversidad.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar el presente trabajo.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por introducirme al mundo de la ciencia y mantener abiertos los portales de invaluable información a través del constante trabajo de la Sra. María Clara Ramírez Jáuregui, Lic. Pedro Allende Rosales y colaboradores de la Biblioteca Regional en Ciencias del Mar “Dra. María Elena Caso Muñoz” del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán.

DEDICATORIA.

Es en este momento en donde finalmente comprendo que las metas importantes se logran a plazos largos, con mucha determinación, constancia en el trabajo, sin miedos y con imaginación. Decía Salvador Díaz Mirón, poeta mexicano en uno de sus poemas que “El ave canta aunque la rama cruja... cómo que sabe lo que son sus alas” representando con ello a mi parecer certidumbre, fortaleza, carácter que he tenido la fortuna de observar en mis padres, pero sobretodo su apoyo incondicional logró que por muy duro y difícil que hubiese sido el camino en ocasiones, supieron siempre que valdría la pena. Su experiencia y entusiasmo me hicieron creer que algo extraordinario podía pasar y en efecto una de las mejores enseñanzas que corrobora este trabajo es que el humano jamás cumple sus metas personales y sociales *sin la ayuda de los demás*. Así que Gracias por ese amor que los caracteriza, ustedes son bálsamo para mi corazón que siempre me enseña que no existe escala en la fe, ni en los sueños.

CONTENIDO.

	Páginas
1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
2.1 Ecotoxicología como herramienta de evaluación ambiental	8
2.2 Cangrejos violinistas, género <i>Uca</i> spp. (Smith, 1870)	13
2.3 Trabajos realizados en el Estero del Sábalo y el Estero de Urías.	18
3. Hipótesis	23
4. Objetivo general	23
5. Objetivos particulares	23
6. Material y metodología	24
6.1 Área de estudio	25
6.2 Diseño, implementación de trampas y aclimatación de <i>Uca princeps</i>	30
6.2.1 Construcción y funcionamiento de trampas	30
6.3 Diseño e implementación de un sistema de bioensayos con sedimentos	32
6.3.1 Sistema de mareas	32
6.4 Diseño experimental	35
6.5 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <i>Uca princeps</i> a nivel molecular: Genotoxicidad	36

	Páginas
6.6 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <u>Uca princeps</u> a nivel bioquímico: actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa	38
6.7 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <u>Uca princeps</u> a nivel organismo: a) Factor de Condición múltiple, b) Índice Hepatosomático y c) Índice Gonadosomático	39
6.8 Análisis comparativo de la evaluación de la toxicidad de los sedimentos	41
7. Resultados	42
7.1 Parámetros ambientales, Granulometría y Materia Orgánica	42
7.2 Fauna asociada sedimentos	43
7.3 Mortalidad	43
7.4 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <u>Uca princeps</u> a nivel molecular: Genotoxicidad	46
7.5 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <u>Uca princeps</u> a nivel bioquímico: actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa	50
7.6 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre <u>Uca princeps</u> a nivel organismo: a) Factor de Condición múltiple, b) Índice Hepatosomático y c) Índice Gonadosomático	51
7.6.1 Factor de condición múltiple	51
7.6.2 Índice hepatosomático	52
7.6.3 Índice gonadosomático	53

	Páginas
<i>7.7 Análisis comparativo de la evaluación de la toxicidad de los sedimentos</i>	54
8. Discusión	56
9. Conclusiones	68
10. Recomendaciones para trabajos posteriores	69
11. Bibliografía	70
12. Anexos	85
<i>12.1 Anexo 1</i>	85
<i>12.2 Anexo 2</i>	89
<i>12.3 Anexo 3</i>	101
<i>12.4 Anexo 4</i>	105
<i>12.5 Anexo 5</i>	111

ÍNDICE DE TABLAS.

	Páginas
Tabla 1. Ubicación de las localidades de muestreo en los esteros de Urías y del Sábalo	28
Tabla 2. Caracterización de temperatura, salinidad, granulometría y materia orgánica de sedimentos superficiales provenientes de los Esteros de Urías y del Sábalo	42
Tabla 3. Porcentaje de fauna asociada en las diferentes localidades de muestreo de los Esteros de Urías y del Sábalo	43
Tabla 4. Porcentaje de organismos muertos por semana/java/tratamiento durante el bioensayo con <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados	44
Tabla 5. Resultados de análisis de amonio en agua y sedimentos de los tratamientos con <i>Uca princeps</i> al día 8 del experimento	45
Tabla 6. Valores obtenidos en una tabla de contingencia de χ^2 comparando cada tratamiento contra el sedimento de referencia.	49
Tabla 7. Categorización e integración de las pruebas de Ensayo Cometa (EC), actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa (GST), del Factor de condición múltiple (FCM) y Mortalidad (M) para distintas estaciones de muestreo	54

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Páginas
Figura 1. La ecotoxicología estudio multidisciplinario que estudia los efectos de sustancias tóxicas sobre especies en sistemas ambientales complejos	8
Figura 2. Dimorfismo sexual del cangrejo violinista, <i>Uca princeps</i> (Smith, 1870)	14
Figura 3. Diagrama general de la metodología llevada a cabo con cangrejo violinista <i>Uca princeps</i> para evaluar las respuestas biológicas como posibles biomarcadores de contaminación ambiental	25
Figura 4. Ubicación de localidades y principales actividades de las áreas de estudio en Mazatlán, Sinaloa, México	29
Figura 5. Características y funcionamiento de las trampas para capturar hembras de <i>Uca princeps</i>	31
Figura 6. Características del sistema de mareas por medio de sifoneo	34
Figura 7. Arreglo final de la sala de Bioensayos II para realizar un experimento con sedimentos en presencia de <i>Uca princeps</i>	36
Figura 8. Hemocitos de <i>Uca princeps</i> teñidos con plata, después de haber sido sometidos al análisis del ensayo cometa	46
Figura 9. Daño al ADN en hemocitos de <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados, expresado en porcentajes acumulados	47
Figura 10. Nivel de daño al ADN, expresado en Unidades Arbitrarias (UA) en hemocitos de <i>Uca princeps</i> expuesto a sedimentos contaminados	48

	Páginas
Figura 11. Actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa en hepatopáncreas de <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados	50
Figura 12. Factor de condición múltiple de <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados	51
Figura 13. Índice hepatosomático en <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados	52
Figura 14. Índice gonadosomático en <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados	53
Figura 15. Grupos de similitud de los tratamientos con respecto a los niveles de importancia de cada una de las respuestas en su conjunto, en los cangrejos violinistas <i>Uca princeps</i> expuestos a sedimentos contaminados por 21 días.	55

RESUMEN

Un grupo de 6 biomarcadores fueron evaluados en diferentes niveles de organización biológica (desde lo molecular hasta lo fenotípico) en el cangrejo violinista *Uca princeps* expuesto durante 21 días a sedimentos contaminados provenientes del Estero de Urias (área contaminada) y sedimentos del Estero del Sábalo (área de referencia) en el noroeste de México en Mazatlán, Sinaloa.

Los resultados fueron analizados individualmente, por medio de ANOVA de una vía, prueba de χ^2 con tabla de contingencia, análisis de similitud (Primer 5 © 2003), para finalmente realizar una integración de los biomarcadores donde fueron evaluados simultáneamente para observar el grado de efecto de las respuestas en cada uno de los sedimentos. De esta integración se obtuvo una visión completa de impacto antropogénico, donde fue posible distinguir claramente entre el área contaminada y la de referencia, sin embargo, de más relevancia fue la distinción de un gradiente de efecto dentro del área contaminada, reflejando las diversas actividades antropogénicas de las áreas seleccionadas (descargas urbanas, zona industrial, termoeléctrica y granja camaronícola). Por lo tanto, se concluye que *Uca princeps* puede ser utilizado para analizar diferentes biomarcadores en distintos niveles de organización biológica y para ello es requerida su integración en un estudio multidisciplinario.

ABSTRACT

A suite of 6 biomarkers at several levels of organization (from the molecular to the phenotypic response) was measured in fiddler crabs *Uca princeps* exposed during 21 days to polluted sediments from Urias Estuary (polluted site) and sediments from Sabalo Estuary (reference site) in the north-west of Mexico (Mazatlan, Sinaloa).

Results were analysed separately using either one way ANOVA, χ^2 with contingency table, similarity analysis (Primer 5 ® 2003) and finally an integration of biomarkers was made where they were simultaneously evaluated by the biological effect of their response.

An overall picture was obtained from these integration, than examining individually the data. It was possible to distinguish among polluted and reference sites, but most importantly it existed a clear gradient effect of response in the biomarkers within the pollution site, whom reflected the different anthropogenic activities from the selected areas (urban discharges, industrial zone, thermoelectric and a shrimp farm). It was concluded that *Uca princeps* could be suitable to study different biomarkers and it is required an integration of numerous biological variables in a multidisciplinary approach.

1. Introducción.

En la actualidad se estima que la cantidad de las sustancias tóxicas y creación de nuevos contaminantes se han incrementado y acumulado dramáticamente en el ambiente. Se calcula que existen aproximadamente 9 millones de compuestos químicos o xenobióticos (compuestos producidos por actividades antropogénicas introducidos a ambientes naturales), de los cuales entre 75,000-80,000 son de uso común (Fent, 1996). La presencia de tan variados químicos representa una constante preocupación ambiental por los efectos biológicos que pueden producir a corto, mediano y largo plazo en los hábitats, tan es así que se ha hecho esencial y se ha exhortado la evaluación de las posibles consecuencias ocasionadas por la exposición a sustancias peligrosas. Sin embargo, es evidente que en el estudio de cada uno de los químicos naturales y sintéticos, sobrepasa la capacidad de los investigadores para evaluar los riesgos ecológicos en el aire, agua y suelo. De tal manera, se requiere de esfuerzos en conjunto de toda la comunidad científica, agencias gubernamentales, sociedad civil, entre otros para estudiar, estimar y ofrecer opciones que mejoren las condiciones ambientales. Para ello recientemente, se han propuesto estudios ecotoxicológicos basados en la utilización de respuestas biológicas integradas.

La definición original de ecotoxicología, según Truhaut (1977), es "la rama de la toxicología que estudia en un contexto integral los efectos tóxicos causados por contaminantes naturales y sintéticos, hacia los individuos que constituyen un ecosistema". Para lograr esto se requiere anticipar o predecir hacia donde se dirigen las sustancias tóxicas en el ambiente y que efectos ecológicos pueden provocar al llegar a su destino (Calow, 1993). En este sentido, la ecotoxicología acuática se enfoca en estudiar las concentraciones o cantidades de químicos que pueden presentarse en el ambiente acuático, ya sea en el agua, sedimento o alimento. Por lo tanto, esto involucra estudios sobre el transporte, distribución, transformación y destino final de los xenobióticos o contaminantes en el ambiente acuático (Forbes y Forbes, 1994). La emisión de contaminantes en un medio acuático es tan variada que, al entrar en contacto con el aire, agua y sedimento, se generan mezclas complejas de contaminantes que junto con los

factores ambientales del sistema, constituyen lo que se le denominan estresores complejos, que potencialmente pueden causar cambios significativos en organismos, poblaciones, comunidad o sistema ecológico, pudiendo además actuar de manera simultánea o secuencial (Dorward-King *et al.*, 2001). En este sentido, la tendencia actual para realizar evaluaciones ambientales es mediante el uso de herramientas ecotoxicológicas, tales como los estudios integrados a los distintos niveles de organización biológica (desde lo molecular hasta el ecosistema), lo cual ha ayudado a incrementar grandemente el entendimiento de los efectos de los contaminantes de los sistemas biológicos (Hebel *et al.*, 1997). Dentro de estas herramientas destacan la utilización de biomarcadores, los cuales se pueden implementar como indicadores de impactos antropogénicos (Peakall, 1992; Schlenk, 1999). El principio sobre la utilización de los biomarcadores es que los efectos observados a niveles superiores de organización biológica (p. ej. poblaciones y comunidades) representan la suma de la red de efectos en individuos que a su vez es resultado de alteraciones a niveles inferiores (Malthy *et al.*, 2001).

Un aspecto destacado dentro de los estudios en ecotoxicología acuática es el hecho de que muchos químicos liberados al ambiente acuático, finalmente se asocian a los sedimentos (Ingersoll *et al.*, 1997). De hecho, además de considerar a los sedimentos como destino de los contaminantes, también pueden ser fuentes de los mismos (Baudo y Muntau, 1990; Ingersoll *et al.*, 1997). En sistemas acuáticos tales como humedales, ríos y estuarios los sedimentos tienen la capacidad de almacenar contaminantes persistentes (Page, 1997), muchos de los cuales pueden ser inmediatamente letales para la flora y fauna o tienen efectos nocivos a largo plazo, incluyendo deterioro y defectos en la reproducción o crecimiento (p. ej. BPC's-bifenilos policlorados; HAPs-hidrocarburos poliaromáticos; dioxinas) (Power y Chapman, 1992). Asimismo, los xenobióticos presentes en los sedimentos pueden provocar daños en organismos bentónicos, afectando indirectamente a poblaciones de niveles tróficos superiores como cangrejos, camarones y peces que son ecológica y comercialmente importantes (Power y Chapman, 1992). Adicionalmente, los sedimentos contaminados pueden presentar actividad estrogénica, teratogénica,

mutagénica y cancerígena, que presumiblemente podría afectar al humano, como se ha registrado en otras ciudades del mundo localizadas en o cerca de estuarios, como Israel (Avishai *et al.*, 2002), costa de Irlanda (Coughlan *et al.*, 2002), Carolina del Norte, E.U.A. (Damstra, 2002), Inglaterra (Depledge y Billinghamurst, 1999), entre otros.

Lo anterior indica que los estudios de evaluación de riesgo ambiental principalmente aquellos realizados en áreas estuarinas, son de suma importancia debido a que son sistemas altamente productivos, que sustentan actividades pesqueras, son lugares de crianza y desarrollo de larvas y juveniles de múltiples especies, además de ser refugio de gran cantidad de aves migratorias con potencial recreativo (Chapman y Wang, 2001). Históricamente, los estuarios son zonas que se han utilizado para el establecimiento de ciudades portuarias y que en la actualidad han registrado incrementos poblacionales importantes conforme aumenta la migración humana de grandes ciudades hacia la costa (UN, 2001). Esto ha generado presiones antropogénicas continuas sobre los estuarios, debido a que reciben una gran variedad de contaminantes provenientes de actividades industriales, agrícolas, aguas negras y descargas urbanas, así como por precipitación atmosférica (Baudo y Muntau, 1990). Los contaminantes en su mayoría son adheridos a los sedimentos ricos en materia orgánica y siendo los estuarios ricos en ella, sus sedimentos funcionan como quelantes de sustancias tóxicas (Kennish, 1997).

Es importante mencionar que una vez en los sedimentos, los contaminantes pueden ser incorporados en la columna de agua por medio de la hidrodinámica del lugar, dragado o por los mismos animales escavadores que permiten la resuspensión de los sedimentos, al removerlos para la construcción de sus galerías y de su propia alimentación. En particular, los organismos escavadores juegan un importante papel ecológico ya que permiten la oxidación/reducción de los sedimentos, dando como inicio la reincorporación de nutrientes a la cadena alimenticia. Este simple evento, ayuda a completar los ciclos biogeoquímicos por hongos y bacterias, permitiendo el desarrollo y sustento de nuevos individuos en el medio ambiente (Williams y Duke, 1979; Kristensen, 2000). Adicionalmente, al vivir en galerías, los organismos escavadores pueden estar en contacto

con capas sedimentarias acumuladas en el pasado que potencialmente pueden contener contaminantes no disponibles. Asimismo, su alimentación se basa en el detritus y/o materia orgánica adherida a los sedimentos finos por lo que, en conjunto, significa que presentan escenarios de exposición a contaminantes recientes y acumulados (Robinson y Dillaman, 1985).

Con base a lo anteriormente expuesto, el presente estudio fue planteado bajo la premisa de que los sedimentos en el Estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa presentan mezclas complejas de contaminantes, debido a la gran cantidad de actividades antropogénicas que se desarrollan en el sistema. En este sentido se propuso utilizar a el cangrejo violinista *Uca princeps* como organismo prueba, dado que es un organismo bentónico, escavador eficiente, abundante, que habita y se alimenta en los sedimentos estuarinos (detritus) de las regiones estudiadas. Con este organismo se evaluó una comparación de los efectos de los contaminantes presentes en los sedimentos, utilizando como referencia los sedimentos del Estero del Sábalo, el cual es un sistema estaurino menos influenciado por actividades antropogénicas.

Cabe mencionar, que los trabajos ecotoxicológicos con este tipo de cangrejos son muy escasos, habiéndose realizado principalmente en *Carcinus maenas*, *Callinectes spadius* y en menor proporción, con el cangrejo vionlinista *Uca sp.*, comúnmente *Uca pugilator*, *Uca minax*, *Uca pugnax* y *Uca Tángeri* (ver Hartl y Fuller, 1979). Es muy importante mencionar que el presente trabajo es el primero en su clase utilizando como organismo prueba al cangrejo violinista *Uca princeps*.

El estudio consistió en realizar bioensayos con *Uca princeps* expuestos a sedimentos, provenientes del Estero de Urías de distintas estaciones, evaluando **respuestas biológicas integradas** a nivel molecular (daño al ADN), bioquímico (activación de la enzima Glutación-S-Transferasa) y de organismo (Factor de condición múltiple, Índice hepatosomático, Índice gonadosomático y mortalidad). Posteriormente se realizó una valoración de las respuestas obtenidas para determinar un gradiente de efecto con relación al sitio de procedencia de los sedimentos y relacionarlo con las distintas actividades

antropogénicas en la zona. En este sentido, el presente estudio pretende contribuir a una mejor comprensión de los efectos que producen la exposición de contaminantes en un sistema lagunar-estuarino fuertemente impactado por mezclas complejas de contaminantes, lo que permitirá proponer nuevas estrategias de manejo y mitigación de las descargas vertidas en el sistema, intentando contribuir a propuestas encaminadas a restaurar y proteger este importante ecosistema.

2. Antecedentes.

2.1 Ecotoxicología como herramienta de evaluación ambiental.

Según van Leeuwen (1995) "la ecotoxicología es el estudio de los efectos tóxicos de sustancias en especies no humanas, en sistemas complejos". Los efectos ecotoxicológicos son cambios en el estado de la dinámica de los organismos o de otros niveles de organización biológica, resultado de la exposición a sustancias químicas donde el número y variedad de interacciones incrementa conforme aumenta la complejidad del sistema. Esto significa que, debido a la complejidad de los sistemas, se requieren establecer de modelos para describir las interacciones entre sustancias y especies (toxicología), entre sustancias y sistemas (química) y entre las especies y los sistemas (ecología), así como el tomar en cuenta la integración total de las interacciones (Fig. 1), para predecir los efectos reales de los tóxicos sobre los organismos y así poder proporcionar una evaluación de peligro y/o riesgo ambiental (EPA, 1998).

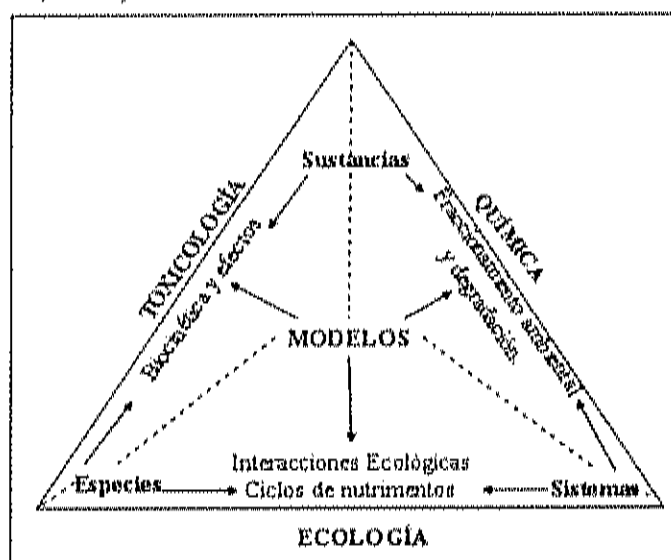


Figura 1. La ecotoxicología es un estudio multi-disciplinario que estudia los efectos de sustancias tóxicas sobre especies en sistemas ambientales complejos. Tomado de: van Leeuwen, 1995.

Por lo anterior, dentro de los estudios ecotoxicológicos, es necesario considerar las características del ambiente y el comportamiento de los contaminantes están dados para el comportamiento de interacciones ambientales de cada lugar. Para tales estudios, sin

embargo, es difícil conciliar un aspecto en común que satisfaga todas las disciplinas a estudiar, ya que cada una aporta una del conjunto dentro de la evaluación en ecotoxicología (van Leeuwen, 1995). Por ejemplo, si se requiere evaluar la toxicidad en sedimentos para establecer las relaciones de causa-efecto, se pueden adoptar dos estrategias:

Existen dos metas en los bioensayos con sedimentos: 1) Evaluar los efectos tóxicos de sedimentos contaminados y 2) Predecir la toxicidad de una sustancia química o grupo de sustancias químicas particulares en organismos bentónicos (van Leeuwen, 1995).

Para conocer la presencia de contaminantes en sedimentos se requiere realizar varios pasos: a) análisis químicos del sedimento, donde se mide la contaminación, b) bioensayos con sedimento, que miden toxicidad y c) parámetros *in situ*, que por ejemplo, miden la alteración de la estructura en las comunidades bentónicas. La información provista por cada uno de los componentes es única y complementaria; la combinación de los componentes es necesaria, porque ninguno de ellos por separado provee información contundente y comprensiva, fuera de un contexto ambiental (Chapman, 1990).

Adicionalmente, otra parte importante que conforma un estudio ecotoxicológico son los denominados bioindicador y biomarcador, que aunque parecieran denotar un significado similar son distintos. Un *bioindicador* mide efectos en una *población* o *comunidad* (Peakall, 1992). Mientras que un *biomarcador* mide los efectos de estresores ambientales relacionados con *individuos* de una población y en términos generales obtienen relaciones entre concentración de uno o varios xenobióticos con la(s) respuesta(s) biológica(s), así como, obtienen relaciones entre efectos adversos con respuestas que puedan predecir grandes efectos a nivel ecosistema. Los efectos observados en los biomarcadores al ser estudiados en organismos individuales pueden ser *rápidamente* percibidos y con mayor facilidad, que a nivel poblacional o de una comunidad como sucede en los bioindicadores. El estudio de biomarcadores que representen diferentes niveles de organización biológica, permite observar integralmente el bienestar de *individuos* que representan una parte de una población, lo cual permite explorar el bienestar de la población (Hebel, 1997). Sin embargo, para poder tener una visión holística del estado del ecosistema se requiere el

estudio de la interacción de los biomarcadores en distintos organismos de la trama trófica. Dentro de los biomarcadores, según Schlenk (1999), se pueden identificar tres categorías diferentes:

a) Biomarcadores de exposición: puede indicar y/o estimar la biodisponibilidad de un xenobiótico particular o su metabolito activo en el organismo. Este tipo de biomarcadores tratan de proporcionar información de una "dosis biológicamente efectiva", donde se identifique la concentración que puede ser peligrosa en el ambiente, para conducir una adecuada valuación de riesgo.

Algunos ejemplos de biomarcadores de exposición son:

- i. Inducción de la enzima Citocromo P450 (CYP1A), la enzima Glutación-S-Transferasa (GST), inducidas principalmente por la presencia de hidrocarburos aromáticos planos (Akcha *et al.*, 2003; Besten, 1998; García, 1998).
- ii. Inducción de la vitelogenina en machos al ser expuestos a compuestos estrogénicos (Thompson *et al.*, 2000; Foran *et al.*, 2000).
- iii. La presencia de aductos en el ADN, siendo la unión de moléculas de hidrocarburos aromáticos policíclicos al ADN interfiriendo con su actividad normal (Snyder y Mudler, 2001).

b) Biomarcadores de efecto: estiman respuestas no específicas que pueden ser inducidas por más de un estresor ambiental, que pudieran estar relacionadas al crecimiento y/ reproducción; respuestas específicas en los órganos. Los biomarcadores de efectos pueden ser medidos desde el nivel molecular hasta llegar al nivel de ecosistema y pueden variar con respecto a su especificidad.

Algunos ejemplos de biomarcadores de efecto pueden ser: tumores-daño histopatológico; una sobre-producción de proteínas oncogénicas-daño bioquímico; inducción de enzimas como P450-proceso de excreción de tóxico-nivel bioquímico; fragmentación del ADN-daño molecular (Schlenk, 1999).

c) **Biomarcador de susceptibilidad:** evalúa las *condiciones* que se conjuntan para incrementar la tasa de transición de efectos observados en los biomarcadores de exposición y efecto.

Los bioindicadores, así como los biomarcadores son instrumentos esenciales de trabajo para poder realizar evaluaciones de monitoreo ambiental, pues pueden ser evaluados dentro de toda la gama de organismos vivos desde bacterias hasta mamíferos. Para el propósito de la evaluación ambiental, se recomienda utilizar organismos que representen los diferentes niveles tróficos de la cadena alimenticia y que se presume o se conozca afectados por la contaminación. De preferencia, las características de los organismos a evaluar deben cumplir con lo siguiente: amplia distribución geográfica y/o locales, importancia ecológica, fácil manejo en el laboratorio y en el campo, ciclo de vida relativamente corto y movilidad limitada (ASTM, 1997).

En el presente trabajo se estudiaron biomarcadores a distintos niveles de organización biológica, en un crustáceo decápodo estuarino, el cangrejo violinista *Uca princeps* (Smith, 1870). La información que brinda cada uno de los biomarcadores estudiados es descrita a continuación:

a) *Genotoxicidad*- se evaluó por medio del Ensayo cometa o también conocido como electroforesis en gel de una sola célula, capaz de estimar el aumento en el nivel de fragmentaciones en la molécula de ADN en células eucarióticas individuales como resultado de exposición a sustancias químicas y radiaciones UV (Steinert *et al.*, 1998; Collins, 2004). El ensayo cometa se basa en el hecho de que el ADN en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado pierde la estructura de enrollamiento y, al ser expuesto a una carga positiva en la electroforesis, los fragmentos del ADN migran hacia ella, formando así los cometas (Collins, 2004).

Es un método que bien puede ser utilizado rutinariamente en pruebas *in situ*, debido a su sencillez y rapidez (Wilson *et al.*, 1998). De hecho, es un método que ya se utiliza para

probar la genotoxicidad de nuevos químicos, monitoreo de contaminación ambiental con genotóxicos (Steinert *et al.*, 1998 a y b; Avishai *et al.*, 2002; PEEIR, 2004), biomonitoreo humano y epidemiología molecular (Wojewódzka *et al.*, 1999), así como investigación básica del daño al ADN y sus sistemas de reparación (Mitchelmore y Chipman, 1998). Diversos estudios han utilizado organismos acuáticos expuestos a aguas y sedimentos contaminados donde se conoce existe una alta posibilidad de que existan contaminantes genotóxicos. Esos trabajos de monitoreo ambiental principalmente se han enfocado en bivalvos como los mejillones *Mytilus edulis* (Nacci *et al.*, 1992 y 1996; Steinert *et al.*, 1998a; Steinert *et al.*, 1998b; Wilson *et al.*, 1998), ostiones como *Cassostrea virginica* (Nacci *et al.*, 1992 y 1996), almejas como *Tapes semidecussatus* (Hartl *et al.*, 2004; Coughlan *et al.*, 2002); crustáceos como camarón de pasto *Palaemonetes pugio* (Lee *et al.*, 2000); poliqueto como *Platynereis dumerilli* (Hutchinson *et al.*, 1998), lenguado *Pleuronectes vetulus*, lenguado bocón *Hippoglossina stomata* y platija espinosa *Pleuronichthys verticalis* (Roy *et al.*, 2003).

Todos ellos coinciden en que la prueba del Ensayo Cometa es una técnica útil, sensible, rápida y funciona como un amplio indicador específico de la exposición a contaminantes genotóxicos (Mitchelmore y Chipman, 1998).

b) *Glutación-S-Transferasa* (GST)- es una familia de enzimas que desempeñan una función importante en la detoxificación y eliminación de compuestos mutágenos, carcinógenos y otras sustancias químicas nocivas (Jakoby, 1978; Mannervik, 1985). Este proceso de detoxificación consta de dos fases I y II, siendo en la fase II donde se activa este grupo de enzimas. Durante la fase I se pueden llevar a cabo reacciones como hidrólisis, oxidación y reducción de los químicos entrantes al organismo, dentro de las cuales se insertan grupos polares en los químicos entrantes al organismos, tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) o amino (-NH₂). Los productos obtenidos de la fase I son compuestos reactivos que fácilmente se conjugan con las reacciones en la fase II. Estos compuestos reactivos entran a la fase II donde se introduce un grupo polar grande a su molécula por medio de diferentes mecanismos metabólicos, tales como las

conjugaciones del ácido glucurónico, sulfato, acetil y glutatión, lo cual los puede convertir en compuestos que son suficientemente hidrofílicos para poder ser excretados vía orina o heces fecales (Van den Berg *et al.*, 1995).

Comúnmente se ha estudiado la inducción de la GST como un biomarcador de exposición a xenobióticos en peces y apenas hace una década se empezó a estudiar en invertebrados de agua dulce como por ejemplo el cangrejo *Eriocheir japonicus* (Ishizuka *et al.*, 1998), el langostino *Machrobrachium malinsonii* (Saravana y Geraldine, 2001); el anfípodo *Gammarus pulex* (McLoughlin *et al.*, 2000) y más recientemente en invertebrados marinos principalmente en bivalvos tales como *Peaten maximus* (Le Pennec y Le Pennec, 2003.) y en crustáceos como el cangrejo *Carcinus maenas* (Elumalai *et al.*, 2002) y el langostino *Procambarus clarkii* (Escartín y Porte, 1996).

c) *Factor de condición*- es una práctica estandarizada en el manejo de poblaciones de peces, que refleja la condición morfológica y fisiológica del organismo midiendo condición individual y de la cohorte (p.ej. condición de un grupo de la misma edad). Este índice refleja en términos generales el bienestar del organismo y se estima en relación a la longitud y el peso determinado de un individuo, usualmente concerniente al crecimiento de los organismos (Bolger y Connolly, 1989; Pope y Kruse, 2001; Rodríguez-Gutiérrez, 1992 ; Rodríguez y Marañón, 1992 y Lundebye *et al.*, 1997). Esta misma relación de peso y longitud se ha utilizado para los diversos organismos en las pesquerías, adecuándolo a las características de longitud y peso de los individuos.

En el caso de los crustáceos es una práctica que aún no se ha desarrollado del todo, debido al estudio preciso de las características únicas y cambiantes de cada uno de los estadios de crecimiento del organismo, incluyendo sus mudas. Sin embargo, se han llevado a cabo mediciones del factor de condición principalmente en la acuicultura para detectar el crecimiento en diversos organismos, enfocándose en la condición nutricional como en el cangrejo *Chionoectes opilio* (Godbout *et al.*, 2002).

Este índice, sin embargo, puede ser influenciado por la disponibilidad de alimento, crecimiento gonadal y la presencia de contaminantes, por lo que deben de ser calculados para cada organismo (Lundebye *et al.*, 1997).

En el presente estudio también se consideraron el *Índice hepatosomático* (IH) e *Índice gonadosomático* (IG) que, como sus nombres lo indican, estudian dos órganos el hepatopáncreas y gónadas respectivamente, donde se relaciona su peso con el peso total de los individuos. Dichos índices reflejan de manera general la alimentación y por el ciclo reproductivo del animal.

La utilización de estos índices en acuicultura se ha determinado para comparar calidad de dietas (Jussila y Manonnen, 1997). Sin embargo, en estudios ambientales los índices de condición biológica se han utilizado para evaluar el crecimiento, salud, desarrollo, incluso el efecto de los xenobióticos en los organismos, sobre todo en animales que sean de fácil manejo y en donde el reconocimiento de cualquier diferencia en los índices sea evidente. A continuación se mencionan algunos trabajos donde se han utilizado estos índices dentro de evaluaciones ecotoxicológicas. Por ejemplo, Panter *et al.*, (1998) estudiaron peces machos sexualmente maduros *Pimephales promelas*, los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de estrógenos (estradiol y estrona) presentes en los efluentes de desechos urbanos, encontrándose que a menor concentración de los dos estrógenos un aumento de los testículos, mientras que al aumentar la concentración se indujo una inhibición del crecimiento testicular. Asimismo en un estudio con mejillones (*Mytilus edulis*) para evaluar los efectos de xenobióticos que contienen estaño como Tributyl estaño (TBT) y el Dibutyl Estaño (TBD), se colectaron organismos de 5 sitios alrededor de la isla de Fyn, Dinamarca para evaluar proteínas de estrés, concentración de TBT y TBD en el tejidos de los mejillones y medir cuatro índices de condición. Sin embargo, ninguno de ellos reflejó efectos con respecto a las concentraciones de los xenobióticos (Lundebye *et al.*, 1997).

2.2 Cangrejos violinistas, Género *Uca* spp. (Smith, 1870).

Provenientes del orden Decapoda, infraorden Brachyura, Familia Ocypodidae y Género *Uca*, los cangrejos violinistas son crustáceos que conforman parte de la macrofauna bentónica que habita en los sedimentos de lagunas, estuarios y regiones intermareales donde la salinidad fluctúa de agua dulce a hipersalina, siendo organismos detritívoros, con actividad predominantemente diurna (Crane, 1975). Estos organismos construyen más de una galería por individuo con una profundidad aproximada de 20-30 cm (Ilsøe *et al.*, 2003), para facilitar el traslado de un lugar a otro para la obtención de alimento y el escape de depredadores (Genoni, 1991). Al subir la marea estos cangrejos, tapan las entradas de las galerías se mantengan oxigenadas. Kristensen, (2000), menciona que el área de las paredes de las galerías puede llegar a ser varias veces el de la superficie anóxica, lo que permite la reincorporación de los elementos esenciales en los ciclos biogeoquímicos.

Los hábitos alimenticios de estos cangrejos permiten remover y por lo tanto contribuyen a la oxidación de los sedimentos. Estos organismos remueven continuamente el sedimento en busca de materia particulada, algas, bacterias, detritus, etc. de la superficie del substrato. Ellos manipulan y seleccionan con sus quelas el sedimento, pasándolo por la boca para ingerir la materia orgánica y desechan la materia inorgánica, la cual es separada por varias partes de la boca y expulsada en forma de pequeñas bolas o pellets circulares (Miller, 1961; Williams y Duke, 1979).

Los cangrejos *Uca* son fácilmente distinguibles por su caparazón regularmente cuadrado y por su dimorfismo sexual, donde los machos desarrollan una de sus quelas de mayor tamaño que la otra, mientras que las hembras tienen sus dos quelas del mismo tamaño (Figura.2). En época de reproducción los machos tratan de llamar la atención de las hembras con un movimiento conocido como "waving" ondeo de la quela predominante, para atraerlas y así poder aparearse (Crane, 1975).

Dentro de los crustáceos más sobresalientes en las lagunas estuarinas están los cangrejos nadadores, de lodo, espalda cuadrada y violinistas (Williams y Duke, 1979).

Dentro del género de *Uca*, *Uca princeps* se distingue por ser una de las especies más grande. Su distribución va desde las áreas subtropicales en el Noreste del Pacífico y en el trópico este del Pacífico (Smith, 1870; Crane, 1975). Dentro de la República Mexicana se encuentra desde Bahía San Bartolomé, B.C., presentándose en Mazatlán, Sinaloa, hasta el sur del país, inclusive su distribución llega hasta Perú,. También comparte el territorio del Pacífico mexicano con otras especies de su mismo género: *Uca crenulata*, *Uca macrodactylus*, *Uca musica*, *Uca zaca*, *Uca vocator* (Hendrickx, 1984; Rodríguez, 1987).

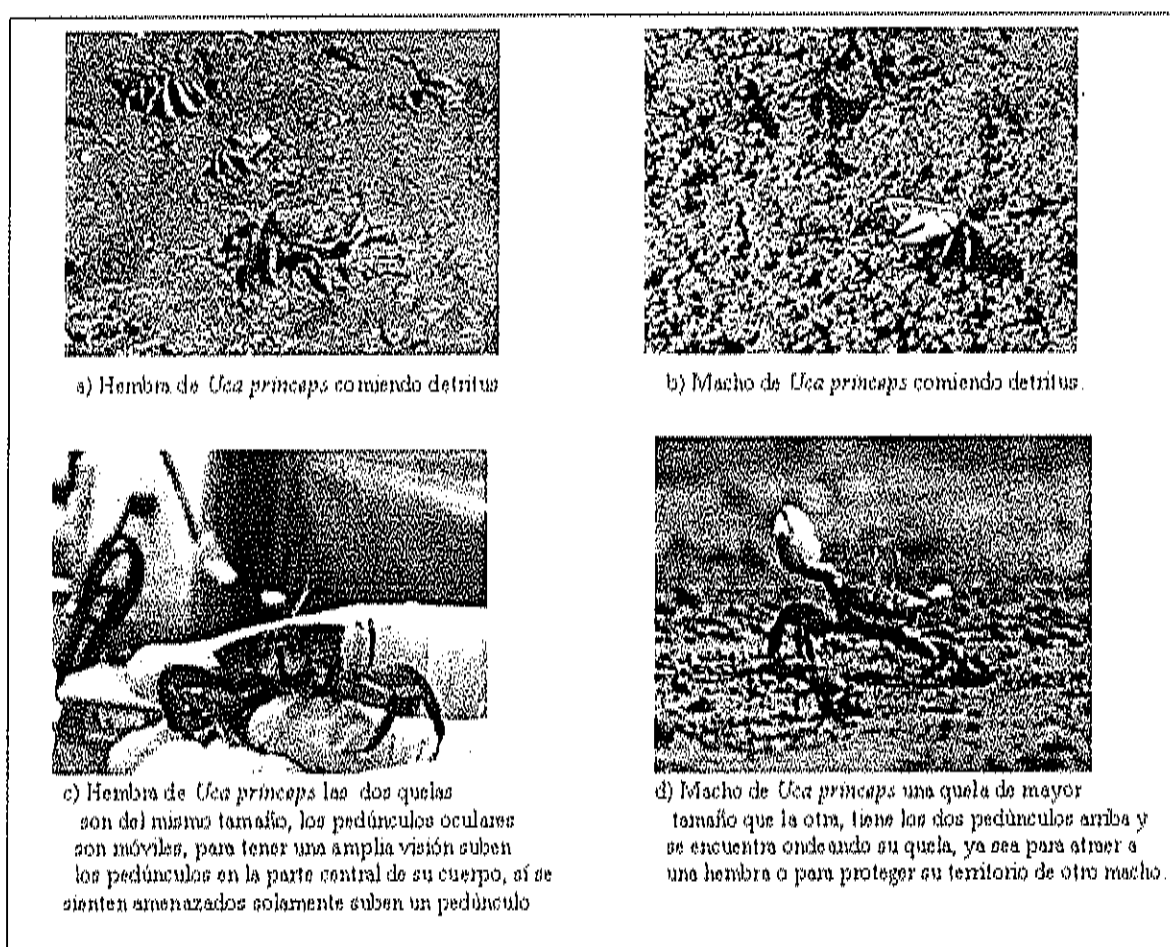


Figura 2. Dimorfismo sexual de cangrejo violinista, *Uca princeps* (Smith, 1870).

Uca princeps presenta coloraciones predominantes de distintos tonos de café y morado, donde a veces el color parece combinarse con otros colores como el azul y el verde. También se encuentra en menor proporción de tonalidades de color crema combinado con

café-rojizo. Los machos, tienen una gran diferencia de coloración solamente en la quela grande que tienen, siendo de colores anaranjados a rojizos alrededor de la misma y en el centro con colores crema. Habitan en planicies de inundación de los estuarios y sobre todo en las zonas intermareales en sedimentos fangosos a semi-arenosos en zonas cercanas a bosques de manglar, su mayor actividad se registra al bajar la marea y su ciclo es diurno (Crane, 1975; Williams y Duke, 1979).

Se ha reportado que los cangrejos violinistas como *Uca sp.* mantienen un estrecho lazo entre el detritus que recibe y produce el bosque de mangle, ya que modifican la estructura física y vegetativa del bosque de manglar, debido a la acción de bioturbación y forrajeo de los sedimentos (Smith, 1987) y excavación de galerías de los sedimentos contiguos al manglar (Smith *et al.*, 1991). Con todo ello, estos organismos mantienen la transmisión de energía en la base de la cadena alimenticia de los manglares, hacia los consumidores de niveles tróficos más altos, en los cuales se incluyen aves y peces, algunos de importancia económica (Macintosh, 1984).

Debido a su importancia ecológica y sus hábitos alimenticios, se ha utilizado a *Uca sp.* en diferentes estudios para detectar las respuestas de estos animales a contaminantes en los sedimentos. Por ejemplo, Weis y Mantel (1976) evaluaron el efecto de la regeneración de pleópodos y el proceso de muda en *Uca pugilator* y *Uca pugnax*, con una exposición crónica de DDT. Los resultados mostraron que una concentración de 10 ppb aceleraba la regeneración y, sólo con la presencia de DDT el tiempo de muda se acortó. Con lo anterior se sugirió que el fenómeno de regeneración, provocaba una excitación del sistema nervioso central como un efecto de la exposición al DDT.

Por otro lado, Krebs *et al.* (1974), evaluaron los efectos de hidrocarburos clorados en *Uca pugnax* empleando diferentes dosis semanales de DDE y de lodos provenientes de aguas residuales donde se encontró la presencia de aldrin y dieldrin. En la dosis más alta de DDE se observó una disminución de la población de cangrejos, mientras que con los lodos existió un aletargamiento y una alta mortalidad de los cangrejos con respecto a las áreas control, concluyéndose que los insecticidas eran responsables por la drástica reducción de la población de cangrejos

También se estudiaron los efectos del plaguicida organoclorado conocido como Mirex sobre organismos estuarinos, incluyendo los cangrejos azules y los cangrejos violinistas. Se encontró que Mirex mostraba un efecto retardado en los cangrejos adultos, mientras que afectaba severamente a los juveniles (McKenzie, 1970). En otro experimento similar se alimentó a juveniles de cangrejo azul con carnada que tuviera Mirex. Después de cuatro semanas de haberles administrado el alimento, la mayoría de los cangrejos mostraron parálisis o la muerte al final de experimento. La concentración de Mirex encontrada en los cangrejos que sobrevivieron fue de 0.99 ppm, la cual fue utilizada para alimentar a *Uca pugilator*, donde murieron una o dos semanas después de haber consumido el alimento con Mirex, lo cual dependió de la cantidad de alimento contaminado ingerido y la temperatura del experimento (Lowe *et al.*, 1971).

Lee *et al.*, (1976) mostraron la capacidad de los cangrejos de acumular petróleo y sus derivados. El estudio evaluó la cantidad de hidrocarburos acumulados por medio de alimento marcado con Radio al ser expuestos los organismos a hidrocarburos parafínicos y aromáticos, incluyendo benzopireno, fluoreno, naftaleno entre otras fracciones, en *Callinectes spadius*. El hepatopáncreas fue el órgano que acumuló la mayoría de los hidrocarburos, ya que fue el único órgano que contenía radioactividad. El trabajo sugirió que el hepatopáncreas era el lugar donde se metabolizan los hidrocarburos, no se encontró ningún otro rastro de Radio presente en otros tejidos.

Por otro lado, se han investigado los efectos de diferentes temperaturas y salinidades en la acumulación de mercurio en el cangrejo violinista *Uca pugilator*. Aunque el contenido de mercurio total en branquias y hepatopáncreas se mantuvieron en proporciones similares, la cantidad del metal en cada uno de los tejidos varió bajo las diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, con temperaturas altas se encontró una mayor eficiencia de transmisión de mercurio hacia el hepatopáncreas que en las branquias (Vernberg y O'Hara, 1972).

Robinson y Dilliman (1985) observaron los efectos del naftaleno en la ultraestructura del hepatopáncreas en el cangrejo violinista *Uca minax*, exponiéndolo durante 5 días a este hidrocarburo, encontrando que las células mayormente afectadas fueron aquellas con lípidos abundantes en la membrana celular (células F) caracterizadas como células con enzimas digestivas y células de almacenamiento de lípidos (células R). Al afectar la estructura de la membrana de las células se facilita la entrada del hidrocarburo a los organelos de la célula y siendo las células F ricas en enzimas digestivas contenidas en los lisosomas, al verse afectados liberan las enzimas al medio lizando lo que se encuentre a su paso. Asimismo, al afectar las células R donde se acumulan lípidos es factible que existan alteraciones endócrinas, ya que no estarán los lípidos disponibles para la producción de hormonas.

En uno de los estudios más recientes con *Uca pugnax* y *Uca pugilator* se realizó una investigación acerca del crecimiento, mortalidad y contenido de metales pesados en estos invertebrados con seis dietas de detritus proveniente de *Spartina alterniflora* (pasto marino) y *Phragmites australis* (carrizo) en dos diferentes humedales: uno contaminado con metales pesados (Hackensack Meadowlands, Nueva Jersey) y en un área de referencia (Puerto de Accabonac al este de Hampton, Nueva York). También se monitoreó la regeneración de pléopodos, muda y peso al inicio y a los 49 días que finalizó el experimento. *Uca pugilator* regeneró sus pléopodos y mudó igualmente con las 6 dietas. Mientras que *Uca pugnax* detuvo el crecimiento de sus pléopodos a la mitad de la regeneración en las 6 dietas. Aunque la concentración de metales pesados en el detritus de las dos diferentes plantas varió en los dos humedales y entre plantas, la concentración de los metales pesados en los grupos de cangrejos no cambió después del experimento, donde se concluye que los datos obtenidos no son consistentes como para suponer que el detritus de *Phragmites* es de menor calidad que el detritus de *Spartina alterniflora* para consumidores estuarinos (Weis *et al.*, 2002).

2.3 Trabajos realizados en el Estero del Sábalo y el Estero de Urfías.

1) Estero del Sábalo-Lugar de Referencia.

El estero del Sábalo ha sido objeto de muy pocos estudios, los cuales han sido principalmente enfocados a la evaluación del potencial pesquero del sistema. Dentro de estos estudios se han identificando 8 especies de peces con potencial pesquero (*Mugil cephalus*, *Eucinostomus argenteus*, *Centropomus robalito* y *C.nigrescens*) (Schneider, 1983). También se han llevado a cabo muestreos de postlarvas de camarón y parámetros ambientales, concluyendo que es importante tomar precauciones en lo que se refiere a la descarga de aguas residuales que recibe el sistema (S.R.H., 1975). En el 2000 se abrió una planta de tratamientos de aguas residuales, llamada "Cerritos", al norte del sistema, que en su mayoría trata aguas domésticas y del sector turístico eficientemente. Según Garza *et al.* (1985) se presume que el principal problema de contaminación del estero es provocado por la presencia de la marina que ha cambiado el flujo del agua, trayendo consigo el asolvamiento del área y el constante flujo de combustibles (hidrocarburos) y sustancias repelentes de balanos, vertidos por los navíos al sistema. El Estero del Sábalo ha sufrido la reducción de su superficie del tamaño total que tenía en 1973 con 275 ha, hasta 95 ha en 1997, principalmente por la urbanización del área (Ruíz y Berlanga., 2003).

Actualmente, el complejo turístico "El Cid Resort" se encuentra urbanizando la zona del Estero del Sábalo, donde dragarán la planicie de inundación para permitir el paso de embarcaciones de una profundidad aproximada de 4.5 m, mientras que alrededor será limpiado de la vegetación para empezar a construir casas habitación (Quiñones, 2004). Los impactos de estas actividades, aunque impredecibles, son potencialmente graves.

2) Estero de Urfías.

El Estero de Urfías recibe una cantidad importante de contaminantes. De 1985 a 1995 recibió un promedio anual de 22,075,200 m³ de aguas residuales y 58,400 m³ de lodos a través de la planta de tratamientos primarios Mazatlán I (Osuna-López *et al.*, 1997). Tales descargas son fuente de materia orgánica, detergentes, metales pesados y otros compuestos. Dependiendo de la época vacacional la población turística que representa

1,600,000 habitantes por año (Jumapan, 2004), saturan aún más la capacidad de carga del sistema. La población de Mazatlán es mayor a los 300,000 habitantes (INEGI, 1999), los cuales generan aproximadamente 1500-2000 L/s de aguas residuales (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2000) y solamente un 40 % recibe un tratamiento primario por la planta de tratamientos de aguas negras "El Crestón" (Soto-Jiménez *et al.*, 2001).

También, el parque industrial A. Bonfil, el canal de PEMEX, el taller de Ferrocarriles Mexicanos, el rastro municipal y la termoeléctrica "José Aceves Pozos" descargan sus efluentes hacia el estero, los cuales son fuente de material orgánico, hidrocarburos, sustancias plastificantes, metales pesados (Páez-Osuna *et al.*, 1990), biocidas y cambios bruscos de temperatura, principalmente por el uso del agua de la termoeléctrica. El estero de Urías es un cuerpo de agua que se mezcla verticalmente (salinidad promedio de 27-37 ‰; Salgado, 2002), con un recambio regular de mareas de 0.8 m, con una velocidad de 23-46 cm s⁻¹ y con un tiempo de residencia relativamente corto (Páez-Osuna *et al.*, 1990), por lo tanto, los efluentes industriales y domésticos pueden ser expulsados del sistema de una manera eficaz (Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 2000).

En este sistema se han realizado algunos estudios para conocer el nivel de contaminantes, siendo los más estudiados los metales pesados. Osuna-López *et al.* (1986) analizaron la concentración de ocho metales pesados disueltos y particulados en agua, encontrando niveles de níquel, zinc y plomo comparables o mayores a los encontrados en regiones consideradas como afectadas. En otro estudio en sedimentos se determinó la distribución y concentración de metales pesados y materia orgánica en el Estero del Infiernillo perteneciente al Estero de Urías, donde se encontró que el sistema presenta una mayor concentración de seis metales pesados (Cu, Co, Cr, Cd, Mn, Fe, Ni, Pb y Zn) y carbono orgánico en sus sedimentos superficiales con respecto a otras zonas internas del Puerto de Mazatlán (Osuna-López *et al.*, 1997). Asimismo, algunos agroquímicos y sustancias de origen industrial han sido estudiadas en las lagunas costeras más importantes de Sinaloa, reportando a Urías como el sistema más contaminado (Galindo-Reyes, 2000), donde sobresalen el heptacloro, lindano (HCH ϕ), su isómero (HCH ω) y pp'-DDE,

mencionando que estos plaguicidas provienen principalmente de escurrimientos agrícolas aledaños, descargas municipales e industriales del puerto de Mazatlán.

En los últimos diez años se ha empezado a realizar un esfuerzo por encontrar organismos tipo, que ayuden a monitorear el estado y los efectos de los contaminantes en el ambiente. Por ejemplo, Soto-Jiménez *et al.* (2001) trabajaron con tejido de ostiones, *Crassostrea iridescens* para estudiar la concentración de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) al ser expuestos en un área con una dinámica regular de corrientes y transporte de sedimentos, afectada por las descargas de la planta de tratamiento de aguas negras "El Crestón", muy cerca de la entrada al estero de Urías, que está influenciado por la navegación de la flota camaronera, atunera, pesca deportiva y turística, entre otros usos. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de los metales de las descargas directas de las aguas negras tratadas y de la biodisponibilidad de los mismos en el sedimento. Los metales que mayormente se encontraron fueron Cu, Ni, Pb y Zn en transectos en dirección que va de sur a norte fue detectada indicando una dominancia del transporte de las descargas hacia el norte de la planta de tratamiento. *Crassostrea iridescens* acumuló más Zn, Cu, Ni, Fe, Cd y menor proporción Mn, Cr y Pb de lo que se encontraba biodisponible en los sedimentos, lo que indica que son organismos que pueden acumular metales pesados en su cuerpo. La concentración de Cd en los tejidos fue mucho mayor de lo que se estaba desechando e las descargas, lo que sugirió que existía otra fuente de Cd, probablemente proveniente de la suspensión de nutrientes de los sedimentos. Los ostiones que se colocaron en áreas menos afectadas por las descargas registraron menor cantidad de metales pesados en su organismo en comparación con los ostiones cercanos a las descargas.

También se han tratado de utilizar a balanos *Balanus eburneus*, *Fistulobalanus dentivarians* y *Megabalanus coccopoma*, localizados en 4 diferentes áreas del estero de Urías. Las áreas de muestreo son representativas de un lugar poco influenciado por los contaminantes, otro por la zona industrial, otro por las descargas urbanas y finalmente por el tráfico de navegación en el canal de entrada del estero. Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de cada uno de los lugares, observándose

variaciones de concentración de los metales entre los organismos debido a los diferentes ciclos reproductivos, sin embargo, sí se pudieron distinguir los metales sobresalientes de entre 8 metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) en cada uno de los lugares con cada uno de los organismos (Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 1998).

Por otro lado, Salgado (2002) evaluó el impacto de las descargas de una granja camaronícola en el Estero de Urías sobre la fauna de invertebrados asociada a el ecosistema lagunar ayacente. Dentro de su estudio, encontró que las comunidades de invertebrados de los esteros cercanos a la granja camaronícola " La Clementina S.C.L." en el Estero de Urías, mostraron un gradiente de recuperación conforme se alejaban de la granja. En el Estero Barrón (cercano a la granja) los organismos se vieron afectados, por presentar una menor hidrodinámica y recibir más del 80 % de las aguas vertidas por la granja, mientras que el efecto de las descargas de la granja se extiende hacia los alrededores a menor grado, prácticamente no presentándose efectos en los organismos presentes en el estero más alejado de la granja a dos kilómetros (Estero el Caimán).

Recientemente se ha tratado de utilizar otro tipo de organismos ubicados en distintos niveles de la cadena trófica. Dichos estudios intentan integrar diferentes niveles de organización biológica, tal es el caso del análisis comparativo de las características morfohistopatológicas en *Mugil curema* Valenciennes (lisa blanca) en dos sistemas lagunares, estero de Urías y Teacapan, Sinaloa (Ríos-Sicairos, 2004); el estudio de metazoarios parásitos de la lisa *Mugil curema* (Cuvier y Valenciennes, 1836) como indicadores de contaminación en dos sistemas lagunares, estero de Urías y Teacapan, Sinaloa- México (García-Vázquez, 2003) donde el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, causó efectos como malformaciones, problemas de desarrollo, pérdida de la capacidad reproductiva máxima, alteración morfológica de órganos como el hígado y desequilibrios en la ecología parasitaria de las lisas *Mugil curema*. Rodríguez-Preciado (2004) evaluó la bioacumulación de mercurio (Hg) en tejido muscular de la lisa *Mugil curema* (Valenciennes, 1938) de los Esteros Urías y Teacapan, Sinaloa, registrándose en el Estero de Teacapan existe una mayor concentración de mercurio que en el Estero de Urías, correspondiendo a que cerca del Estero de Teacapan existió una zona minera. Otros

estudios se han enfocado a evaluar, los cambios cualitativos en la distribución macroalgal en el estero de Urías (Ochoa-Izaguirre *et al.*, 2002); la dominancia de macrofauna: anélidos como el poliqueto *Capitella capitata*, *Streblospio benedicto* y oligoquetos en sedimentos sujetos a impacto antropogénico en el estero de Urías (Méndez, 2002) y la estructura de la meiofauna en relación a la contaminación del estero de Urías (Morales, 2004), en donde en todos ellos se encuentra un gradiente de contaminación, ubicando al Estero de Urías como un estero bastante contaminado, a partir de la presencia de materia orgánica y consecuentemente por la abundancia de individuos bentónicos y pelágicos.

3. Hipótesis.

La integración de respuestas a diferentes niveles de organización biológica mediante bioensayos ecotoxicológicos con el cangrejo violinista *Uca princeps*, permitirá realizar una caracterización de la toxicidad de sedimentos provenientes de sitios con distintos niveles de impacto antropogénico.

4. Objetivo General.

Evaluar la toxicidad de sedimentos provenientes del Estero de Urías y del Estero del Sábalo, sobre respuestas a distintos niveles de organización biológica en *Uca princeps*.

5. Objetivos Particulares.

5.1 Diseñar e implementar trampas para capturar *Uca princeps* en el Estero del Sábalo.

5.2 Diseñar e implementar un sistema de bioensayos para evaluar la toxicidad de sedimentos contaminados del Estero de Urías, utilizando *Uca princeps* como organismo de prueba.

5.3 Evaluar la toxicidad de los sedimentos del Estero de Urías en *Uca princeps*, a nivel: a) molecular-Ensayo cometa, b) bioquímico-actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa y c) organismo-Factor de condición múltiple, Índice gonadosomático e Índice hepatosomático.

5.4 Analizar comparativamente la evaluación de la toxicidad de los sedimentos del Estero de Urías sobre *Uca princeps*.

6. Material y Metodología.

Los organismos utilizados en este estudio fueron hembras de cangrejo violinista *Uca princeps*, provenientes del Estero del Sábalo (estero de referencia), Mazatlán, Sinaloa, México. Los machos fueron descartados por presentar una conducta territorialista. Por otro lado las hembras tienden a acumular más lípidos que los machos para fines reproductivos, lo cual las puede volver más vulnerables a xenobióticos tóxicos liposílicos, que penetran las membranas bilipídicas de las células (Hodgson y Levi, 1987). Para tal objetivo se diseñaron trampas específicas para atrapar hembras de un largo del caparazón entre 2.5-3.0 cm (tamaño observado en análisis previos de este estudio donde las gónadas se encuentran desarrolladas), para completar un total de 140 y llevarlas a aclimatación bajo condiciones de laboratorio. Asimismo se diseñó un sistema de bioensayo que permitió simular las mareas, manteniendo la temperatura (25 ° C), fotoperíodo (13 Luz: 11 obs.) y salinidad marina (35 ‰) constantes, con la finalidad de evaluar biomarcadores en diferentes niveles de organización biológica.

Los organismos capturados fueron expuestos en el sistema de bioensayos durante 21 días a sedimentos provenientes de cuatro localidades del Estero de Urías (U1, U2, U3, U4; Fig.5), Mazatlán, Sinaloa, México y una localidad del estero del Sábalo (S-lugar de referencia). El contaminante modelo utilizado fue β -naftoflavona (BNF) incorporado en el sedimento del estero del Sábalo a una concentración de 413 μ M.

Al final de la exposición se evaluaron diferentes respuestas biológicas a nivel: molecular-ensayo cometa, bioquímico- actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa y organismo-Factor de condición; Índice hepatosomático; Índice gonadosomático y mortalidad. Todas las respuestas fueron analizadas estadísticamente, por un lado individualmente (biomarcadores) y por otro en conjunto para dar una valoración aproximada de la contaminación del medio ambiente.

A continuación, en la Figura 3 se muestra un diagrama de la metodología general llevada a cabo en este estudio.

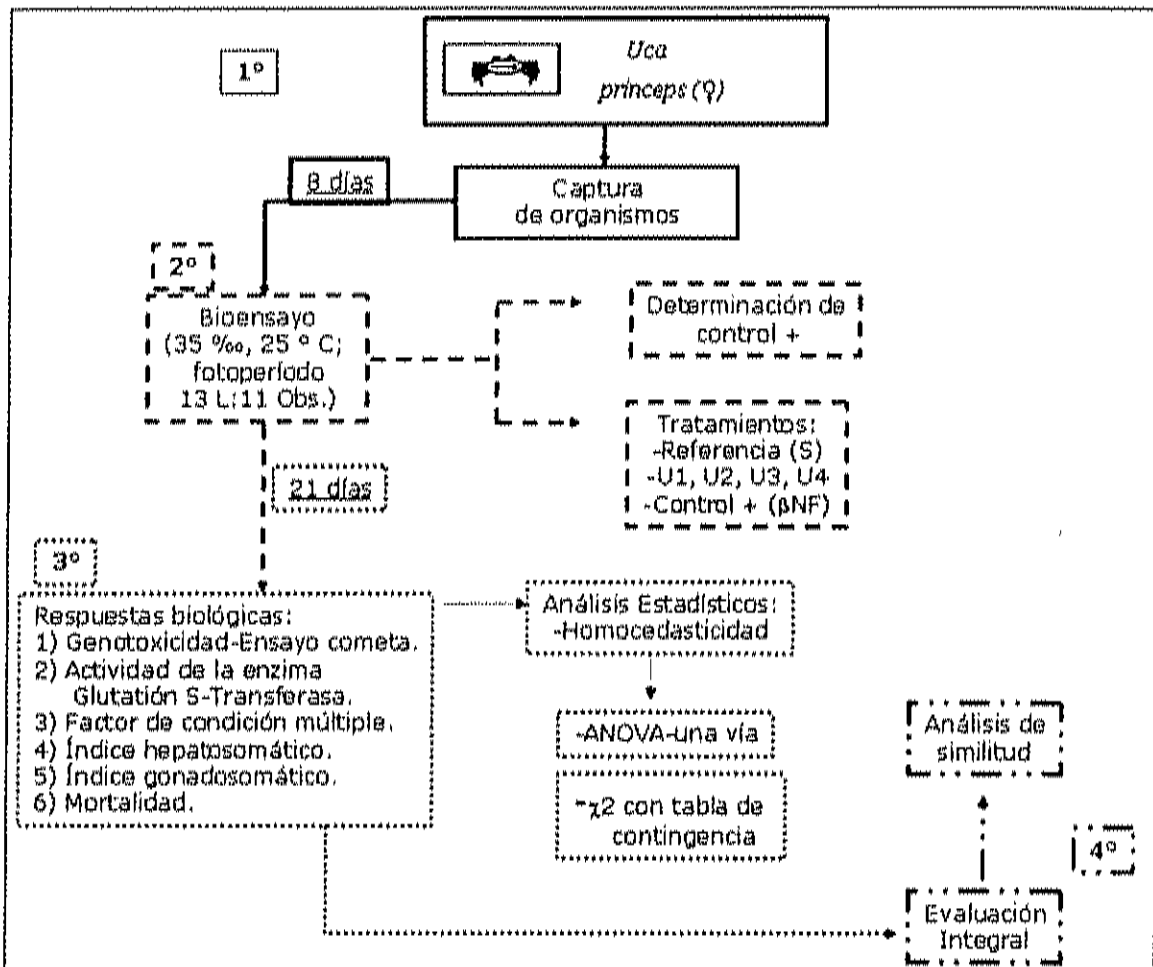


Figura 3. Diagrama general de la metodología llevada a cabo con cangrejo violinista *Uca princeps* para evaluar las respuestas biológicas como posibles biomarcadores de contaminación ambiental.

6.1 Área de Estudio.

1) Estero del Sábalo-Localidad de Referencia.

El Estero del Sábalo se localiza al norte de la ciudad y puerto de Mazatlán, Sinaloa entre los 23 ° 11' latitud norte y 105 ° 27' longitud oeste. El sistema contaba en 1997 con una superficie acuática de 0.9 km² (Ruíz y Berlanga, 2003), siendo en la actualidad un cuerpo de agua muy somero y azolvado que recibe aportes de agua dulce escasos de dos arroyos llamados "Tiros cuates" y "Bellavista" (Garza *et al.*, 1985) que desembocan en la región noreste.

La profundidad promedio durante la temporada de lluvias varía entre 2.5 y 0.20 m, descendiendo en los meses de sequía a valores entre 1 m y 0.10 m con amplias zonas de desecación total (Schneider, 1983). Sobre el lado sureste recibe la descarga de aguas residuales del complejo turístico "El Cid Resort"(Garza *et al.*, 1985).

En la década de los 70s se construyó sobre el estero un puente que comunica a la zona turística "Sábalo-Cerritos" que ha modificado el nivel de marea (flujo y reflujo) dentro del sistema trayendo como consecuencia alta evaporación y salinidad debido a la escasa profundidad (S.R.H., 1975). Existe un tapo para la pesca localizado bajo este puente. A un costado de la boca se construyó un canal artificial para establecer comunicación permanente entre éste y el mar con el propósito de incrementar la producción camaronesa, pero su estrechez y diseño han provocado que el intercambio de agua efectivo, aunque casi permanente, sea limitado (Garza *et al.*, 1985).

El clima del área es tropical con lluvias de verano de tipo Aw o (w) (e), (García, 1973) con una temperatura media anual de 24.34°C. La vegetación predominante en el sistema está constituida en su mayoría por los árboles de mangle *Laguncularia racemosa*, *Avicennia nitida* y *Conocarpus erectus*. El sustrato del estero es predominantemente fangoso, con pocas zonas rocosas (Álvarez-León, 1980). El molusco bentónico más abundante es el bivalvo *Tagelus sp.*, que sufre mortalidades masivas en la época de sequía. Entre las raíces de los mangles habitan gran cantidad de cangrejos grápsidos (p.ej. *Goniopsis pulchra*) y gecarcínidos (*Cardisoma crassum*), en la marea baja aparecen grandes concentraciones de *Uca sp.*, sobre todo en los márgenes del estero junto a las raíces de los manglares. El cangrejo ermitaño *Clibanarius panamensis*, se presenta durante todo el año. La jaiba *Callinectes arcuatus*, el langostino *Marchrobrachium sp.* y los camarones *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, son los crustáceos más abundantes e importantes del estero. Entre las aves más abundantes destacan la garza blanca (*Ardea sp.*), la garza gris (*Butorides sp.*), el pelícano (*Pelecanus sp.*) y el cormorán (*Phalacrocorax sp.*) (Garza *et al.*, 1985).

2) Estero de Urías.

El Estero de Urías está localizado al sur de Sinaloa, entre los 23° 10' y 23° 13' de latitud norte y los 106° 20' y 106° 25' de longitud oeste, ubicado al sur de Mazatlán y al norte de la desembocadura del río Presidio. El sistema recibe varios aportes de agua continental entre los cuales se encuentran el Estero del Infiernillo, Estero Confites y Estero de la Sirena que en conjunto presentaban en 1997 de superficie acuática de 14.4 km² (Ruíz y Berlanga, 2003). El Estero de Urías cuenta con una profundidad menor a 1 metro en los márgenes y llanuras de inundación y tiene una profundidad de 10-15 metros en el canal de navegación, mientras que el Estero del Infiernillo tiene una profundidad de 1-2 m y abarca un área aproximada de 4, 000 m³ (Páez-Osuna *et al.*, 1990; Soto-Jiménez *et al.*, 2001). El sistema presenta desarrollo urbano en su periferia, donde se realiza actividad industrial, pesca ribereña, astilleros de flota de pesca atunera, sardinera y camaronesa, una termoeléctrica, agricultura de temporal y camaronicultura.

El clima del área es tropical con lluvias de verano de tipo Aw o (w) (e) (García, 1973), con una temperatura media anual de 25 a 28 ° C, los vientos predominantes son el NW en el invierno y el SW en el verano. Presenta barreras arenosas de orientación triangular, con ejes orientados hacia afuera de la playa con relación a la difracción del oleaje (islas, arrecifes, bancos) o promontorios rocosos; escurrimientos ausentes o muy localizados; forma y batimetría modificadas como el caso anterior (III-A); energía típicamente baja, excepto en los canales de marea y durante condiciones de tormenta; salinidad variable que depende de la zona climática (Lankford, 1977). A diferencia de los sistemas estuarinos, el estero de Urías no tiene un aporte permanente de agua dulce y presenta un gradiente de salinidad positivo hacia el interior durante la mayor parte del año (Salgado, 2002).

La precipitación pluvial media alcanza los 850 mm, con un marcado periodo de lluvias a finales del verano y principios del otoño, frecuentemente acompañados por tormentas tropicales (Álvarez-León, 1980).

La vegetación litoral, a pesar de que ha sido destruida considerablemente, está constituida por manglar, principalmente *Rhizophora mangle* (mangle rojo) y *Laguncularia racemosa* (mangle blanco). El sistema tiene una elevada productividad primaria atribuida a niveles altos de nutrientes por el exceso de materia orgánica de origen antropogénico. Se ha reportado una predominancia de diatomeas, dinoflagelados y macroalgas, además de zooplancton constituido principalmente por ctenóforos, braquiuros y copépodos calanoideos (Álvarez-León, 1980). A partir de 1994 se han registrado con más detenimiento los efectos del exceso de materia orgánica y sus requerimientos de oxidación causando niveles bajos de oxígeno disuelto del agua, lo que ha representado condiciones no favorables para la ictiofauna y ha producido muertes masivas en el sistema (Osuna-López *et al.*, 1994). Otro aspecto es la pérdida de biodiversidad en el estero que obedece al deterioro de la calidad del agua por contaminación y modificación de su geomorfología y la circulación de masas de agua por el dragado del canal de navegación, la construcción de muelles de la flota pesquera y otras obras civiles (Galindo-Reyes, 2000).

A continuación, en la Tabla 1 se muestra la ubicación exacta de las áreas muestreadas y en la Figura 4 se muestran geográficamente.

Tabla 1. Ubicación de las localidades de muestreo en los Esteros de Urías y del Sábalo.

	Localidad	Ubicación
Urías 1 (U1)	Antes Calixto	23° 09.787
		106° 19.838
Urías 2 (U2)	Lado Termoelectrica	23 ° 10.962
		106 ° 21.052
Urías 3 (U3)	Lado de Sardinera	23° 12. 711
		106° 22.554
Urías 4 (U4)	Isla Infiernillo	23° 13.148
		106° 24.541
Sábalo (S)	Estero del Sábalo	23° 16.833
		106° 27.948

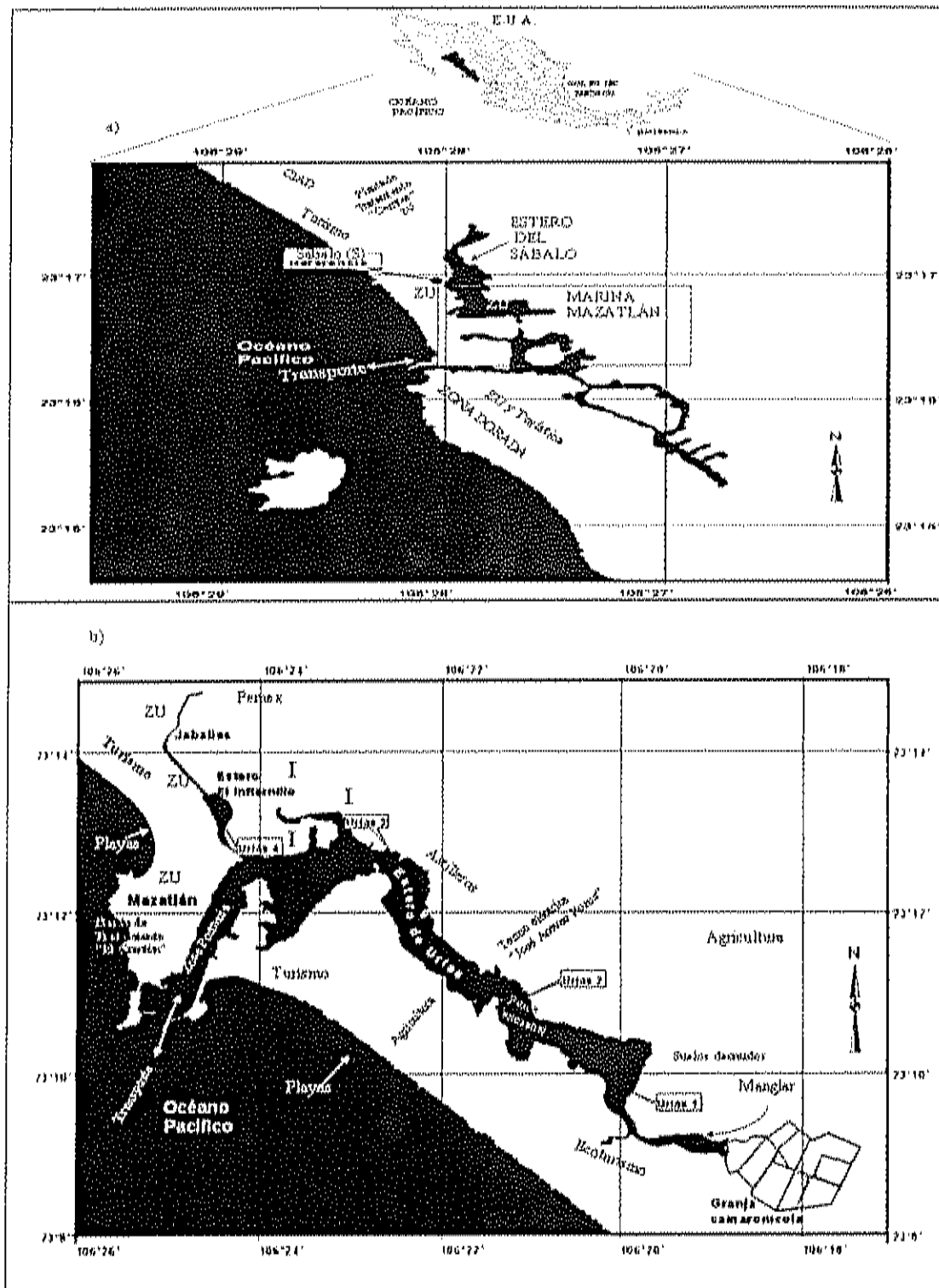


Figura 4. Ubicación de localidades y principales actividades de las áreas de estudio en Mazatlán, Sinaloa, México: a) Estero del Sábalo-1 localidad (R=Referencia) y b) Estero de Urias-4 localidades (U1, U2, U3 y U4). I= Industrial; ZU= Zona Urbana (Imágenes Landsat, 1997; modificado de Renán-Ramírez, 1998).

6.2 Diseño, implementación de trampas y aclimatación de *Uca princeps*.

6.2.1 Construcción y funcionamiento de trampas.

Para la construcción de las trampas se siguieron las recomendaciones del Dr. John Christie (com. pers.) del Instituto Smithsonian-Unidad Panamá y el diseño descrito por Wolfrath (1993).

En análisis previos al bioensayo se observaron al microscopio las gónadas de hembras de *Uca princeps*, para conocer y determinar a qué longitud se encontraban maduras la mayor proporción de hembras, lo que lanzó como resultado una longitud entre 2.5-3.1 cm, por lo que se hicieron modificaciones de tamaño de las trampas para el tamaño requerido de hembras maduras y así obtener un tamaño relativamente homogéneo (Fig. 5a).

Las trampas consistieron en tubos de PVC de 5 cm de diámetro y 12 cm de longitud. En la parte interior y media inferior del tubo se colocó pegamento para PVC con arena para permitir trepar a los cangrejos (Fig. 5, b). Las trampas se colocaron de manera somera y selectivamente en las galerías de hembras de *Uca princeps* en el Estero del Sábalo (Fig. 5, e). Por el exterior del tubo se insertó un tornillo de 2 cm, a una distancia de 4 cm de uno de los extremos del tubo. El tornillo se colocó de tal manera que funcionaba de tope para una compuerta semitransparente de plástico suspendida por hilo de pescar, la cual permitía el paso del cangrejo y atraparlo al cerrarse la compuerta tras él, al detenerse con el tornillo (Fig. 5, b). En el otro extremo, se colocó una malla de tela blanca sujeta con una liga, para impedir el escape del cangrejo una vez dentro de la trampa (Fig. 5, c y d).

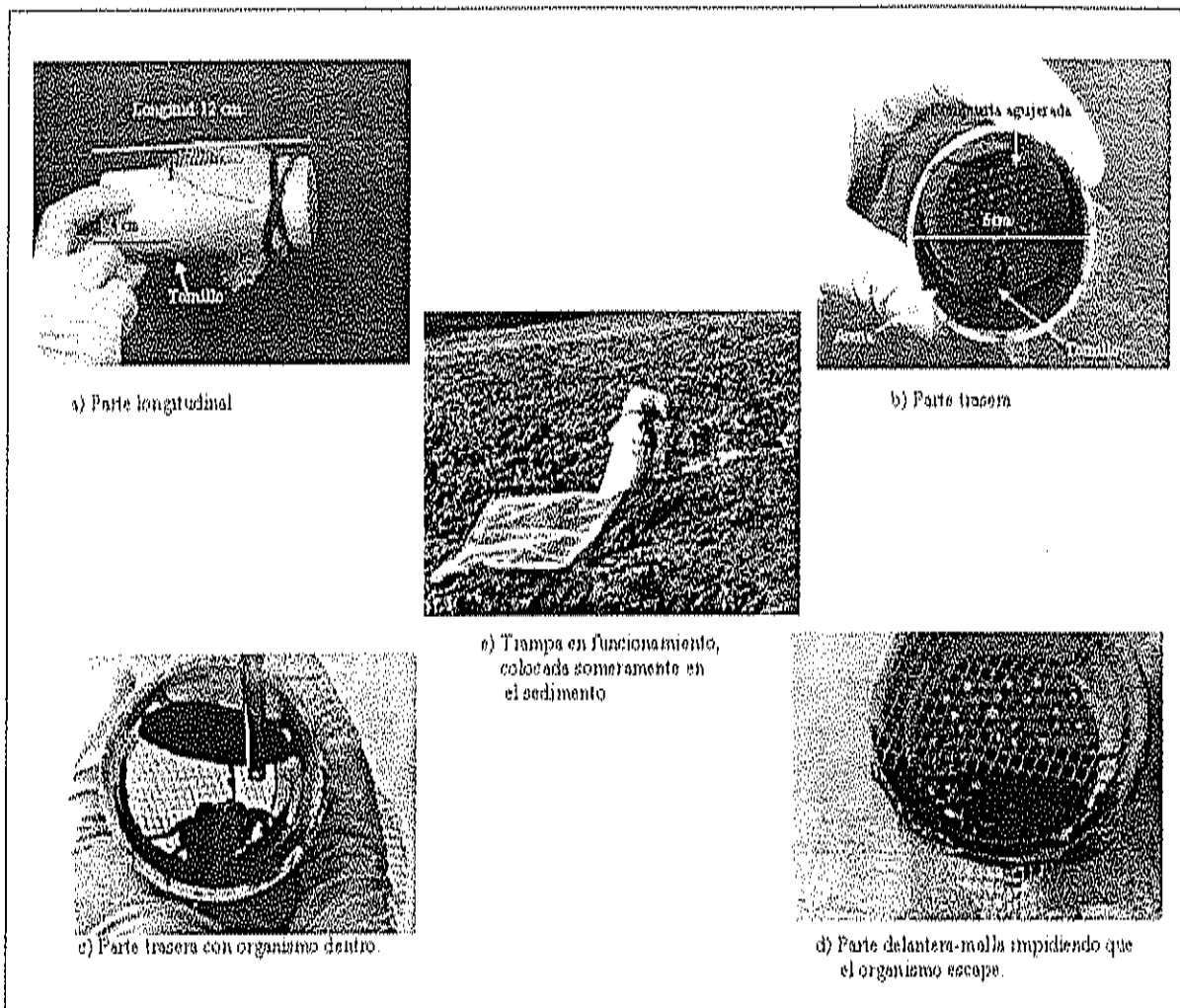


Figura 5. Características y funcionamiento de las trampas para capturar hembras de *Uca princeps*.

a) Colecta.

Las trampas fueron colocadas en el Estero del Sábalo a mediados del mes de mayo. En total se capturaron 150 hembras con las medidas antes mencionadas. Al bajar la marea, las trampas se colocaron a lo largo de la zona intermareal, procurando siempre caminar por la zona con agua, para evitar que los organismos percibieran movimientos. En lapsos de 20-25 min., se revisaban las trampas para obtener los cangrejos atrapados. Además de las trampas, también se utilizaron palas para poder bloquear el camino de las galerías y forzar al cangrejo a salir de ella. Todos los cangrejos capturados se colocaron en jivas con agua del estero y cubriéndolos del sol para evitar un aumento de temperatura. Al mismo tiempo

se colectó suficiente sedimento del Estero del Sábalo para poder aclimatar a los organismos.

b) Aclimatación.

Una vez obtenidos los animales, estos se aclimataron en un cuarto húmedo. El sedimento del Estero del Sábalo fue colocado en jvas de plástico (69 x 39 x 35 cm) y tinas de fibra de vidrio (1.85 m x 60 cm x 20 cm), inclinadas 60°, para posteriormente colocar los organismos. Esto permitió simular el área intermareal donde habitan estos animales, de tal modo siempre hubo un área de la java con agua disponible para mantener frescos a los organismos, aun cuando el nivel del agua se bajó a diario para aparentar la marea baja.

Los organismos se mantuvieron por 8 días en el cuarto húmedo a una temperatura ambiente (28-30° C) con agua marina (35 ‰) y aireación constante. La marea alta se simuló diariamente por las noches, subiendo el nivel del agua durante 17 hrs. Adicionalmente por la noche se suministraron microalgas (*Tetracelmis* sp.). Por las mañanas se bajó el nivel del agua durante 7 hrs., para permitir que los cangrejos se alimentaran del sedimento (Williams y Duke, 1979). Se mantuvo un fotoperíodo igual al de condiciones naturales con 13 hrs. luz y 11 hrs. de oscuridad.

6.3 Diseño e implementación de un sistema de bioensayos con sedimentos.

6.3.1 Sistema de mareas.

Se diseñó un sistema de mareas que funcionó casi de manera automática, por medio de la presión hidrostática y sifoneo (Fig. 6, a y c), tomando en cuenta algunas recomendaciones del Ing. Ignacio Romero Castro (com. pers.), Fac. de Ingeniería, UNAM. Para ello, se utilizaron jvas de plástico de color obscuro (verde olivo) para evitar alterar a los organismos con colores brillantes, con dimensiones de 69 x 39 x 35 cm (Fig. 6) y al igual que en la aclimatación, éstas fueron inclinadas 60° para permitir la simulación de la

zona intermareal, en donde quedara un área con agua que mantuviera el sedimento húmedo (Fig. 6, b).

El sistema de mareas se llevó acabo por medio de sifoneo diario, para el cual se colocó en el interior y en el inferior de una esquina de las jivas un cilindro de plástico (negro-tubo de rollo fotográfico), con la tapa perforada y en donde se incertó uno de los extremos de la manguera del sifón (polietileno 0.5 cm de diámetro) para permitir solamente la succión del agua superficial hacia el interior del cilindro al bajar el nivel del agua (Fig. 6, e). La manguera permitió sifonear el agua desde el cilindro hacia el exterior de la java (Fig. 6, a), donde fue atada a la pared exterior formando una doble curvatura. La 2^a curva de la manguera fue perforada en su parte superior y fue amarrada con un cordón en forma de polea, lo que permitió regular (subir y bajar esta curva).

El llenado de las jivas se completaba en aproximadamente de 2.5 a 3 hrs. durante las tardes para mantener el nivel superior durante 14 h (noche). Durante las mañanas se bajaba la manguera (Fig. 6, a) para bajar el nivel del agua (aprox. 2.5 a 3 hrs.), el cual permanecía así durante 4 hrs., para nuevamente subir la manguera (Fig. 6, c) y resistuir el nivel superior del agua.

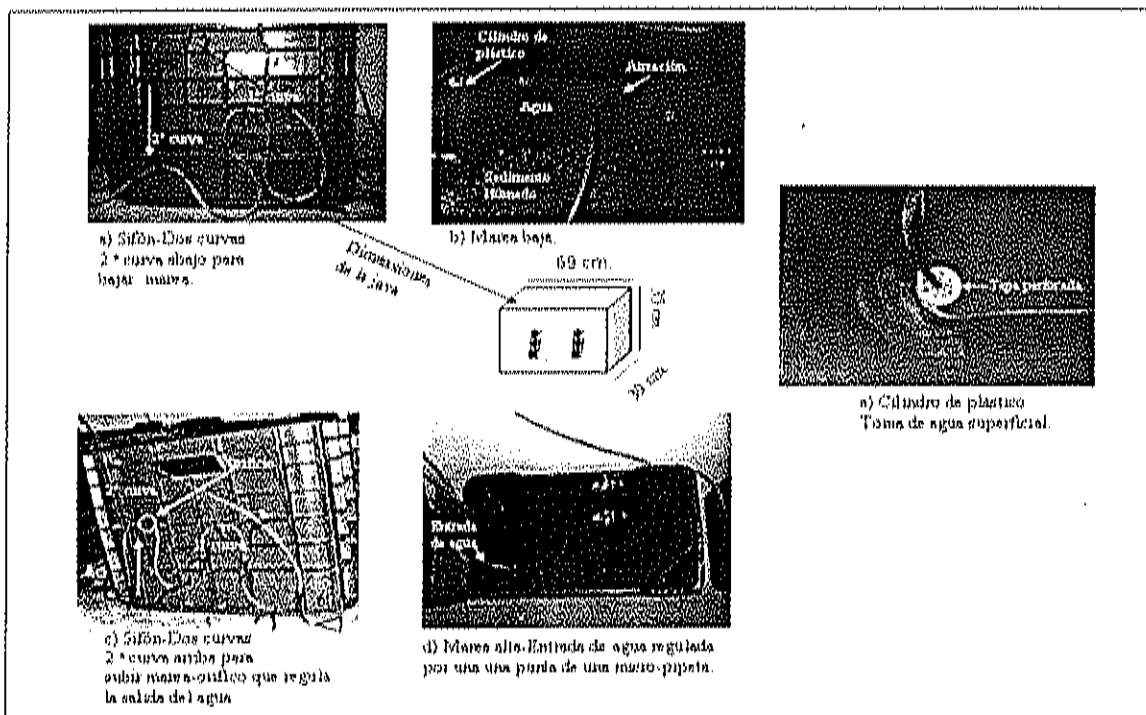


Figura 6. Características del sistema de mareas por medio de sifoneo.

También se diseñó el sistema de bioensayos, en una sala con dimensiones de 1.20 x 2.50 m (Fig.7). Esta sala cuenta con un sistema de temperatura y fotoperíodo controlados, los cuales se mantuvieron a 25 ° C y 13 hrs. luz: 11 hrs. oscuridad, respectivamente. El agua salada fue obtenida de una toma directa del mar, con una salinidad de 35 ‰, la cual fue filtrada y pasada por una lámpara de rayos UV, para ser almacenada en un tanque dentro del cuarto con capacidad de 400 L. Dentro del tanque se colocó un bomba sumergible (Little Giant, Oklahoma), la cual se conectó al sistema de distribución del agua. Del mismo modo se dispusieron tomas de aire que suministraron aireación dentro del tanque y en cada java. Para disminuir en todo lo posible el estrés provocado por la iluminación exterior al entrar y salir del cuarto, así como cualquier movimiento que pudiera alterar a los organismos, se colocó una cortina de color negro alrededor de los contenedores en donde posteriormente fueron ingresados los cangrejos, esto permitió realizar las actividades y observaciones diarias, molestando lo menos posible a los animales.

6.4 Diseño Experimental.

Los sedimentos del Estero de Urías y del Estero del Sábalo fueron colectados a finales de mayo en un mismo día, obteniéndose el sedimento de los primeros 10 cm de la superficie, (aproximadamente 80 Kg del Estero del Sábalo y 30 Kg de cada localidad del Estero de Urías). La cantidad de sedimento utilizada por java fue de 8 Kg, el cual, antes de ser colocado en las jvas correspondientes, fue homogenizado en su totalidad manualmente por tres min. (EPA, 2001). Posteriormente, se tomaron muestras de sedimento para diferentes análisis, tales como: granulometría (Folk, R., 1974), materia orgánica (Schumacher, 2002) y evaluación cualitativa de la fauna asociada (Anexo 1). Asimismo, se tomaron aprox. 1.5-2 Kg de sedimento para análisis de contaminantes como metales pesados (Cromo, Plomo, Cadmio y Mercurio), hidrocarburos aromáticos policíclicos totales y compuestos clorados (Anexo 1). Los resultados de estos análisis de contaminantes no serán presentados en esta tesis.

Una vez que las jvas se encontraron con su sedimento respectivo y homogenizado, éstas fueron llenadas con agua marina para permitir la precipitación de los sedimentos en el fondo durante 1 noche. El control negativo consistió en sedimentos del Estero del Sábalo, mientras que el control positivo se preparó con sedimento de estero del Sábalo adicionado con el hidrocarburo β -naftoflavona (BNF) a una concentración de 412 μ M. Esta concentración utilizada se decidió a partir de bioensayos preliminares donde se determinaron la actividad de la enzima la enzima Glutación-S-Transferasa y el ensayo cometa, cuidando que dicha concentración no produjera mortalidades de organismos (Anexo 5).

Una vez adicionados los sedimentos en las jvas, se transfirieron un total de 120 cangrejos previamente seleccionados por la longitud del caparazón de 2.5-3.1 cm, medidas que fueron tomadas con un verniere digital Multiyoyo Absolute Digimatic (precisión de 0.01 mm).

Finalmente, se colocaron 6 organismos por java, los cuales fueron colocados al azar en los tratamientos igualmente dispuestos, quedando distribuidos en la sala de bioensayos de la siguiente manera (Fig. 7): Sábalo (S) fue el único tratamiento con 5 javas para obtener mayor cantidad de datos y evaluar la variabilidad natural, mientras que los demás tratamientos, β -naftoflavona (BNF), Urías 1 (U1), Urías 2 (U2), Urías 3 (U3), Urías 4 (U4), contaron con 3 javas por tratamiento.

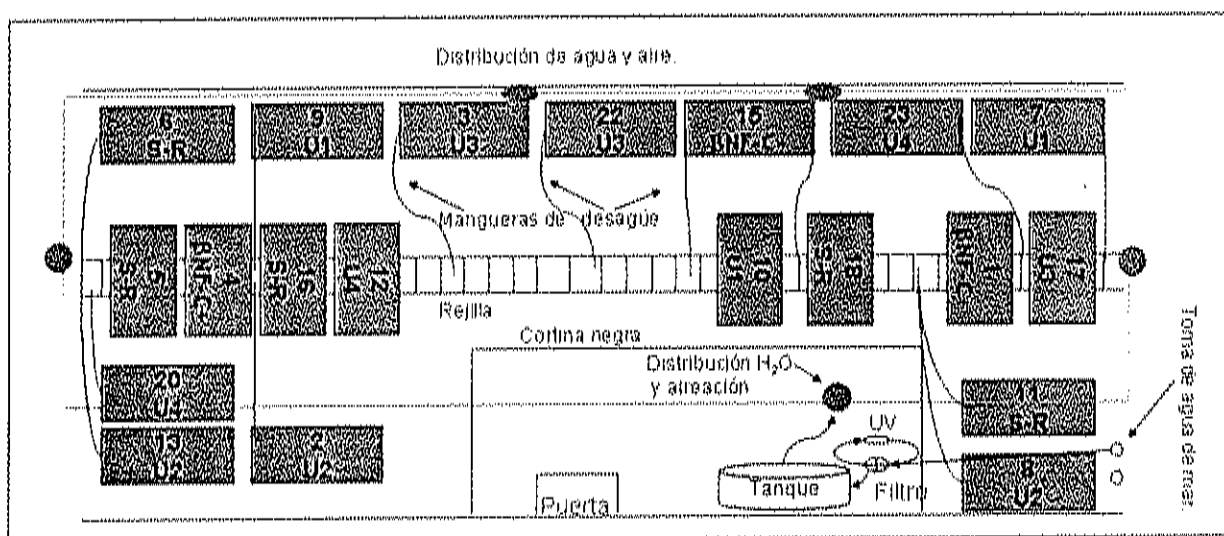


Figura 7. Arreglo final de la sala de Bioensayos II para realizar un experimento con sedimentos en presencia de *Uca princeps*.

Una vez ingresados los organismos, estos se mantuvieron en exposición durante 21 días, donde cada semana fueron tomados los datos de mortalidad. Según Coughlan *et al.*, (2002) una exposición (subcrónica) de 21 días, es suficiente para poder obtener principalmente respuestas a nivel molecular, entre otras varias respuestas biológicas.

6.5 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre *Uca princeps* a nivel molecular: Genotoxicidad.

Para conocer el daño al ADN provocado a hemocitos de *Uca princeps* expuesto a sedimentos contaminados, se llevó a cabo el análisis del Ensayo Cometa (modificado de Trevigen Inc. 2001) en el Laboratorio de Biología Molecular, CIAD-MZT (Anexo 2).

Se tomaron muestras de hemolinfa de 20 cangrejos en aclimatación al día cero, cuando inició el experimento, el cual fue un grupo aparte del lote transferido a la sala de bioensayos, pero igualmente seleccionados. Todo ello con el motivo de conocer el estado inicial de los organismos al inicio del experimento.

Al día 21 se tomaron muestras de hemolinfa al azar de 10 organismos del tratamiento de Referencia (Sábalo) y 6 organismos de cada uno de los tratamientos. Cada organismo fue tomado como réplica, ya que todos estuvieron bajo las mismas condiciones. Una vez llevado a cabo el ensayo cometa se analizaron microscópicamente las laminillas para realizar los conteos y poder evaluar si había existido algún daño en el material genético de los hemocitos de los organismos evaluados, siguiendo los procedimientos descritos en Horváthová *et al.* (1998), Trevigen, (2001) y Collins (2004).

El estos procedimientos se describe que existen dos tipos de conteo de células dañadas: 1) análisis de imágenes por computadora; 2) análisis visual, dentro de los cuales no existen diferencias significativas entre los dos tipos de análisis, por lo tanto al no contar con el programa de análisis de imágenes, se utilizó el análisis visual.

Dicho análisis visual consiste en observar 50 células en 5 diferentes lugares de la laminilla, contando 10 células al azar en cada una de las 4 esquinas, así como en el centro, utilizando un microscopio (Olympus BX60) a 400 x de magnificación recomendación de Ellie Fairbairn, Universidad de California-Davis (com. pers.).

En ensayos previos con hemolinfa, se obtuvo la clasificación de 5 diferentes niveles de daño de las células que fueron caracterizados del 0-4, de acuerdo a Collins (2004) en base a la distancia a la que migra el ADN hacia fuera del núcleo de la célula, formando una cola, como la de un cometa, de ahí el nombre del ensayo "cometa" (Avishai *et al.*, 2002). El nivel 0 corresponde a células con una cola no detectable y conforme se aumenta el nivel de daño en las células el tamaño de la cola aumenta, hasta llegar al nivel 4 donde todo el ADN se encuentra fuera del núcleo como una nebulosa y donde el núcleo no es visible. De esta manera, un valor de cero (50 x 0) corresponde a células intactas, mientras que un valor de 200 (50 x 4) corresponde a células dañadas (Avishai *et al.*, 2002).

Posteriormente, se comparó por medio de análisis estadístico el daño causado en los hemocitos de la hemolinfa de *Uca princeps* entre tratamientos, para ello fue necesario *convertir los conteos* de las células a *Unidades Arbitrarias (UA)*, las cuales representan la media de la clasificación visual dada por las réplica en cada tratamiento. Para este análisis utilizó el total de la clasificación de daño del tratamiento encontrado entre el valor de 0 (menor daño) a 200 (mayor daño) (Modificado de: Horváthová *et al.*, 1998; Collins, 2004; García-comunicación personal).

Una vez obtenidos los valores de Unidades Arbitrarias, se sometieron a un análisis de comparación Múltiple de Holm-Sidak (Sokal y Rolf, 2001), en el programa SIGMASTAT © 2003, seguido de la asignación de grupos homogéneos.

Con el fin de comparar y conocer la consistencia de diferentes análisis estadísticos para procesar estos datos, los conteos reales de los hemocitos fueron sometidos a un análisis estadístico de χ^2 con una tabla de contingencia, donde se comparó cada uno de los tratamientos (U1, U2, U3, U4 y BNF), contra el tratamiento de referencia (S) (Yamane T., 1999).

6.6 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre Uca princeps a nivel bioquímico: actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa.

Para medir la actividad de la enzima Glutación S Transferasa el ensayo se obtuvo una parte del hepatopáncreas que fue extraído del organismos, previamente sacrificados en hielo y disectados en hielo para evitar la lisis del hepatopáncreas (Anexo 3, Fig. 1). Posteriormente, el hepatopáncreas se homogenizó en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M con un pH 6.5 en frío, durante 1 min. a 7000 rpm, para posteriormente centrifugar a 4° C durante 30 min a 9000g (Beckman GS-15 R). El sobrenadante obtenido fue extraído con una jeringa de insulina, para evitar tomar la capa superficial de lípidos y vertido en un tubo eppendorf de 1.5 μ l, el cual se guardó en el congelador a -20 ° C hasta el día siguiente para su análisis.

Las muestras fueron descongeladas en frío para después llevar a cabo una dilución de 1:3 del sobrenadante obtenido con solución amortiguadora de fosfatos. En esta dilución se realizaron las determinaciones de proteínas totales a 595 nm (Bradford, 1976)y actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa (Habig *et al.*, 1974) en un lector de placas a 390 nm (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlandia)(Anexo 4). La enzima Glutación-S-Transferasa cataliza una reacción de conjugación de substrato CDNB (1-Cloro 2, 4-dinitrobenceno) con Glutación (GSH), formándose un producto que puede ser monitorizado por el aumento de absorbancia a 340 nm.

Las actividades de los diferentes tratamientos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homocedasticidad, para posteriormente compararlos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), acoplada con la prueba de comparación múltiple Holm-Sidak (Sokal y Rolf, 2001) donde se realizaron comparaciones pareadas entre los tratamientos (S,U1, U2, U3, U4 y BNF).

6.7 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre *Uca princeps* a nivel organismo: a) Factor de condición múltiple, b) Índice hepatosomático e c) Índice gonadosomático.

Se midieron largo, ancho altura y peso de los organismos para calcular:

a) Factor de condición múltiple (FCM) (Ricker, 1975 ; Medina, 1980;

Busacker *et al.*, 1990).

$$FCM = (W / Lp^b \times A^c) \times 10$$

Donde:

FCM = Factor de condición múltiple

W = Peso del animal en g

Lp = Longitud patrón en cm

b = La pendiente de la regresión de la relación peso/longitud.

A = Altura del animal en cm

c = La pendiente de la regresión de la relación peso/altura

Las constantes "b" y "c" se obtuvieron del modelo de regresión múltiple del logaritmo natural de la longitud patrón (Lp) y la altura (A), con el programa SigmaStat 3.0, estas son las variables que indican la condición biológica del animal con respecto a las longitudes (largo-ancho) y donde el peso total del animal (W) es la variable de respuesta.

- b) Índice Hepatosomático (IHS), por medio de la ecuación (Rodríguez y Marañón, 1992).

$$\text{IHS} = (\text{Wh} / \text{Wt}) \times 100$$

Donde: Wh = Peso del hígado en g y Wt = Peso del ejemplar en g

- c) Índice Gonadosomático (IGS) por medio de la siguiente ecuación (Rossenblum *et al.*, 1987).

$$\text{IGS} = (\text{Wg} / \text{Wt}) \times 100$$

Donde: Wg = Peso de la gónada en g y Wt = Peso del ejemplar en g

Los datos obtenidos para cada respuesta (FCM, IH e IG) fueron sometidos a pruebas de normalidad y homocedasticidad, para posteriormente compararlos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), acoplada con la prueba de comparación múltiple Holm-Sidak (Sokal y Rolf, 2001), donde se realizaron comparaciones pareadas entre los tratamientos (S, U1, U2, U3, U4 y BNF).

En el caso de tener datos no paramétricos, como sucedió con los datos del Índice Gonadosomático, tuvieron que ser transformados a normales por medio de raíz cuadrada, ya que las varianzas del grupo fueron proporcionales a las medias, indicando que las varianzas incrementan al mismo tiempo que incrementan las medias (Zar, 1999).

6.8 Análisis comparativo de la evaluación de la toxicidad de los sedimentos.

Se realizó una categorización de las medias de tres biomarcadores (Ensayo Cometa, GST y Factor de condición múltiple), obteniéndose 6 diferentes niveles de importancia de las medias asignando un valor 1 a la media de menor valor y 6 a la de mayor valor. Esto permitió obtener, para cada tratamiento, un valor global integrado de efecto por la sumatoria de las respuestas, el cual teóricamente podría variar entre 4 y 24. Dichos valores, se utilizaron para determinar el gradiente de efecto, el cual fue contrastado por un análisis de similitud en el programa Primer 5 (2001), el cual por medio del análisis de similitud de Bray Curtis compara que tan cercanos se encuentran cada uno de los valores de las respuestas de un tratamiento con respecto a los demás, brindando los valores de similitud en porcentajes .

Debido a la influencia por actores biológicos (particularmente reproducción) sobre el índice gonadosomático y hepatosomático, éstos no se tomaron en cuenta dentro de esta categorización, sino que se evaluaron por separado.

7. Resultados.

7.1 Parámetros ambientales, Granulometría y Materia Orgánica.

En la Tabla 2, se muestran las características de temperatura, salinidad, análisis granulométricos y materia orgánica de los sedimentos muestreados.

Tabla 2. Caracterización de temperatura, salinidad, granulométrica y materia orgánica de sedimentos superficiales provenientes de los Esteros de Uriás y del Sábalo para mayo 21 del 2004.

Localidad	Temperatura (° C)	Salinidad (‰)	Arena (%)	Limos (%)	Arcilla (%)	Materia orgánica (%)
Uriás 1	29	41	2.66	97.35	0	1.91
Uriás 2	30	41	32.70	65.20	2.10	1.70
Uriás 3	29	36	88.49	8.63	2.88	5.15
Uriás 4	27	36	100	0	0	1.47
Sábalo	33	40	83.31	11.1	5.6	6.75

Dado que el muestreo fue realizado en época de sequía (diciembre-mayo) a finales de mayo, se observaron temperaturas superiores a la media anual de 28° C para el Estero de Uriás y 24.34 ° C para el Sábalo (García, 1973) y salinidades superiores a las marinas en los dos esteros.

El análisis granulométrico mostró una predominancia de arenas en los sedimentos muestreados, con excepción de U1 y U2, que están compuestas principalmente por limos en un 97 y 65 % respectivamente. Por otro lado, los sedimentos de Sábalo (S), Uriás 3 (U3) y Uriás 4 (U4), se encuentran compuestos en mayor proporción por arenas, en tanto que la arcilla dentro de todos los sedimentos representó una baja proporción del total de los sedimentos de 0-5.6 %. Los valores de materia orgánica (MO) son valores que van desde 1.70-6.75 %, según Macintosh (2002) corresponde a un contenido bajo (1-5 %), a moderado (5-20 %). En tanto que los valores más altos corresponden al Estero del Sábalo con 6.75 % y U3 con 5.15 %, los demás valores de MO para U1, U2 y U4 se encuentran en 1.47 y 1.91 %.

7.2 Fauna asociada a sedimentos.

Se realizó una evaluación *cualitativa* de la macrofauna asociada, en cada una de las estaciones de muestreo. Tabla 3 se muestra como U1, U2 y S tienen en sus sedimentos una mayor proporción de caracoles con un 64.52, 42.86 y 60 % respectivamente, seguido por la presencia de poliquetos, con excepción de Sábalo donde se encontró un mayor porcentaje de cangrejos con un 26.67 % y menos los poliquetos (13.33 %) . En el único tratamiento donde existió la presencia de bivalvos fue U1, en tanto, en las localidades U3 y U4, no se encontraron rastros de ningún ser vivo.

Tabla 3. Porcentajes de fauna asociada en las diferentes localidades de muestreo de los Estero de Urías y del Sábalo. Los datos entre paréntesis son el número real de los conteos.

Estación	Caracoles (%)	Bivalvos (%)	Poliquetos (%)	Cangrejos (%)	Total (%)
	64.52				
Urías 1	(59)	5.38 (4)	30.11 (27)	0	100
Urías 2	42.86 (2)	0	57.14 (3)	0	100
Urías 3	0	0	0	0	0
Urías 4	0	0	0	0	0
Sábalo	60.00 (8)	0	13.33 (1)	26.67 (3)	100

7.3 Mortalidad.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de sobrevivencia del cangrejo violinista *Uca princeps* en el bioensayo realizado a través de tres semanas, donde fueron expuestos a diferentes sedimentos contaminados. Los tratamientos donde no se presentaron mortalidades fueron U4 y BNF . Por el contrario, en S y U1 se registraron bajas mortalidades (5.55 % para los dos casos) y mientras que aquellos tratamientos que presentaron una mortalidad ligeramente mayor fueron U2 con 16.66 % y finalmente U3 con 27.77 %. La muerte de los organismos se dio a los inicios de la 2^a semana en cuatro de los tratamientos (U1, U2, U3 y S), por lo que se realizaron análisis para determinar el amonio total en agua y sedimento en cada tratamiento. A partir de los elevados valores de amonio presentes en agua y sedimento en todos los tratamientos (Tabla 5) se decidió realizar modificaciones al sistema de bioensayos.

Cabe mencionar que para el tratamiento U3, se obtuvieron 3 individuos sobrevivientes de 2 jvas, para poder evaluar su condición biológica (Anexo 5) antes de que perecieran. Por lo tanto al final del experimento, solamente quedaron 6 organismos sobrevivientes en el tratamiento U3.

El tratamiento U3 se caracterizó por la presencia de aletargamiento en los organismos y por desprender un aroma conocido como “huevo podrido” que indicaba condiciones anóxicas. Solamente cabe mencionar que en los tratamientos U4 y BNF, no existió mortalidad. Sin embargo, las observaciones diarias indicaron que los cangrejos mostraron una tendencia a enterrarse en vez de alimentarse o colocarse inmóviles en alguna esquina de la java, mientras en los demás tratamientos los cangrejos mostraron comportamientos alimenticios que podrían ser considerados como “normales”.

Tabla 4. Porcentaje de organismos muertos por semana/java/tratamiento durante el bioensayo con *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados.

Tratamientos	U1			U2			U3			U4			BNF			S				
No. de jvas	9	10	7	2	13	8	3	22	17	12	23	20	15	4	1	16	18	11	6	5
n inicial	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
1ª semana (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2ª semana (%)	16.7	0	0	16.7	33.3	0	0	33.3	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7
3ª semana (%)	16.7	0	0	16.7	33.3	0	0	33.3	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7
% promedio de mortalidad al final del bioensayo	5.55 %			16.66 %			27.77 %			0 %			0 %			5.55 %				

Al presentarse las mortalidades en la 2ª semana y tener un incremento de amonio en agua y sedimentos de todos los tratamientos (Tabla 5), se modificó el sistema de mareas, manteniendo el agua circulando durante toda la noche, en vez de mantener el nivel del agua arriba. A partir de esta modificación ya no se presentaron más mortalidades en ningún tratamiento.

Tabla 5 . Resultados de análisis de amonio en agua (Parson *et al.*, 1984) y sedimentos (Boyd, 1995 y Parsons *et al.*, 1984) de los tratamientos con *Uca princeps* al día 8 del experimento. S= *Sábalo*; U1= *Urfas 1*; U2= *Urfas 2*; U3= *Urfas 3*; U4= *Urfas 4*; BNF= β -*naftoflavona*; J=*Java*.

Tratamiento	Resultados			
	Agua (mg/L)		Sedimentos (g N/m ²)	
BNF	0.477	± 0.023	0.011	± 0.002
S	0.560	± 0.001	0.009	± 0.001
U1	0.693	± 0.117	0.009	± 0.001
U2	0.610	± 0.135	0.011	± 0.001
U3	1.095	± 0.021	0.017	± 0.003
U4	0.807	± 0.230	0.007	± 0.005
YANQUE	0.020	ND	ND	ND

En el tratamiento U3 se presentaron los valores más altos de amonio tanto en agua, como en sedimento con valores de 1.095 mg/L y 0.017 g N/m² respectivamente.

7.4 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre *Uca princeps* a nivel molecular: Genotoxicidad.

Una vez llevado a cabo el análisis del Ensayo cometa con hemocitos de la hemolinfa de cangrejos *Uca princeps*, se observaron las muestras al microscopio, obteniéndose los siguientes niveles y subniveles de daño (Fig. 8).

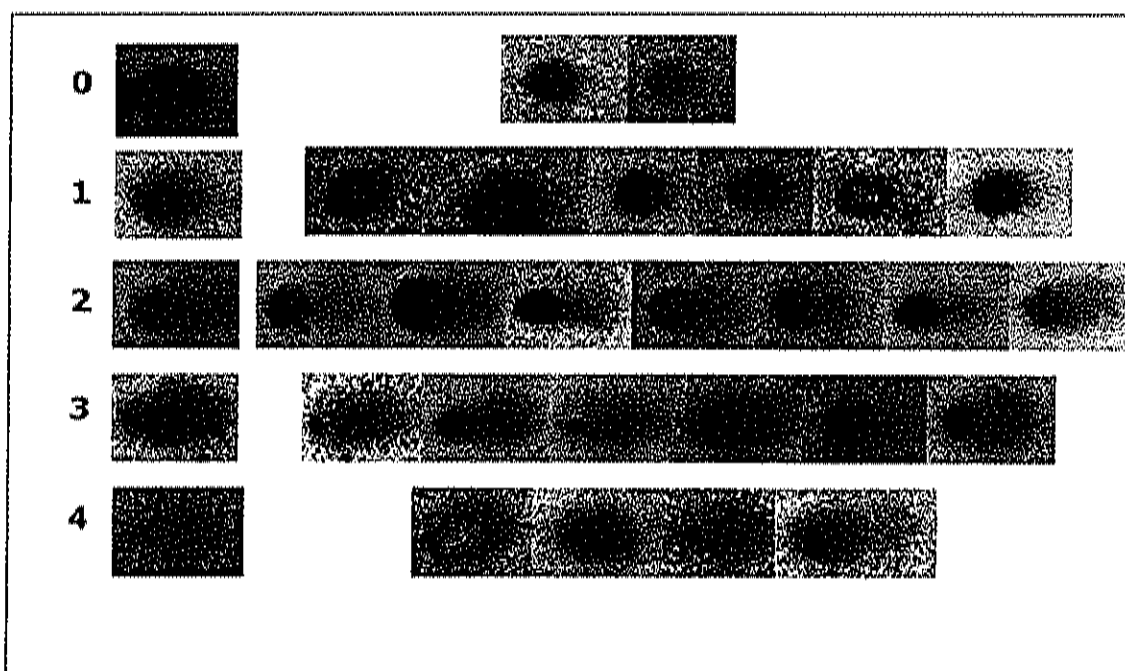


Figura 8. Caracterización de Hemocitos de *Uca princeps* después de haber sido sometidos al análisis del ensayo cometa. Imagen comparativa de los diferentes niveles de daño del ADN, donde el nivel 0 representa células sin daño, mientras que la clase 4 representa las células con mayor daño. Los cometas a la derecha representan variaciones dentro de cada nivel de daño. Fotos tomadas a 400 x.

La clasificación de los subniveles se realizó para abatir este problema de subjetividad y lograr una estandarización en los conteos de los niveles de cometas.

Asimismo el conteo visual fue realizado solamente por un observador previamente entrenado para distinguir los diferentes niveles de daño y de esta manera garantizar que los conteos fueran comparativos entre los distintos tratamientos.

Cabe mencionar que se realizaron conteos en el microscopio a un aumento de 100 x y 400 x, entre los cuales no se observaron diferencias significativas al someterlos a una

prueba de t de Student (SIGMASTAT ® 2003). Sin embargo, al realizar conteos con un aumento 100 x se puede perder un poco de resolución entre niveles de daño al abarcar un mayor campo de la muestra, por lo tanto, para poder tener una mejor precisión en el conteo, este se realizó finalmente con un aumento de 400 x.

La evaluación inicial del daño al ADN de los hemocitos, se presenta gráficamente como el porcentaje acumulado de daño por niveles de la sumatoria total de hemocitos cuantificados en cada tratamiento al tiempo 21 (Fig. 9), lo cual permitió comparar los tratamientos respecto al tratamiento de referencia (S) al tiempo 0.

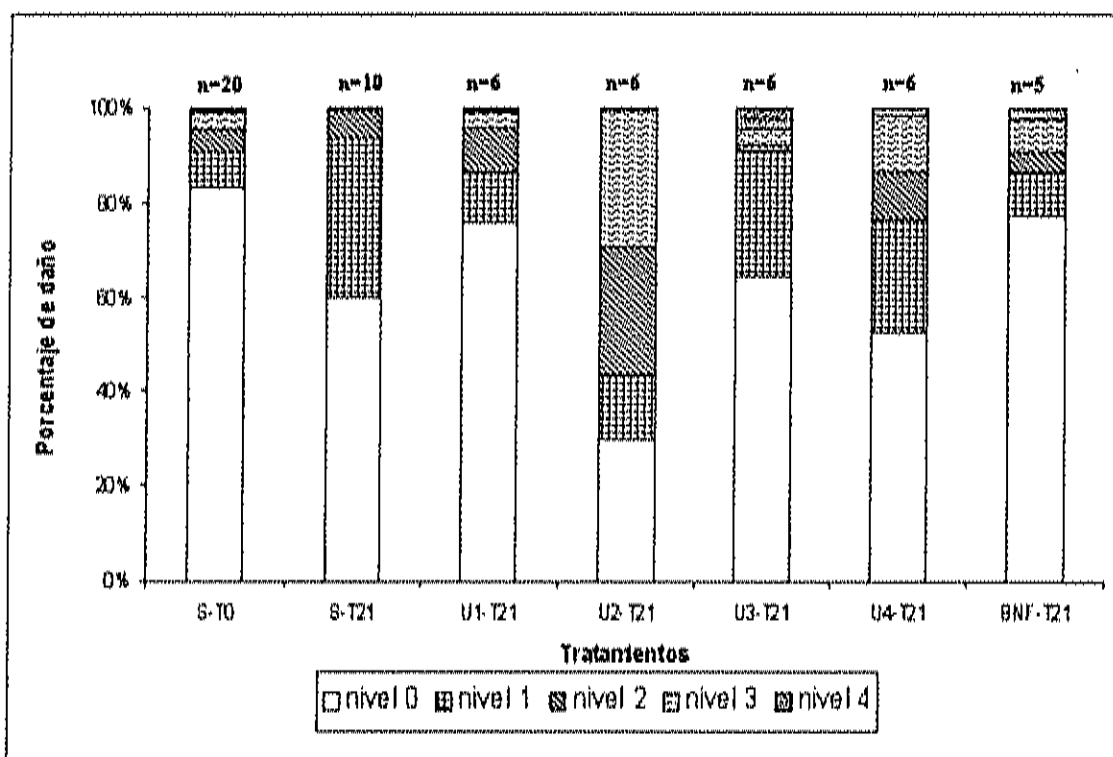


Figura 9. Daño al ADN en hemocitos de *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados, expresado en porcentajes acumulados. T0= día 0 y T21= día 21. S-Sábalo (Referencia); U1-Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF- β -naftoflavona (Control +). El nivel 0 se refiere a que no existe daño, mientras que el nivel 4 es un daño severo. Los números arriba de las barras representan el número de organismos analizados.

Dentro de estos resultados destaca el tratamiento U2 ya que tiene solamente un 30 % de células en nivel 0, mientras que el 70 % restante presentan niveles de daño desde 1 a 4, siendo los de mayor proporción el nivel 3 (29 %) y el nivel 2 (27 %). Consecutivamente,

U4 presenta un 52.22 % de células en nivel 0, mientras que 47.67 % restante se encuentra repartido de mayor a menor proporción los niveles restantes, mientras que para U3 se registró un 64.33 % de hemocitos en nivel 0.

Los demás tratamientos resultaron con menores niveles de daño, correspondiendo de forma descendente BNF<U1<S-T0<S-T21.

Tomando en cuenta la información anterior, se procedió a calcular el nivel de daño global. En la Fig. 10 se muestran graficados los resultados de grupos homogéneos en Unidades Arbitrarias para comparar lagenotoxicidad global entre tratamientos.

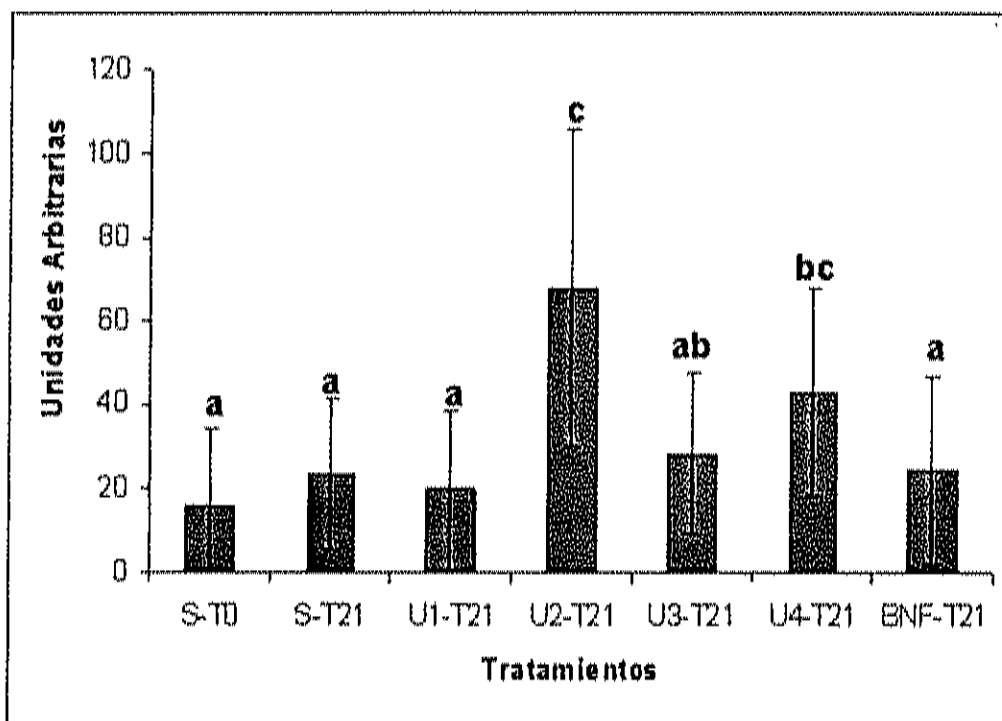


Figura 10. Nivel de daño al ADN, expresado en Unidades Arbitrarias (UA), en hemocitos de *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados, en el T0=día 0 y T21=día 21. S-Sábalo (Referencia); U1-Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF- β -naftoflavona (Control +). La escala de daño va del 0-200, siendo 0 sin daño y 200 daño severo. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas.

Los resultados de Unidades Arbitrarias (UA) confirman que U2 es el tratamiento más afectado ($P < 0.001$) con una media de 67.83 UA seguido de U4 con 43.16 UA, U3 con

28.33 UA y BNF, S-T21, U1,UA y S-T0 con valores en forma descendiente entre 24.2 a 15.7 de UA.

Debido a que con las UAs inevitablemente se "pierde" información al sintetizar en un solo valor los datos de los diferentes niveles daño, también se exploró la idea de poder utilizar directamente los datos de los conteos, para conocer si había alguna diferencia significativa entre el análisis comúnmente utilizado y uno alternativo como el análisis de χ^2 con una tabla de contingencia.

En este análisis se comparó cada tratamiento contra el sedimento de referencia, donde se utilizaron los valores de los conteos de la sumatoria total de los hemocitos por categorización de sus niveles, de todos los tratamientos al final del experimento (Tabla6). Este análisis confirmó que los sedimentos de U2 presentaron el mayor efecto genotóxico, aunque a diferencia del análisis de UAs, ubicó al tratamiento BNF en segundo nivel de genotoxicidad, siguiéndoles en valores descendientes U4, U1 y U3.

Tabla 6. Valores obtenidos en una tabla de contingencia de χ^2 comparando cada tratamiento contra el sedimento de referencia. Valor en tablas para 4 grados de libertad y un nivel de significancia $\alpha=0.05$ por ciento, obtenemos que $P(9.49 < \chi^2 < \infty) = 0.05$ y la zona de rechazo de la hipótesis nula: $\chi^2 \geq 9.49$. El * significa diferencias significativas.

Tratamientos	χ^2
Urías 1-T21	59.99 *
Urías 2-T21	208.73 *
Urías 3-T21	45.5 *
Urías 4-T21	72.14 *
BNF-T21	88.61 *

7.5 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre *Uca princeps* a nivel bioquímico: actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa.

En los análisis realizados para este estudio no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.315$ ∴ $P>0.001$), entre los tratamientos, a pesar de que se observa una leve tendencia al aumento de la actividad de GST en todos los tratamientos en comparación con el tratamiento S-T0. Se obtuvieron valores entre 157.48 y 197.64 nmol/min/mg proteína (Figura 11), El valor de Sábalo al tiempo 0 coinciden con los valores encontrados como valor basal (156.45-165.87 nmol/min/mg de proteína) en análisis preliminares en organismos expuestos a sedimentos del sitio de referencia (S) (Anexo 5).

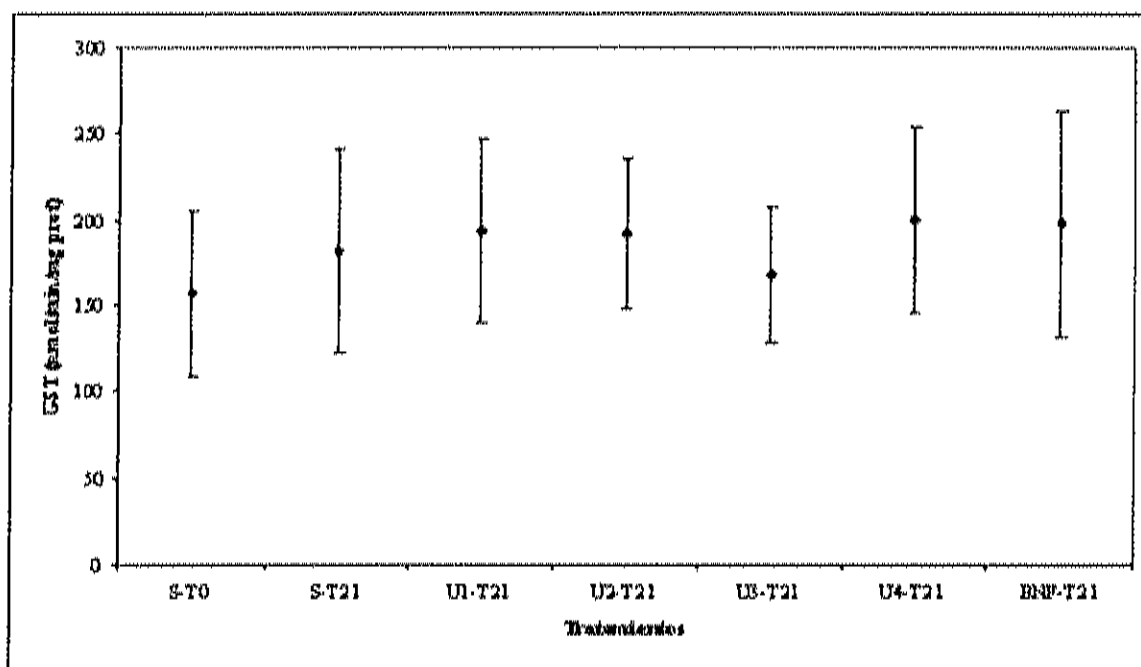


Figura 11. Actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa en hepatopáncreas de *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados, al T0=día 0 y al T21=día 21. Sábalo= S (Referencia); U1- Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF-β-nafto flavona (Control +).

7.6 Evaluación de la toxicidad de los sedimentos sobre *Uca princeps* a nivel organismo: a) Factor de condición múltiple, b) Índice hepatosomático e c) Índice gonadosomático.

7.6.1 Factor de Condición Múltiple.

Se obtuvo como resultado un incremento significativo ($P=0.003$; $P<0.001$) en el Factor de Condición Múltiple entre todos los tratamientos. En el sedimento de referencia al T0 y T21 se encontró un FCM de 5.29 y 5.94 respectivamente, sugiriendo que a través de 21 días de confinamiento los organismos se mantuvieron relativamente estables, mientras que en los demás tratamientos existió un aumento mucho más notable llegando a valores desde 6.34 a 7.85, encontrándose el menor en U4 y el mayor en U3 (Figura 12).

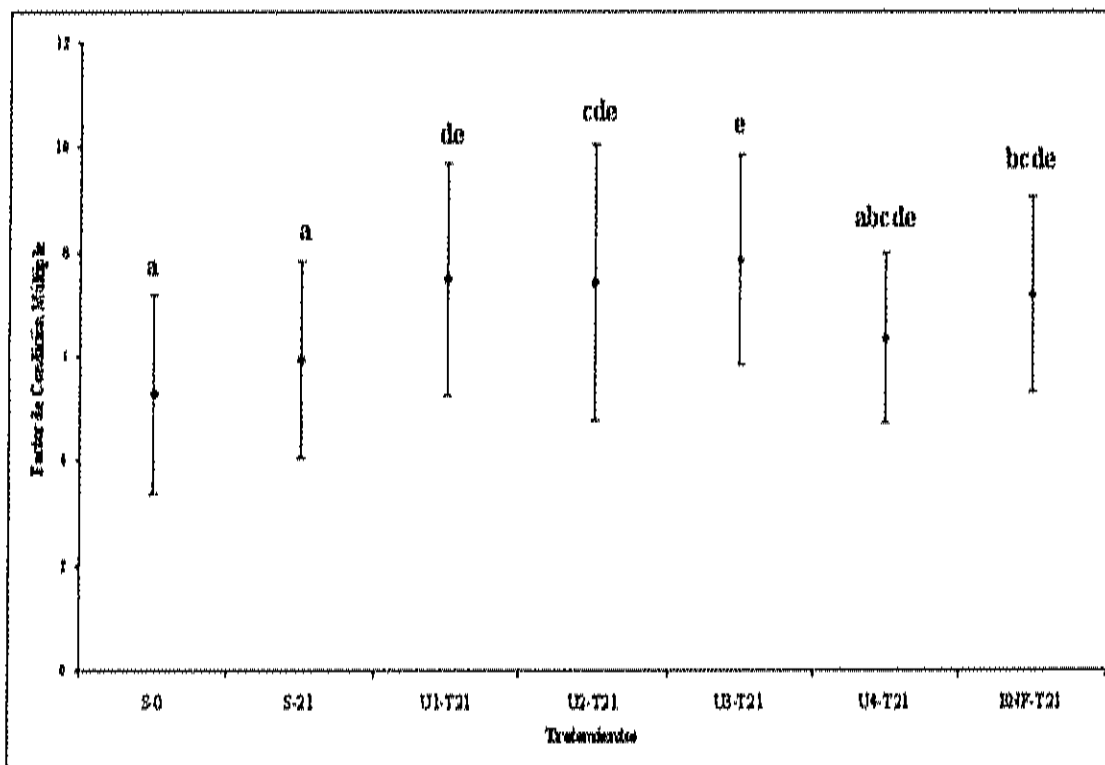


Figura 12. Factor de condición múltiple de *Uca princeps* expuesto a sedimentos contaminados, al T0=día 0 y al T21= día 21, Sábalo= S (Referencia); U1-Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF- β -naftoflavona (Control +). Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas.

7.6.2 Índice Hepatosomático.

Se obtuvo como resultado un incremento significativo ($P \leq 0.001$) del índice hepatosomático (IH) entre todos los tratamientos. Este efecto es muy evidente en los valores de S-T0 con 2.09 y S-T21 con 5.43. En los demás tratamientos se registró un aumento menor al de S-T21 con valores entre 3.85-5.15, encontrándose el menor valor en U3 y el mayor aparte de S-T21 en U4 (Fig.13).

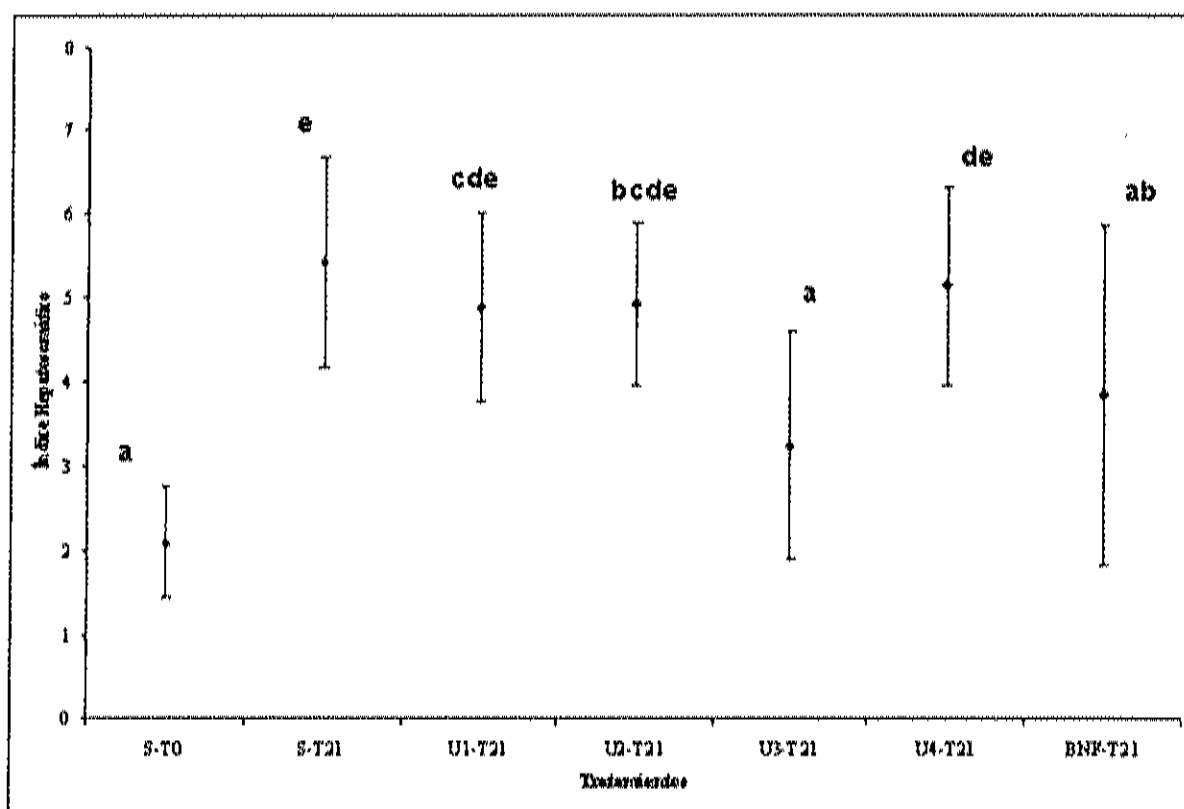


Figura 13. Índice Hepatosomático en *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados al T0=día 0 y al T21=día 21. Sábalo= S (Referencia); U1-Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF- β -naftoflavona (Control +). Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas.

7.6.3 Índice Gonadosomático.

En la Fig. 14 se muestran los resultados del índice gonadosomático (IG) encontrado en *Uca princeps* después de una exposición de 21 días a sedimentos provenientes del estero de Urias y del estero del Sábalo, donde se observa como existe una tendencia al aumento del porcentaje obtenido, mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) para casi todos los tratamientos con respecto al control al tiempo 0 (S-T0), a excepción de U3 y BNF, los cuales no logran distinguirse de S-T0.

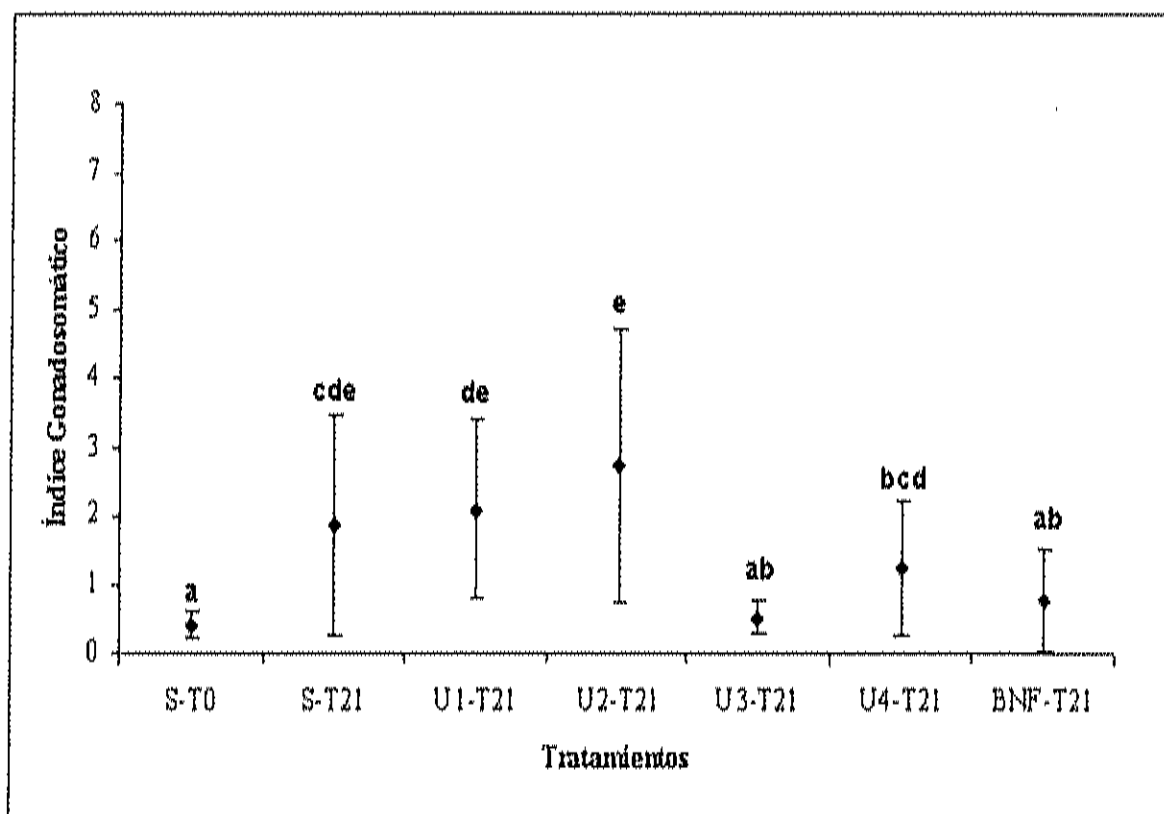


Figura 14. Índice Gonadosomático en *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados al T0=día 0 y al T21=día 21. Sábalo=S (Referencia); U1-Urias 1; U2-Urias 2; U3-Urias 3; U4- Urias 4; BNF-β-naftoflavona (Control +). Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas.

7.7 Análisis comparativo de la evaluación de la toxicidad de los sedimentos.

En la Tabla 7 se puede observar la categorización de respuestas por cada estación de muestreo de sedimentos del estero de Urías y Sábalo.

Tabla 7. Categorización e integración de las pruebas de Ensayo Cometa (EC), actividad de la Glutación-S-Transferasa (GST), del Factor de Condición Múltiple (FCM) y Mortalidad (M) para distintas estaciones de muestreo. Sábalo= S (Referencia); U1-Urías 1; U2-Urías 2; U3-Urías 3; U4- Urías 4; BNF- β -nafto flavona (Control +).

Respuestas	Tratamientos					
	S	U1	U2	U3	U4	BNF
EC	2	1	6	4	5	3
GST	2	4	3	1	6	5
FCM	1	5	4	6	2	3
M	3.5	3.5	5	6	1.5	1.5
Total	8.5	13.5	18	17	14.5	12.5

La integración de las respuestas indican que U2 y U3 mostraron los mayores valores de efecto global (18 y 17 respectivamente), seguidos por U4, U1 y β -nafto flavona con valores desde 12.5-14.5 y finalmente Sábalo con tan solo un valor de 8.5 con un grado medio-bajo de efecto de las respuestas.

Por último el análisis de similitud refleja en gran parte como se agrupan los tratamientos entre ellos (Fig. 15), sin embargo presenta algunas variantes, ya que coloca el tratamiento U1 junto al grupo que se encuentra más alejado del tratamiento de referencia (S) , correspondiendo a los tratamientos U2 y U3 , en vez de ubicarla cerca de Sábalo y coloca un tercer grupo conformado por los tratamientos U4 y BNF como el grupo más cercano al tratamiento de referencia. Por último el tratamiento de referencia (Sábalo) sigue diferenciándose de todos los demás tratamientos.

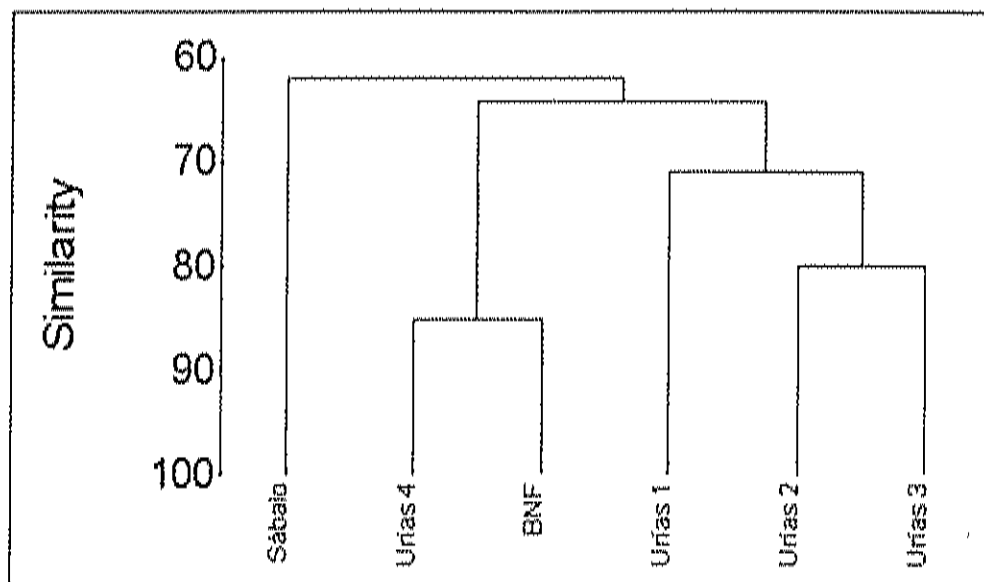


Figura 15. Grupos de similitud de los tratamientos con respecto a los niveles de importancia de cada una de las respuestas en su conjunto, en los cangrejos violinistas *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados por 21 días; S= Sábalo; U1=Urías 1; U2=Urías 2; U3=Urías 3; U4=Urías 4; BNF= β -naftoflavona.

8. Discusión.

En el presente trabajo los organismos expuestos a sedimentos de distintas estaciones de se evaluaron mediante un conjunto de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica, representados por: *a) nivel molecular-* estudio de la genotoxicidad en hemolinfa por medio del ensayo cometa (EC), prueba también conocida como electroforesis en gel de una sola célula, caracterizada por ser simple, capaz de estimar el aumento a nivel de fracciones rotas en la molécula de ADN en células eucarióticas individuales, resultado de exposiciones a sustancias químicas y a radiaciones UV (Steinert *et al.*, 1998; Collins, 2004); *b) nivel bioquímico-* actividad de la enzima Glutación-S-Transferasa (GST) en hepatopáncreas, la cual es utilizada como un biomarcador de exposición a xenobióticos en peces e invertebrados acuáticos (Ishizuka *et al.*, 1998; Saravana y Geraldine, 2001; McLoughlin *et al.*, 2000; Le Pennec y Le Pennec, 2003; Elumalai *et al.*, 2000 y Escartín y Porte, 1996) y *c) nivel organismo-* Factor de condición múltiple (FCM) describe la condición general de salud del organismo, el cual se estima comparando el peso individual del organismo en relación a su longitud (Bolger y Connolly, 1989), mientras que la mortalidad (M) es una respuesta que puede ser sensible a las condiciones ambientales y que tiene implicaciones directas a nivel poblacional (EPA, 1998). Por otro lado, también se evaluaron los índices hepatosomático (IH) y gonadosomático (IG) los cuales, además de responder al efecto de estresores, también pueden ser fuertemente influenciados por procesos fisiológicos relacionados con la muda, alimentación y/o reproducción. Es por esto que tanto el IH y el IG no se incluyeron directamente dentro del análisis integrativo de todos los biomarcadores. No obstante la falta de precisión de su respuesta, la observación de estos índices sí proporciona evidencias de efectos potenciales sobre la condición biológica de los organismos expuestos a estresores ambientales con relativa facilidad y por lo tanto presentan mayor relevancia ecológica (Malthy *et al.*, 2001).

Considerando los aspectos anteriormente mencionados, en el presente estudio los biomarcadores empleados en el organismo prueba, *Uca princeps* permitieron obtener un gradiente de efecto de respuesta que fue posible asociar a la posible influencia de

actividades antropogénicas sobre los sedimentos muestreados en el Estero de Uriás. Esta comparación fue posible por el hecho de que los organismos de prueba provinieron de una población homogénea del Estero del Sábalo (presumiblemente menos impactada), los cuales fueron expuestos a sedimentos provenientes de distintas estaciones dentro del Estero de Uriás. Estas estaciones fueron seleccionadas con base a las actividades antropogénicas que se presentan en el sistema, tratando de cubrir todo el posible espectro de escenarios de exposición. Es muy importante mencionar que en ecotoxicología, el estudio de los biomarcadores es una primera aproximación para completar los análisis químicos de contaminantes (Schlenk, 1999). El análisis integrativo de los biomarcadores realizado en este trabajo, permitió establecer un gradiente de efecto en relación a las estaciones de muestreo, el cuál en términos generales puede ser expresado de la siguiente manera:

$$S \lll U1 < U4 \ll U3 < U2$$

Donde: \lll muy diferente; \ll diferencia media; $<$ poca diferencia

En el anterior gradiente se evidencia claramente que las respuestas en los organismos expuestos a sedimentos del Estero del Sábalo (área de referencia) son muy diferentes con respecto las presentadas por los organismos expuestos a sedimentos del Estero de Uriás (área contaminada). En este sentido, las respuestas observadas en los biomarcadores evaluados en el *Estero del Sábalo* presentaron consistentemente los menores niveles de efecto con respecto a todas las localidades del Estero de Uriás, a excepción de los índices hepatosomático y gonadosomático. Lo anterior, probablemente es representativo de que finalmente el Estero del Sábalo es el hábitat natural de estos organismos. Adicionalmente, esta localidad se caracterizó por presentar los valores más altos de materia orgánica (MO) y un elevado porcentaje de arenas dentro de todos los tratamientos, lo cual es reflejo de los aportes de MO del bosque de manglar que rodea el área muestreada, presentándose probablemente una tasa baja de descomposición (De la Lanza, 1986) con una baja tasa de sedimentación (Gray, 1981). Asimismo, esta estación presentó valores relativamente altos

en el número de organismos de la fauna asociada con respecto a las demás localidades, predominando los caracoles, lo cual apoya la idea que el área está menos impactada.

Consecuentemente a esta idea, los organismos expuestos durante 21 días a sedimentos del Estero del Sábalo mostraron un aparente buen estado de salud con respecto a los organismos al tiempo cero, notándose inclusive un aumento del Factor de condición múltiple (FCM), especialmente evidenciado por el incremento en el hepatopáncreas y en las gónadas, lo cual parece corresponder con el hecho de que estos cangrejos mostraron un comportamiento alimenticio aparentemente adecuado. Más aún, el desarrollo del hepatopáncreas y gónadas sugiere que los organismos canalizaron la energía asimilada por medio de la alimentación durante los 21 días de exposición hacia la reproducción, sin activar las demás respuestas, lo cual indica que los sedimentos del Estero del Sábalo se encuentran poco impactados mientras que el experimento se llevó a cabo durante la época reproductiva de esa especie (observación personal). La misma temporada de reproducción se ha reportado en Miami, Florida para el género *Uca pugilator* (Williams y Duke, 1979).

Por otro lado el gradiente de efecto encontrado dentro del Estero de Urías ubicó a U1 (Manglar y Granja camaronícola) como la localidad de menor impacto antropogénico. Esto puede deberse por ser esta la localidad más alejada de las fuentes puntuales de contaminación (descargas urbanas, industriales, termoeléctrica, entre otras) y ser un área rodeada de manglar ubicada en el interior del estero. Cabe resaltar que los organismos expuestos a este sedimento mostraron un efecto bajo en la respuesta genotóxica (Ensayo cometa). En este sentido, estos organismos de prueba pudieron haber estado en contacto con sustancias genotóxicas y radiaciones de UV leves previo a su captura o bien el nivel de daño observado es el nivel basal de alteración en el ADN de las células sanguíneas. Asimismo, el tratamiento U1 registró niveles medios para GST y niveles medio a altos en FCM, IH e IG, lo cual en su conjunto indica que posiblemente existen niveles relativamente bajos de contaminantes en esta estación, o que a pesar de estar presentes, permiten el crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos. Lo anterior coincide con la lejanía de esta U1 de la actividad antropogénica y corrobora lo que Salgado (2002)

reporta, que en un radio ≥ 2 Km de la granja camaronícola "San Jorge" (donde se ubica U1), no se observa ningún efecto de sus descargas, concordando además con el relativo alto número de organismos asociados al sedimento que se detectó en dicha estación de muestreo.

En este sentido, la siguiente localidad afectada en un grado mayor de efecto con respecto a U1 es U4 (Estero del Infiernillo). Esta estación presentó valores relativamente bajos de materia orgánica, un desarrollo intermedio del hepatopáncreas y de las gónadas, mientras que se obtuvieron valores altos en las respuestas del EC y GST. Lo anterior probablemente se deba a que U4 se ubica en el canal de navegación del Estero del Infiernillo, el cual es una zona que funciona como cuenca receptora de material particulado, influido principalmente por descargas urbanas, muchas de ellas clandestinas, que desembocan directamente en el arroyo Jabalíes y en el mismo Estero del Infiernillo (Jumapan, 2004; Osuna-López, *et al.*, 1997), las cuales pueden presentar una composición variable de contaminantes con potencial genotóxico como metales pesados e hidrocarburos (Wong, 1988; Van den Berg *et al.*, 1995; Akcha *et al.*, 2003), mientras que también pueden activar la respuesta a nivel bioquímico. Los resultados probablemente reflejen lo que anteriormente se ha reportado por Osuna-López *et al.*, (1997) de esta estación donde se han presentado contenidos importantes de metales pesados, en general concentraciones mayores que en el Estero de Urias de Cu, Co, Cd, Cr, Ni, Fe, Pb y Zn. Asimismo, se ha reportado que aguas urbanas con altos contenidos de heces fecales pueden contener altas concentraciones de compuestos n-nitrosos y amins aromáticas, las cuales pueden ser potentes genotoxinas (White y Rasmussen, 1998).

Por otro lado, se encontró que U4 es el único tratamiento *no* se observó un incremento en el FCM entre el día cero y el día 21. Esto sugiere que efectivamente los organismos no estaban acumulando reservas al verse en su conducta una disminución en el consumo de alimento. Al respecto, diversas relaciones entre el FCM y contaminantes se han reportado en la literatura. Por ejemplo, Grandby y Spliid, (1995) reportan que *Mytilus edulis*, presentó una correlación negativa entre el Factor de Condición y las concentraciones de

HAPs. De manera similar, se observaron decrementos en el Factor de Condición de *Mya arenaria* en un bionensayo bajo condiciones de laboratorio a concentraciones de tributil estaño de 50-1000 ng l⁻¹ (Kure y Depledge, 1994). Sin embargo, un efecto contrario al observado en *Uca princeps*, asumiendo una alta concentración de metales pesados en el Estero del Infiernillo (U4) como lo menciona Osuna-López *et al.*, (1997) se presentó con los tejidos del bivalvo *Potamocorbula amurensis*, donde se observó un incremento en el FCM conforme aumentó la concentración de metales pesados (Brown y Luoma, 1995).

La localidad que sigue en el gradiente de efecto observado es U3 (a un lado de la industria sardinera y astilleros). Los organismos expuestos al sedimento de U3 mostraron un cuadro de respuestas variado, llamando la atención especialmente un elevado porcentaje de mortalidad respecto a los demás tratamientos. Adicionalmente se presentó un nivel medio alto en la respuesta genotóxica, un nivel bajo en la actividad de la enzima GST y un nivel alto para el FCM. Por otro lado, el índice hepatosomático sugiere una afectación del hepatopáncreas, mientras que el índice gonadosomático resultó el más bajo de todos los tratamientos de Urías. A pesar de que los sedimentos de esta área son predominantemente arenas, se encontraron altos valores de materia orgánica (MO) reflejando la influencia de la industria sardinera que se encuentra a un costado. Además, al ser activada la prueba genotóxica, los animales en ese sedimento pudieran haber estado afectados directamente por sustancias genotóxicas, tales como como HAPs, BPC's, metales pesados (Akcha, *et al.*, 2003; Van den Berg *et al.*, 1995; Wong, 1988), o inclusive metales como Pb y Cr o compuestos anticrustantes (p. ej. Tributil estaño) procedentes de las actividades de los astilleros (desechos de pinturas y mantenimiento de barcos). Por todo lo anterior, el efecto que alguno o varios contaminantes pudieran haber ejercido sobre el hepatopáncreas (Robinson y Dillaman, 1985) puede, a su vez, ser la explicación de la inhibición en la maduración de las hembras. Aunado a esto cabe mencionar que el área de U3 no mostró evidencia alguna de tener seres vivos, otros que *U. princeps*, además que presentó el segundo valor más alto en materia orgánica (MO) después de S, indicativo que son sedimentos con un alto potencial de captar contaminantes persistentes (Kennish,

1997), tales como hidrocarburos (que pueden ser derramados por un área de mantenimiento de barcos), así como el esparcimiento en el aire y posteriormente en el agua de metales pesados por las pinturas utilizadas y las sustancias biocidas que impiden que se adhieran organismos a los barcos. Según lo reportado por Méndez (2002), el área donde se localiza U3 se clasifica como un lugar muy contaminado por presentar altos niveles de enriquecimiento orgánico y la presencia de otros estresores ambientales (salinidad, pH, temperatura, granulometría, etc.) que inducen una baja dominancia de anélidos como el poliqueto *Capitella capitata*, *Streblospio benedicto* y otros oligoquetos. Asimismo, el sedimento de este tratamiento presentó manchones de color blanco filamentosos y presentó el olor característico del ácido sulfídrico, sugiriendo condiciones anóxicas extremas (Gray, 1981), además se detectaron niveles relativamente altos de amonio en agua y sedimentos. Esto puede deberse a que la MO desechada por la industria sardinera es rica en proteínas (Raa y Strom, 1982) y por ende en nitrógeno. Por lo tanto, al existir un área eutrofizada por materia orgánica, existe una alta demanda de oxígeno por los microorganismos (Salgado, 2002) para poder procesar los productos entrantes y adicionalmente las condiciones ambientales se vuelven severas, al haber un aumento constante de amonio por parte del desecho del metabolismo de los invertebrados (Le Moullac y Haffner). De tal manera, un descenso en el oxígeno y en especial un aumento en el amonio, pueden ser letales para algunos organismos, sobre todo en los organismos acuáticos, pues se conoce que el amonio es tóxico para ellos en un amplio intervalo de concentraciones (Sarda y Burton, 1995).

La localidad U2 (a un lado de la Termoeléctrica) obtuvo un gradiente de efecto cercano a U3, siendo la estación que mostró tener los mayores niveles de daño en la mayoría de sus respuestas respecto a las demás estaciones de Urías. Los organismos expuestos a este sedimento presentaron valores medios a altos en el GST, FCM, IH e IG, pero mostraron un máximo valor de genotoxicidad. Aunque estos sedimentos presentaron niveles bajos de materia orgánica que dificultan la captación de contaminantes persistentes, la alta proporción de limos presentes en el sedimento le confiere suavidad y poca permeabilidad por el tamaño de grano tan pequeño permitiendo entonces por esta razón una mayor

captación de sustancias contaminantes en el sedimento (Gray, 1986). Lo anterior permite que exista una mayor abundancia de organismos presente en los sedimentos, haciendo más efectiva la descomposición de la materia orgánica, encontrándose la dominancia de algunos organismos como caracoles, poliquetos y bivalvos, dentro de su fauna asociada. Lo anterior podría ser por su cercanía a la termoeléctrica que emite contaminantes a partir de la combustión de hidrocarburos (Dióxido de azufre-SO₂, Óxidos de nitrógeno-NO₂, Mercurio-Hg, Dióxido de carbono-CO₂), algunos de ellos con propiedades genotóxicas (Avishai *et al.*, 2002; Miller y Van Atten, 2004).

A partir de los resultados de la prueba de genotoxicidad se presume la presencia de contaminantes genotóxicos como HAPs, BPCs que pueden causar fragmentación del ADN (Van den Berg *et al.*, 1995; Akcha *et al.*, 2003). De igual forma, los metales pesados (Cr, Hg, Ca, Co, Mg y Pb) tienden a unirse a bases residuales del ADN que pueden provocar mutaciones al alterar las estructuras primarias y secundarias del mismo (Wong, 1988). Adicionalmente, esos mismos contaminantes tienen tendencia a ser lipofílicos (Hodgson y Levi, 1987) lo que sugiere una mayor vulnerabilidad si los animales consumieron alimento e incrementa sus reservas energéticas en el hepatopáncreas (lípidos), para posteriormente transferirlos a la gónada. En este sentido, el estudio de Robinson y Dillaman (1985) quienes reportan acumulación de naftaleno en células que almacenan lípidos y/o que se encuentran en mayor proporción en las membranas celulares en el hepatopáncreas de *Uca minax*. Lo anterior, podría afectar consecuentemente el desempeño fisiológico del organismo, reflejándose posteriormente en la disminución o crecimiento indiscriminado de algún órgano, como se observó en U3 y BNF. Por todo lo anterior, principalmente por el daño genotóxico presentado, es posible cuestionar el bienestar de la progenie de los organismos expuestos, a pesar de observarse un incremento en el índice gonadosomático.

El sedimento con *BNF* presentó las mismas características granulométricas y de materia orgánica que S donde predominaron las arenas y se presentó un valor alto de MO, esto es debido a que son sedimentos del estero de referencia al cual se le incorporó el contaminante.

Los organismos expuestos a este BNF mostraron una tendencia similar de daño medio-bajo en el ensayo cometa así como en U1, así como un valor alto en el factor de condición múltiple e índice hepatosomático. A pesar del aumento en el hepatopáncreas, BNF fue el tratamiento adicional a U3 donde existió un escaso incremento en las gónadas. Esto posiblemente se deba a que es un hidrocarburo poliaromático, lo que le confiere la característica de ser acumulado en el hepatopáncreas (Lee *et al.*, 1976) influyendo en su inflamación, ya que éste trata de excretar el hidrocarburo del organismo una vez que se presenta la biotransformación de reactivos entrantes al organismo es activada la fase I y posteriormente la fase II, donde puede actuar el grupo de enzimas de la GST (Van den Berg *et al.*, 1995). La activación de este grupo de enzimas puede ser percibido a través del incremento de su presencia en el hepatopáncreas, por lo tanto, a pesar de que esta respuesta bioquímica no presentó una diferencia significativa entre los tratamientos, en el sedimento con BNF se observó el mayor grado de efecto, en este sentido se puede suponer que los organismos trataron de excretar el hidrocarburo entrante, como lo observado en el análisis preliminar con este hidrocarburo induciéndose la actividad de la GST a 5 días de exposición (Anexo 5), las razones por las cuales se dio este evento se explicarán más adelante. Adicionalmente es importante notar que BNF y U1 tienen proporciones de daños celulares muy similares observándose una alta proporción de células no dañadas. Esto sugiere que el daño genético provocado por éste hidrocarburo no es muy severo, ya sea por baja biodisponibilidad dado a que se incorporó en un sedimento rico en materia orgánica (proveniente del Estero del Sábalo) o por una lenta acumulación dentro del organismo.

Posterior al análisis comparativo de las distintas respuestas respecto a la procedencia de los sedimentos de prueba, se pueden todavía realizar algunas precisiones del comportamiento de cada respuesta con el objetivo de discriminar la posible influencia de agentes antropogénicos dentro de las estaciones de muestreo. En este sentido, el biomarcador a nivel molecular en el Ensayo cometa permitió tener un análisis rápido y aparentemente sensible del daño de hemocitos en el cangrejo violinista *Uca princeps*, encontrándose diferentes niveles y subniveles de daño dentro de las células. Los análisis

que se exploraron como opciones nuevas a los establecidos de grupos homogéneos, proporcionaron información diferente al ser comparado el análisis de unidades arbitrarias con la prueba de χ^2 en una tabla de contingencia. A pesar de las diferencias observadas, el ensayo cometa fue capaz de discriminar entre los valores del Estero del Sábalo y el Estero de Urías, observándose para éste último que U2 sobresale en la prueba de genotoxicidad pero por el contrario el análisis de similitud si es comparable con el análisis de grupos homogéneos.

Respecto al biomarcador a nivel bioquímico, es importante mencionar que, a pesar de que la inducción del grupo de enzimas de la GST en vertebrados ya ha sido estudiada más a fondo, en invertebrados acuáticos, específicamente en crustáceos, aún se desconoce el mecanismo de inducción. No obstante, se sabe que los crustáceos pueden biotransformar hidrocarburos y xenobióticos más rápido que los moluscos (Livingstone, 1992). En el caso del género *Uca sp.* se encontraron pocos trabajos con los cuales comparar los resultados obtenidos, por lo que se compararán con otros crustáceos.

El valor obtenido en el sedimento de referencia de la actividad del grupo de enzimas de la GST al día 21 fue de 157.48 nmol/min/mg, el cual se encuentra muy cercano al reportado por Elumalai *et al.*, (2002), de 185.95 ± 15.58 nmol/min/mg de proteína, obtenido en hembras de *Carcinus maenas*. Por otro lado, existen varias razones que pueden explicar por qué no se observaron diferencias significativa en la actividad de la enzima GST en los tratamientos: a) Una actividad temprana en los primeros días de exposición. Esto es debido a que en el presente estudio sí se observó una clara activación de la GST en el experimento preliminar de 5 días, donde se pudo apreciar un incremento, respecto al sedimento de referencia (S), de aproximadamente 290% en organismos expuestos a 412 μM de BNF. Esto concuerda con lo encontrado por McLoughlin *et al.* (2000) en el anfípodo *Gammarus pulex*, donde la actividad de la GST se indujo un pico de actividad dentro de las 24-48h de exposición a diferentes concentraciones de lindano (plaguicida-organoclorado). De manera similar, Le Pennec y Le Pennec (2003) reportaron una activación de la GST a las 24 h en la escalopa *Pecten maximus* expuesta a tributil

estaño, etil metano sulfonato (EMS) y una fracción soluble del petróleo; mientras que Saravana y Geraldine (2001) reportaron un aumento paulatino de la actividad de la GST, en una prueba de 1, 8, 15 y 21 días de exposición a diferentes concentraciones de endosulfán (plaguicida-organoclorado) con langostino *Macrobrachium malcolmsonii*, presentándose los niveles más elevados a los 8 días de exposición. Asimismo, Gowland *et al.*, (2002) reportaron un aumento progresivo en la actividad de la GST dentro de las 24-72 h en *Carcinus maenas* expuesto a 500 ng/l de cipermetrina (piretroide). b) Regreso de la actividad de la enzima GST a su estado inicial. Dado que, en el experimento definitivo a 21 días, la GST se determinó hasta el final de la exposición, esto pudo haber ocasionado que la actividad enzimática regresara a su *estado basal*. Lo anterior podría explicar la falta de diferencias entre la GST del sedimento de Sábalo respecto a los demás tratamientos, incluyendo el control positivo tratado con BNF. La posible explicación es que los animales pudieron haber detoxificado los contaminantes inductores de dicha actividad. Un comportamiento similar ha sido reportado por lo encontrado en otra parte del experimento por Gowland *et al.*, (2002), donde inyectaron cangrejos, *Carcinus maenas*, con 10 ng de cipermetrina, obteniendo un pico de actividad de la enzima GST a las 24 h, para posteriormente registrar niveles basales a las 38 h.

Respecto al nivel organismo, en el Factor de condición múltiple se debe tener particular cuidado de que puede ser influenciado por el sedimento encontrado en el tracto digestivo e incorporación de agua branquial, por lo que se corroboró su información con la de los índices hepatosomáticos y gonadosomáticos, reflejando la preparación del evento reproductivo. Un evento similar de llenado estomacal fue encontrado en el Estero de Urías con una investigación reciente en la lisa *Mugil curema* donde se obtuvieron en promedio valores de FCM para la lisa en los esteros de Urías de 2.09 y Teacapán 1.9 (estero de referencia), explicando que el aumento de FCM observado, fue más alto en el estero de Urías (estero contaminado) debido a la influencia del llenado estomacal, a comparación del estero de Teacapán (Ríos-Sicairos, 2004). Este mismo problema se reporta en otra investigación por Couillard *et al.* (1999), en donde se encuentra un factor

de condición menor en los sitios de referencia en *Microgadus tomcod*, bacalao del atlántico, con respecto a los sitios contaminados donde se reciben efluentes de procesadoras de papel (Couillard *et al.*, 1999). En el presente estudio no se observó una alteración marcada del FCM debido a sedimento en el tracto digestivo, a pesar de observar que los organismos si contenían sedimento en su tracto.

Los índices hepatosomático y gonadosomático, mostraron en general un aumento marcado en la mayoría de los tratamientos respecto al tiempo cero, lo cual corrobora que los organismos se alimentaron y asimilaron reservas dedicadas al esfuerzo reproductivo. De hecho, según lo observado en condiciones naturales, el experimento definitivo fue realizado en plena temporada reproductiva ya que la mayoría de los machos se encontraron ondeando su quela como parte del cortejo reproductivo, el cual es aproximadamente de Mayo a Agosto (observación personal) y coincide con la etapa reproductiva de otra especie cercana, como *Uca pugilator* (abril-octubre en Miami, Florida, o julio- agosto en Long Island, Florida, EU) (Williams y Duke, 1979). Adicionalmente, los resultados indican que el tamaño escogido de 2.5-3.0 cm de longitud del caparazón, fue efectivamente un tamaño en el cual las hembras se encuentran en un estado reproductivo, mientras que la temperatura utilizada en el bioensayo (25 ° C) fue idónea para mantener a los organismos con un comportamiento relativamente normal (respecto al observado en campo para hembras), además de propiciar el desarrollo de la gónada como se explicó anteriormente.

Finalmente, el haber definido un gradiente de efecto en el presente trabajo a partir de la evaluación integral de biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica en *Uca princeps*, reveló evidencias novedosas para evaluar en una época determinada del año el deterioro ambiental dentro del Estero de Urías. Lo anterior otorga una primera aproximación para complementar posteriormente con análisis químicos de los sedimentos muestreados que, por motivos de tiempo, no pueden ser completados e incluidos en la presente tesis. Por otro lado, dichos estudios también se pueden integrar con evaluaciones

del ecosistema estuarino. Asimismo, esto abre la posibilidad de aplicar este tipo de estudios en otras especies representantes de diferentes niveles de la trama trófica, mediante un enfoque multidisciplinario y con una perspectiva holística en un esfuerzo de investigación concertado que ponga en contexto ecológico los niveles de contaminación, las especies o receptores más susceptibles de ser afectados y, en conjunto, evalúe el grado de deterioro ecológico del sistema. En su conjunto esta estrategia de estudio se conoce como *evaluación de riesgo ambiental*, la cual recientemente se perfila como la evaluación más completa de los impactos de contaminación antropogénica en ambientes marinos y estuarinos. En este sentido, se requiere de un enorme esfuerzo científico para poder contar con muchos más biomarcadores específicos a fuentes de contaminación y en la medida que se vayan descubriendo y se incorporen esta clase de estudios en el país, se lograrán proponer medidas apropiadas para lograr el bienestar y el manejo de los ambientes costeros.

9. Conclusiones.

- La caracterización de efectos biológicos de los sedimentos contaminados provenientes de sitios con distintos niveles de impacto antropogénico fue posible al realizar la integración de respuestas a diferentes niveles de organización biológica mediante bioensayos ecotoxicológicos con el cangrejo violinista *Uca princeps*.
- La integración de los biomarcadores evaluados a diferentes niveles de organización biológica en *Uca princeps* muestran una diferenciación clara entre el Estero del Sábalo (estero de referencia) y el Estero de Urías (estero contaminado).
- La integración de los biomarcadores evaluados a diferentes niveles de organización biológica en *Uca princeps*, adicionalmente mostraron la existencia de un gradiente de efecto entre las estaciones dentro del Estero de Urías, reflejando el espectro de exposición a actividades antropogénicas con respecto a las áreas seleccionadas, quedando de la siguiente manera: U1 (manglar y granja) < U4 (Estero del Infiernillo) << U3 (industria sardinera y astilleros) < U2 (termoeléctrica).

10. Recomendaciones para trabajos posteriores.

- Rediseñar las trampas para que se entierren bien en sedimentos arenosos.
- Obtener el ciclo completo de vida de *Uca princeps* en el laboratorio.
- Investigar los efectos de exposición a sedimentos contaminados provocados en machos y posteriormente en los primeros estadios de vida de los cangrejos.
- Realizar estudios en diferentes órganos de los cangrejos para conocer la vía de entrada de los contaminantes, en donde afectan más y a qué concentraciones.
- Diseñar un bioensayo con *Uca princeps* en donde se puedan obtener organismos continuamente a lo largo del experimento, para monitorear la actividad de las respuestas a través del tiempo.
- Realizar monitoreos en campo de estos mismos biomarcadores para comparar sus efectos a lo largo del año para los Esteros de Urías y Sábalo.
- Evaluar los efectos de los biomarcadores en *Uca princeps* con relación a estresores diferentes a contaminantes, tales como factores ambientales.
- Evaluar otros biomarcadores (por ej. histología; activación de genes) que puedan ser específicos y sensibles a xenobióticos en distintos niveles de la cadena trófica.
- Desarrollar y aplicar un Factor de condición múltiple específico para *Uca princeps*.

11. Bibliografía.

- Akcha, F., Vincent-Hubert, F. y Pfohl-Leskowicz, A. 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessments of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research*, 534: 21-32.
- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F., Cortés-Altamirano, R. 2000. Trophic conditions and stoichiometric nutrient balance in subtropical waters influenced by municipal sewage effluents in Mazatlán Bay (SE Gulf of California). *Marine Pollution Bulletin*, 40:331-339.
- Álvarez-León, R. 1980. Hidrología y Zooplancton de tres esteros adyacentes a Mazatlán, Sinaloa, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*, UNAM, Vol. 7, No.1:177-194.
- American Society for Testing Materials (ASTM). 1997. Standard Guide for selection of resident species as test organisms for aquatic and sediment toxicity tests. ASTM, E 1850-97, E.U.A., pp. 1- 13.
- Avishai, N., Rabinowitz, C. Moiseeva, E., Rinkevich, B. 2002. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. *Mutation Research*, 518: 21-37.
- Baudo R. y Muntau H. 1990. Lesser known in-place pollutants and diffuse source problems. *En: Baudo, R, Giesy, J.P., Muntau, H. (Eds.) Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants*. Lewis Publishers, Michigan, E.U.A., pp. 1-14.
- Besten den, P.J. 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, Vol. 46, No. 1-5: 253-256.
- Bolger, T. y Connolly, P.L. 1989. The selection of suitable indices for measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, 34:171-182.
- Boyd, C.E. 1995. Soil and water quality management in aquaculture ponds. *Infofish Int.*, 5:29-36.

- **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- **Brown, C.L. y Luoma, S.N.** 1995. The relationship of metal exposure and condition index in *Potamocorbula amurensis* in San Francisco Bay. *En: Abstracts of the 2nd SETAC World Congress, Noviembre 1995, Vancouver, 72 p.*
- **Busacker G. P., I. R. Adelman y E. M. Goolish.** 1990. Growth. *En: Shreck C. B. y P. B. Moyle (Eds.). Methods for fish biology. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, E.U.A., pp. 363-387.*
- **Calow, P.** 1993. General principles and overview. *En: Calow, P. (ed.). 1993. Handbook of Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman y Hall, Londres, U.K. pp. 1.*
- **Collins, A.R.** 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology, Vol. 26: 249-26.*
- **Coughlan, B.M. Hartl, M.G.J., O' Reilly, S.J., Sheehan, D. Morthersill, C., van Pelt, F.N.A.M., O' Halloran, J. y O' Brien, N.M.** 2002. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of Manila clams *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin, 44:1359-1695.*
- **Couillard, C.M., Williams, P.J., Courtenay, S.C., Rawn, G.P.** 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology, 44: 263-278.*
- **Crane, J.** 1975. Fiddler Crabs of the World. Ocypodidae: Genus Uca. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, E.U.A., pp.128-132.
- **Chapman, P.M.** 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. Total Environ, 97/98: 815-825.*
- **Chapman, P.M. y Wang, F.** 2001. Annual Review: Assessing sediment contamination in Estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 20, No. 1: 3-22.*

- **Damstra, T.** 2002. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *Clinical Toxicology*, Vol. 40, No.4:457-465.
- **De la Lanza, G.** 1986. Materia orgánica en los sedimentos del sistema lagunar Huizache y Caimanero: importancia, comportamiento y significado en modelos de predicción. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM*, Vol. 13 No.1:251-286.
- **Depledge, M.H. y Billigurst, Z.** 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 39, Nos. 1-2, pp. 32-38.
- **Dorward-King, E.J.; Suter II, G.W.; Kapustka, L.A.; Mount, D.R.; Reed-Judkins, D.K.; Cormier, S.M.; Dyer, S.D.; Luxon, M.G.; Parrish, R., Burton Jr., G.A.** 2001. Distinguishing among factors that influence ecosystems. *En: Baird, D.J. y Burton Jr., G.A. (Eds.). 2001. Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Fl., E.U.A., pp. 1-22.*
- **Elumalai, M., Antunes, C. y Guilhermino, L.** 2002. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. *Water, Air and Soil Pollution* 141: 273-280.
- **Environment Protection Agency (EPA).** 1998. Guidelines for Ecological Risk Assesment. Risk Assesment Forum, Washington, E.U.A., Federal Register 63 (93): 26846-26924.
- **Environmental Protection Agency (EPA).** 2001. Methods for Collection, Storage and Toxicological Analyses: Technical Manual. USEPA-823-B-01-002, Washington, E.U.A., p. 4-1_5-15.
- **Escartín E. y Porte, C.** 1996. Bioaccumulation, metabolism, and biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15, No. 6: 915-920.
- **Fent K.** 1996. Ecology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26: 1-117.

- **Folk, L.** 1974. *Petrology of Sedimentary Rocks*. Hemphill Publishing, Austin, Texas, E.U.A., pp. 27-52.
- **Foran, C.M.; Benett, E.R. y Benson, W.H.** 2000. Exposure to environmentally relevant concentrations of different nonylphenol formulations in *Japanese medaka*, *Marine Environmental Research*, Vol. 50, No. 1-5, p. 135-139.
- **Forbes, V.E. y Forbes, T.L.** 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*. Chapman y Hall, Londres, U.K. pp. 1-3.
- **Galindo-Reyes, J.** 2000. *Condiciones Ambientales y de Contaminación en los Ecosistemas Costeros*. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), Culiacán, Sinaloa, México, 25 p.
- **García de la Parra, L.** 1998. *Distribución de compuestos organoclorados en peces del Mediterráneo noroccidental, metabolismo oxidativo y mecanismos de defensa*. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, 301 p.
- **García de Miranda, E.** 1973. *Modificación al sistema de clasificación de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. UNAM, Instituto de Geografía, México, 159, 272 p.
- **García-Vázquez, A.** 2003. *Metazoarios parásitos de la lisa blanca *Mugil curema* Valenciennes, 1836. como indicadores de contaminación en dos sistemas lagunares al sureste del Golfo de California: Estero de Urias y Estero Teacapán, Sinaloa- México*. Tesis de Licenciatura, Fundación Univ. Jorge Tadeo Lozano y Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Mazatlán, Sinaloa, México. 133 p.
- **Garza de la, R., Macías, A., Pérez, R. y Sánchez, M.** 1985. *Algunos aspectos ecológicos de la ictiofauna del Estero del Sábalo con un estudio sobre la alimentación de *Centropomus robalito*, Jordan y Gilbert*. Memoria del Servicio Social Universitario, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciencias del Mar, Mazatlán, Sinaloa, pp. 1-18, 107-110.

- **Genoni, G.P.** 1991. Increased burrowing by fiddler crabs *Uca rapax* (Smith) (Decapoda: Ocypodidae) in response to low food supply. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 147, No. 2: 267-285.
- **Godbout, G. Dutil, J.D., Hardy, D. y Munro, J.** 2002. Growth and condition of post-moult male snow crab (*Chionoectes opilio*) in the laboratory. *Aquaculture*, Vol. 206, Nos. 3-4: 323-340.
- **Gowland, B.T.G., Colin, F.M., Stagg, R.M., Houllihan, D.F., Davies, I.M.** 2002. Cypermethrin induces Glutathione-S-Transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research*, 54: 169-177.
- **Grandby, K. y Spliid, N.H.** 1995. Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. *Mar. Pollut. Bull.* 30: 74-82.
- **Gravato, C. y Santos, M.A.** 2002. Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of β -naphthoflavone water-exposed Sea bass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 52, No.1: 62-68.
- **Gray, J.** 1981. *Ecology of Marine Sediments: An introduction to the structure and function of benthic communities.* Cambridge, Londres, pp. 1-19.
- **Habig, W.H., Pabst, M.J. y Jacoby, W.B.** 1974. Glutathione-S-Transferases: the first enzymatic step in mercaptoric acid formation. *Journal of Biology Chemistry*, 249:7130-7139.
- **Hartl Jr., C.W. y Fuller, S.L.H. (Eds.)**. 1979. *Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates.* Academic Press, Nueva York, E.U.A., pp. 189-233.
- **Hartl, M.G.J.; Coughlan, B.M.; Sheehan, D.; Mothersill, C.; von Pelt, F.N.A.M.; O' Reilly, S.J.; Heffron, J.J.A.; Halloran, J.O.; O' Brien, N.M.** 2004. Implications of seasonal priming and reproductive activity on the interpretation of Comet assay data derived from the clam, *Tapes semidecussatus* Reeves 1864, exposed to contaminated sediments. *Marine Environmental Research*, Vol. 57, No. 4:295-310.
- **Hebel, D.K., Jones, M.B. y Depledge, M.H.** 1997. Responses of Crustaceans to contaminant exposure. *Estuarine, Coastal and Shelf*, 44: 177-184.

- **Hendrickx, M. E.** 1984. Studies of the coastal marine fauna of southern Sinaloa, Mexico. II. The decapod crustaceans of Estero el Verde. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol., UNAM, Vol. 11, No.1; 23-48.
- **Hodgson, E. y Levi, P.** 1987. A Textbook of Modern Toxicology. Elsevier, Nueva York, E.U.A., pp. 51-83.
- **Horváthová, E. Slameňová, D., Hlinčíková, L., Kumar, T., Gábelová, A., Collins, A.R.** 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. Mutation Research, 409: 163-171.
- **Hutchinson, H.T., Jha, A.N., Mackay, J.M. Elliott, B.M., Dixon, D.R.** 1998. Assessment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilii*) exposed to disinfected municipal sewage effluent. Mutation Research, 399: 97-108.
- **Ilsoe, O., Kristensen, E., Macintosh, D.** 2003. Impact of fiddler crabs (*Uca* spp.) on rates and pathways of benthic mineralization in deposited mangrove shrimp pond waste. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 289: 59-81.
- **Ingersoll C. G., Dillon T., Biddinger G. R.** 1997. Ecological risk assessment of contaminated sediments. *En: Ingersoll, C.G.; Dillon, T.; Biddinger, G.R. (Eds.). Ecological Risk Assessment of Contaminated Sediments. C.G. Ingersoll, T. Dillon, G.R. Biddinger (Eds.). SETAC Press, E.U.A., 376 p.*
- **Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI).** 1999. Cuaderno Estadístico Municipal. Mazatlán, estado de Sinaloa. INEGI, México, 123 p.
- **Ishizuka, M., Sakiyama, T., Iwata, H., Fukushima, M., Kazusaka, A. y Fujita, S. A.** 1998. Accumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and activities of Cytochrome P450 and Glutathione-S-Transferase in crabs (*Eriocheir japonicus*) from Japanese Rivers. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 17, No. 8: 1490-1498.
- **Jakoby, W. B.** 1978. The Glutathione S-Transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 46: 383-414.

- **Junta Municipal de Agua de Mazatlán (JUMAPAN)**, obtenido en agosto, 2004 de <http://www.jumapan.gob.mx> actualizado en mayo del 2003.
- **Jussila, J. y Mannonen, A.** 1997. Marron (*Cherax tenuimanus*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) hepatopancreas energy and its relationship to moisture content. *Aquaculture*, 149: 157-161.
- **Kennish, M.J.** 1997. *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press, Nueva Jersey, E.U.A., pp. 523.
- **Krebs, C.T., Valiela, I., Harvey, G.R. y Teal, J.M.** 1974. Reduction of field populations of fiddler crabs by uptake of chlorinated hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.*, 5: 140-142.
- **Kristensen, E.** 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrologia*, 426:1-24.
- **Kure, L.K. y Depledge, M.H.** 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. *Environ. Pollut.*, 84:149-157.
- **Lankford, R.** 1977. Coastal Lagoons of Mexico: Their Origin and Classification. *En: Wiley, M.* 1977. *Estuarine Processes*. Academic Press, Nueva York, pp.174-182.
- **Le Moullac, G. y Haffner, P.** 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, Vol. 191, Nos. 1-3:121-131.
- **Le Pennec, G. y Le Pennec, M.** 2003. Induction of Glutathione-S-Transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L): application of a new cellular model in biomonitoring studies. *Aquatic Toxicology*, 64:131-142.
- **Lee, R.F., Ryan, C. and Neuhauser, M.L.** 1976. Fate of petroleum hydrocarbons taken up from food and water by blue crab *Callinectes sapidus*. *Marine Biology*, 37: 363-370.

- **Lee, R., Kim, G.B., Maruya, K.A., Steinert, S.A. y Oshima, Y.** 2000. DNA strand breaks (Comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. *Marine Environmental Research*, 50: 553-557.
- **Leeuwen van, C.J.** 1995. Ecological effects. *En: Leeuwen van, C.J. y Hermens, J.L.M. (Eds.) 1995. Risk Assessment of Chemicals. Dordrecht, Netherlands. pp. 175-237.*
- **Lightner, D. V. (Ed.).** 1996. *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. The Aquaculture Society, Louisiana State University, E.U.A., Sección 4.2.*
- **Livingstone, D. R., Donkin, P. y Walker, C.** 1992. Pollutants in marine ecosystems: an overview. *En: Walker, C.H. y Livingstone, D.R. (Eds.). 1992. Persistent Pollutants in Marine Ecosystems. SETAC special publication series, Pergamon Press Ltd., Oxford, U.K. 272 pp.*
- **Lowe, J.I. Parrish, P.R., Wilson, P.D. y Duke, T.W.** 1971. Effects of mirex on selected estuarine organisms. *Trans. North Am. Wildl. Nat. Resour. Conf.*, 36: 171-186.
- **Lundebye, A.K., Langston, W.J. y Depledge, M.H.** 1997. Stress proteins and condition index as biomarkers of tributyltin exposure and effect in mussels. *Ecotoxicology*, 6: 127-136.
- **Macintosh, D.J., Ashton, E.C. y Havanon, S.** 2002. Mangrove rehabilitation and intertidal biodiversity: study in the Ranong Mangrove Ecosystem, Thailand. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55: 331-345.
- **Malthy, L.; Kedwards, T.J.; Forbes, V.E.; Grasman, K., Kammenga, J.E.; Munns Jr., W.R., Ringwood, A.H. Wels, J.S.; Wood, S.N.** 2001. Linking individual-level responses and population-level consequences. *En: Baird, D.J. y Burton Jr., G.A. (Eds.). 2001. Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Fl., E.U.A., pp. 1-22.*

- **Mannervik, B.** 1985. The isoenzymes of Glutathion Transferase. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* 57:357-417.
- **McKenzie, M.D.** 1970. Fluctuations in abundance of the blue crab and factors affecting mortalities. Tech. Rep. No. 1, Mar. Resour. Div. PL88-309, Proj. No. 2-79-R-1. South Carolina Wild, Resour. Dep. Charleston.
- **McLoughlin, N., Yin, D. Maltby, L., Wood, R.M. y Yu, H.** 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19, No. 8: 2085-2092.
- **Medina, M.** 1980. El factor de condición múltiple (Km) y su importancia en el manejo de poblaciones de carpa Israel (*Cyprinus carpio specularis*). *En: Manuales técnicos de acuicultura*. Año 1, Vol. 1. México, pp. 5-10.
- **Méndez, N.** 2002. Annelid assemblages in soft bottoms subjected to human impact in the Urias Estuary (Sinaloa, Mexico). *Oceanológica Acta*, 25:139-147.
- **Miller, D.C.** 1961. The feeding mechanism of fiddler crabs, with ecological considerations of feeding adaptations. *Zoologica*, 46: 89-100.
- **Miller, P.J. y Van Atten, Ch.** 2004. Emisiones atmosféricas de las centrales eléctricas en América del Norte. Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte (CCA), Montreal, Canadá, 93 p.
- **Mitchelmore, C.L. y Chipman, J.K.** 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147.
- **Morales Serna, N.F.** 2004. Estructura de la meiofauna en relación a la contaminación del sistema Urias, Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca No. 23, Oaxaca, pp. 33-40, 55-62, 98-100.
- **Nacci, D. E. y Jackim, E.** 1992. Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Marine Environmental Research*, Vol. 33, No. 2: 83-100.

- **Nacci, D. E.; Cayula, S. y Jackim, E.** 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, Vol. 35, No. 3-4: 197-210.
- **Ochoa-Izaguirre, M.J., Carballo, J.L. y Páez-Osuna, F.** 2002. Qualitative changes in macroalgal assemblages under two constrasting climatic conditions in a subtropical estuary. *Botanica Marina*, Vol. 45: 130-138.
- **Osuna-López, J., Páez, F., Ortega, P.** 1986. Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en los sedimentos del puerto y antepuerto de Mazatlán. *Ciencias Marinas*, Vol. 12, No. 2: 35-45.
- **Osuna-López, J.I., Cervantes-Atondo, H.M., Zazueta-Padilla, Roíz-Ruíz, R. y Ibarria, J.** 1994. Efectos letales de aguas residuales urbanas sobre organismos acuáticos del Estero del Infiernillo, Mazatlán, Sinaloa. *Ciencias del Mar*, 13:5-10.
- **Osuna-López J.I., Zazueta-Padilla H., Frias-Espericueta M., Izaguirre-Fierro G. y López-López G.** 1997. Metales pesados en sedimentos superficiales del sistema Arrollo Jabalines-Estero del Infiernillo, Mazatlán, Sinaloa. México. *Ciencias del Mar*, Universidad Autónoma de Sinaloa, 15: 43-49.
- **Pacific Estuarine Ecosystem Indicator Research Consortium (PEEIR)**, obtenido en septiembre 2004 de <http://www.bml.ucdavis.edu/peeir/annualrep.html>, página actualizada en marzo, 2003.
- **Páez-Osuna, F., Montaña-Ley, Y. y Bojorquez-Leyva, H.** 1990. Intercambio de agua, fósforo y material suspendido entre el sistema lagunar del puerto de Mazatlán y las aguas costeras adyacentes. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 6: 19-32.
- **Page, W.** 1997. *Contaminated Sites and Environmental Cleanup: International Approaches to Prevention Remediation and Reuse*. Academic Press, E.U.A., pp. 1-13.
- **Panter, G.H., Thompson, R.S. y Sumpter, J.P.** 1998 Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*, 42: 243-253.

- **Parsons, T.R., Maita, Y. y Lalli, C.M.** 1984. A manual of biological and chemical methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford, U.K., 173 p.
- **Peakall, D.** 1992. Animal Biomarkers as Pollution Indicators. Chapman y Hall, Londres., U.K., pp.1-18.
- **Pope, K.L. y Kruse, C.G.** 2001. Assessment of Fish Condition Data. Texas Tech University, E.U.A. pp 1-22.
- **Power, E.A. y Chapman, P.M.** 1992. Assessing Sediment Quality. *En*: Burton, A. Jr. 1992. Sediment Toxicity Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, E.U.A., pp. 1-18.
- **Quiñones, G.** 2004. Manifestación General de Impacto Ambiental del Desarrollo Marina Mazatlán. Marina Mazatlán-Docmento presentado en SEMARNAT, 138 p.
- **Raa, J., Gildberg, A. y Strom, T.** 1982. Fish Silage. A review. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 16 (4): 383-419.
- **Renán-Ramírez, J.** 1998. Estimación de las tendencias de cambio ambiental en el Estero de Urías, Sinaloa, México por medio de un análisis multitemporal (1973-1997) con imágenes Landsat. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-Unidad Mazatlán, pp. 14-24.
- **Ricker, W.** 1975. Handbook of computations for biological statistic of fish population. *Fish. Res. Bd. Canada Bull. No. 119*. 300 p.
- **Ríos Sicairos, J.** 2004. Análisis comparativo de la condición biológica de la Lisa Blanca (*Mugil curema Valenciennes, 1836*) como indicador de estrés ambiental en dos sistemas lagunar-estuarinos de la costa sureste del Golfo de California. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa, 88 p.
- **Robinson, G.A. y Dillaman, R.M.** 1985. The effects of naphthalene on the ultrastructure of the hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca minax*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45: 311-323.
- **Rodríguez-Gutiérrez, M.** 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT editorial, pp. 1-10.

- **Rodríguez-Gutiérrez, M. y Marañón-Herrera, S.** 1992. Relación del Factor de Condición Múltiple con la Reproducción de machos en la carpa *Cyprinus carpio*. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Vol. 20, No.1:105-113.
- **Rodríguez de la Cruz, Ma. C.** 1987. Crustáceos decápodos del Golfo de California. Secretaría de Pesca, México, pp. 195-198.
- **Rodríguez-Preciado, A.** 2004. Bioacumulación mercurio (Hg) en tejido muscular de la lisa *Mugil curema* (Valenciennes, 1938) de los Esteros Urfas y Teacapán, Sinaloa. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit, 50 p.
- **Rossemblum, M., Pudney, J., Callard, I.** 1987. Gonadal morphology enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. Journal of Fish Biology, 31:325-341.
- **Ruelas-Inzunza, J.R. y Páez-Osuna, F.** 1998. Barnacles as biomonitors of heavy metals pollution in the coastal waters of Mazatlán Harbor (Mexico). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 61:608-615.
- **Ruelas-Inzunza, J.R. y Páez-Osuna, F.** 2000. Comparative bioavailability of trace metals using three filter-feeder organisms in a subtropical coastal environment (Southeast Gulf of California). Environmental Pollution, 107:437-444.
- **Roy, L.A. Armstrong, J.L., Sakamoto, K., Steinert, S., Perkins, E., Lomax, D.P., Johnson, L.L. y Schlenk, D.** 2003. The relationships of biochemical endpoints to histopathology and population metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, U.S.A. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 22, No. 6: 1309-1317.
- **Ruíz-Luna, A. y Berlanga-Robles, C.** 2003. Land use, land cover changes and coastal lagoon surface reduction associated with urban growth in northwest Mexico. Landscape Ecology 18: 159-171.

- **Salgado-Barragán, J.** 2002. Evaluación del impacto de las descargas de una granja camaronícola sobre la fauna de invertebrados asociada a un ecosistema lagunar adyacente. Tesis de Doctorado, UNAM, Facultad de Ciencias, Posgrado en Ciencias Biológicas, pp. 1-6, 25-30, 53-74, 179-185.
- Saravana-Bhavan, P. y Geraldine, P.** 2001. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Machrobrachium malcolmsonii* on the exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70: 27-41.
- **Sarda, N. y Burton, A. Jr.** 1995. Ammonia variation in sediments: spatial, temporal and method-related effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 14, No. 9:1499-1506.
- **Schlenk, D.** 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 39, Nos. 1-12 : 48-53.
- **Schneider, F.C.M.** 1983. Estudio biológico-pesquero preliminar del Estero del Sábalo. Memoria del Servicio Social Universitario, Universidad Autónoma de Sinaloa, Ciencias del Mar, 35 p.
- **Schumacher, B.A.** 2002. Methods for the determination of total organic (TOC) in soils and sediments. U.S. environmental Protection Agency, NCEA-C-1282, EMASC-001, 25 p.
- **Snyder, M.J. y Mulder, E.P.** 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormon titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquatic Toxicology*, 55: 177-190.
- **Smith, T.J.** 1987. Seed predation in relation to tree dominance and distribution in mangrove forests. *Ecology*, 68: 266-273.
- **Smith, T.J., Boto, K. G., Frusher, S.D. y Giddins, R.L.** 1991. Keystone species and mangrove forest dynamics: the influence of burrowing by crabs on soil nutrient status and forest productivity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 33:419-432.
- **Secretaría de Recursos Hidráulicos (S.H.R.).** 1975. Informe de muestreos de postlarvas y parámetros ambientales realizados en el estero-Los Sábalo. Mazatlán, Sinaloa. Dirección de Acuicultura, 11 p.

- Sokal, R. y Rohlf, F.J. 2001. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 7^a ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York, pp. 229-242, 521-530.
- Soto-Jiménez, M.F., Páez-Osuna, F. y Morales-Hernández, F. 2001. Selected trace metals in oysters (*Crassostrea iridescens*) and sediments from the discharge zone of the submarine sewage outfall in Mazatlán Bay (southeast Gulf of California): chemical fractions and bioaccumulation factors. *Environmental Pollution*, 114: 357-370.
- Steinert, S.A., Streib-Montec, R. Leather, J.M. y Chadwick, D.B. 1998a. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research*, 399: 65-85.
- Steinert, S.A., Streib, R. y Sastre, M.P. 1998b. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, Vol. 46, No. 1-5: 355-358.
- Thompson, S., Tilton, F., Schlenk, D. y Benson, W.H. 2000. Comparative vitellogenic responses in three teleost species: extrapolation to in situ field studies. *Marine Environmental Research*, 51:185-189.
- Trevigen, Inc. 2001. Commet Assay Silver: Reagent kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay and Silver Staining, Catalog # 4251-050-K. Trevigen, Incorporation, Gaithersburg, 16 pp.
- Truhaut, R. 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Env. Safety* 1:151-173.
- UN, UNEP, FAO, UNESCO-IOC, WHO, WMO, IMO y IAEA. 2001. Protecting the Oceans from Land-based Activities: Land-based sources and activities affecting the quality and uses of the marine coastal and associated freshwater environment. UNEP, 168 p.
- Van den Berg, M., Van de Meent, D., Peijnenburg, D.T.H.M., Struijs, J. y Tas, J.W. 1995. Transport, accumulation and transformation processes. *En: Leeuwen van, C.J. y Hermens, J.L.M. (eds.) 1995. Risk Assessment of Chemicals*, Dordrecht, Netherlands. pp. 37-102.

- Vernberg, W.B. y O' Hara, J. 1972. Temperature-salinity stress and mercury uptake in the fiddler crab, *Uca pugilator*. J. Fish. Res. Board Can., 29:1491-1494.
- Weis, J.S. y Mantel, L.H. 1976. DDT as an accelerator of limb regeneration and molting in fiddler crabs. Estuarine Coastal Mar. Sci., 4: 461-466.
- Weis, J., Windham, L., Santiago-Bass, C. y Wies, P. 2002. Growth, survival, and metal content of marsh invertebrates fed diets of detritus from *Spartina alterniflora* Loisel and *Phragmites australis*. Cav. Trin. ex Steud. from metal-contaminated and clean sites. Wetlands Ecology and Management, 10: 71-84.
- White, P.A. y Rasmussen, J.B. 1998. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. Mutation Research, 410: 223-236.
- Williams, A.B. y Duke, W.T. 1979. Crabs (Arthropoda: Crustacea: Decapoda: Brachyura). En: Hart Jr., C.W. y Fuller, S.L.H. (Eds.). 1979. Pollution Ecology of Estuarine Invertebrates. Academic Press, Nueva York, E.U.A., pp. 189-233.
- Wilson, J.T., Pascoe, P.L., Parry, J.M. y Dixon, D.R. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). Mutation Research, 399: 87-95.
- Wolfrath, B. Observations on the behaviour of the European fiddler crab *Uca tangeri*. Marine Ecology Progress Series, Vol. 100:111-118.
- Wojewódzka, M.; Kruszewski, M.; Iwaneko, T., Collins, A.R. y Szumiel, I. 1999. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage as revealed by the alkaline comet assay. Mutation Research, 440:19-25.
- Wong, P.K. 1988. Mutagenicity of heavy metals. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 40: 597-603.
- Yamane, T. 1999. Estadística. 3^{ra} ed. Harla, México, D.F., 767 p.
- Zar, J.S. 1999. Biostatistical Analysis. 4^a ed., Prentice Hall, Inc. Nueva Jersey, E.U.A., 668 p.

12. Anexos.

12.1 Anexo 1.

a) **Granulometría:** se tomó aprox. 1 Kg. de sedimento por tratamiento, congelando las muestras a -20°C hasta su posterior uso. Para obtener una precisión en la caracterización del tamaño del grano de las muestras, fue necesario eliminar la materia orgánica del sedimento. Para ello, se vertieron aprox. 20 g de sedimento de cada tratamiento en vasos de precipitado, que fueron colocados en baño María con peróxido de hidrógeno al 30 %. De esta manera se facilitó la evaporación del peróxido de hidrógeno al 30 % que fue vertido en las muestras continuamente, hasta que dejó de haber efervescencia en las muestras (este paso puede tardar aprox. 2-15 días). La presencia del peróxido de hidrógeno al 30 %, sirve para oxidar la materia orgánica que está adherida a los granos del sedimento.

Al terminar la efervescencia, se secan las muestras al sol, las cuales fueron guardadas hasta su posterior manejo. El proceso final de granulometría fue llevado a cabo en el Laboratorio de Geofísica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-Unidad Mazatlán, UNAM, según la metodología propuesta por Folk (1974).

Las muestras de sedimento seco y libre de materia orgánica (aprox. 10-16 g), fueron sometidas a un tamizado de $63\ \mu\text{m}$ en húmedo con agua destilada. La porción de sedimento que quedó en la superficie, se retiró y se colocó en un crisol mediano previamente pesado. La parte de sedimento que pasó el tamiz se caracterizó en limos y arcillas, a través de la técnica de pipeteo que a continuación se describe (Folk, 1974).

Para ello, se requirió de buretas de 1 L y crisoles medianos previamente pesados. Las porciones de sedimento a separar fueron colocadas y aforadas respectivamente con agua destilada a 1 L. Se homogenizó durante 1 min con un agitador, para que el sedimento quedara en suspensión. Al terminar la homogenización se contaron 30 seg. y con una pipeta volumétrica de 25 ml, a una profundidad de 5 cm, se tomó la muestra de agua del mismo volumen (1^{a} pipeteo = 1^{a} P) y fue colocada en un crisol mediano. Se repitió el

mismo paso a la hora (2ª pipetéo = 2ª P), con la variante de que la muestra fue tomada a una profundidad de 22.1 cm.

Al terminar la colocación de las muestras en sus crisoles se ingresaron a una estufa a 100° C por toda la noche. Al día siguiente se pesaron y con los valores obtenidos se calcularon las proporciones de arenas (>63 µm), limos (2-63 µm) y arcillas

(2 µm) con las siguientes fórmulas:

$$W_{sed} = W_{es} + W_c$$

$$F.G. = W_{sed} + (1^a P \times 40)$$

$$\% \text{ Arena} = (W_{sed} / F.G.) \times 100$$

$$W \text{ Arcilla} = (W_{2^a P} \times 40) - (W_{1^a P} \times 40)$$

$$\% \text{ Arcilla} = (W \text{ Arcilla} / F.G.) \times 100$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

Donde:

$$W_{sed} = \text{Peso del sedimento (g)}$$

$$W_{es} = \text{Peso del crisol + sedimento (g)}$$

$$W_c = \text{Peso del crisol (g)}$$

$$F.G. = \text{Fragmento Grueso}$$

$$W \text{ Arcilla} = \text{Peso de arcilla (g)}$$

b) Materia Orgánica.

La materia orgánica en el sedimento es calculada a través de la combustión del mismo a una temperatura de 450 ° C, lo que convierte la materia orgánica en dióxido de carbono y representándose en la pérdida de peso de la muestra (Schumacher, 2002).

Para lo cual, se calcinaron los crisoles a 450 °C durante 2 horas, dejándose enfriar, para después ser guardados en un desecador hasta ser utilizados y estar a peso constante. Previamente se tiene una muestra de sedimento liofilizada durante 48 hrs., la cual se pulverizó con la ayuda de un mortero, para obtener una muestra de 3 g, los cuales se

colocaron en los crisoles anteriormente pesados. Éstos se pesaron con la muestra y se determinó el peso (Pm). Enseguida, se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico al 37.5 % y se esperó a que la efervescencia terminara, de lo contrario se agregó más ácido hasta que no se produjeron más burbujas. Posteriormente, la muestra se secó en una estufa por 2 horas a 65 ° C y al final fue guardada en un desecador y se determinó el peso (Pi). Por último, la muestra fue incinerada en una mufla durante 6 horas a 450 ° C. Se dejó enfriar la muestra y se guardó en un desecador, para después pesar el crisol más su residuo (Pf). Los crisoles no fueron tocados con los dedos, fue necesario utilizar pinzas para su manejo (Schumacher, 2002).

- Cálculos para obtener la Materia Orgánica.

La materia orgánica (MO) se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ MO} = (pi - pf) / pm \times 100 \%$$

Donde:

Pi = Peso inicial del crisol con la muestra después de la adición del ácido

clorhídrico y antes de la ignición (g).

Pf = Peso del crisol más muestra después de la ignición (g).

Pm = Peso de la muestra (g).

c) Evaluación de la fauna asociada: esta evaluación fue meramente cualitativa, se tomó aprox. 1 Kg de sedimento, el cual fue tamizado (1 cm de apertura de malla) en húmedo y los restos se colocaron en formol al 4 %, para su posterior utilización.

d) Análisis de Metales Pesados: Todo el material de polietileno, utilizado para la colecta de este análisis fue previamente lavado con ácido nítrico al 20 %, se tomaron aprox. 2 Kg. de sedimento por tratamiento con una pala de polietileno y se colocaron los sedimentos en bolsas igualmente de polietileno. Las muestras fueron congeladas a -20 ° C hasta su posterior utilización.

Posteriormente las muestras fueron enviadas al CIAD-Hermosillo, Sonora, en bolsas zip-lock previamente lavadas con ácido nítrico al 20 %, para su proceso final; donde fueron sometidas a un análisis para determinar la presencia de metales pesados, tales como: Cromo, Plomo, Cadmio (Flama) y Mercurio (generador de gases), para lo cual, se liofilizó por 48 hrs. aprox. 250 g de sedimento húmedo en una liofilizadora LABCONCO modelo 77510-00M (Kansas City, U.S.A.), para obtener una muestra seca mayor o igual a 100 g, esto depende de la cantidad de agua que presenten los sedimentos.

e) Análisis de Hidrocarburos Totales y Clorados.

Todo el material de metal y de vidrio que fue utilizado fue lavado previamente con hexano, acetona y horneados durante 12 hrs. a 110 ° C. Se tomaron aprox. 1.5 Kg. de sedimento por tratamiento con espátulas de metal y colocadas en envases de vidrio. Las muestras fueron congeladas a - 20 ° C hasta su posterior uso.

Las muestras fueron enviadas al CICESE en Ensenada, Baja California, en envases de vidrio igualmente lavados con hexano, acetona y horneados, para su proceso final; donde serán sometidas a un análisis para la determinación de hidrocarburos totales y clorados , para lo cual, se liofilizaron aprox. 250 g de sedimento en un liofilizador LABCONCO, Modelo 77510-00 M (Kansas City, U.S.A.) durante 48 hrs., para obtener una muestra mayor o igual a 100 g.

12. 2 Anexo 2.

Ensayo Cometa con Hemolinfa de *Uca princeps*.

Material.

- Hemolinfa.
- Papel aluminio.
- Porta objetos.
- Alcohol al 70 %.
- Algodón.
- Micropipetas.
- Puntas para micropipetas (1 ml; 200, 10 μ l).
- 1 bolsa de plástico.
- Hielera.
- Hielo molido.
- Agua destilada.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Agua HPLC/ 18 m Ω .
- 1 cubeta pequeña / recipiente de plástico pequeño.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml (nuevos).
- Vasos Coplin
- Centrífuga en frío 4 ° C – 400 g
- Kit Comet Assay- TREVIGEN- Todos los reactivos y soluciones por usar deben estar listas y preparadas de antemano.
- 1-2 Termómetros = 150 ° C.
- 2 Termoblocks; uno a 90-100 ° C y otro a 42 ° C y/o Baño María a 42 ° C, en caso de que no haya otro termoblock disponible.
- Cámara (Chica/Mediana/Grande) de electroforesis. LIBRE DE BROMURO DE ETIDIO.
- Microscopio óptico (10 x, 40 x, 60 x).
- 0.5 M EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético $C_{10}H_{14}N_2O_3Na_2$).
- Metanol (27 047-4 1 L).
- Ácido acético glacial– (AG283).
- Ácido acético glacial al 5 %.
- DMSO (D 8418 50 ml, opcional) Dimetilsulfóxido-Sólo para grupos hemos.
- 10 x PBS, libre de Ca^{++} y Mg^{++} .
- NaOH en presentación lentejas.
- Etanol al 100 %.
- Jeringas de insulina de 50 unidades/

0.5 ml

- Citrato de sodio 0.129 M

Preparación de Reactivos

Los reactivos marcados con un * deben de ser preparados inmediatamente antes de su uso.

a) 1 x PBS, libre de Ca^{++} y Mg^{++} .

Diluir 10 X PBS con agua destilada 1 :10 para preparar 1 X PBS. Ej. para preparar 1 L de 1 X PBS se toman 100 ml de 10 X PBS y se afora a 900 ml de agua destilada.

10 x – 1 ml

1x - 100 ml

10 x Solución salina amortiguadora de fosfato (Phosphate buffer Saline, PBS):

- Agua destilada	800 ml
- NaCl	80 g
- KCl	2 g
- Na_2HPO_4	14.4 g
- KH_2PO_4	2.4 g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 Litro con agua destilada. Esterilizar por 20 min.

b) Solución de Lisis. SE MANTIENE A TEMPERATURA AMBIENTE.

Para 10 laminillas, 2 muestras por laminillas, preparar (ej.):

- Solución de lisis (Cat # 4250-050-01)	40 ml
- DMSO	400 μl (opcional)

Enfriar a 4 ° C solución de Lisis = 20 min. antes de usarse, ÚNICAMENTE la solución a utilizar. No meter toda la botella.

La adición de DMSO es opcional, si solo sí, se trabaja con muestras que contengan grupos hemo, tales como la sangre o muestras de hígado. (La sol. de lisis contiene 2.5 M (NaCl) Cloruro de Sodio, 100 mM EDTA a pH 10, 10 mM Tris Base, 1 % Sodio Laurel Sarcosinato y 1 % Triton X-100).

c) Agarosa de bajo punto de fusión del ensayo cometa Cat # 4250-050-02 (Comet LMAgarose). La agarosa está lista para usarse una vez derretida. Para derretir la agarosa se coloca el envase donde está contenida en agua caliente a 90-100 °C por 5 min (Termoblock) ; posteriormente se coloca a 42 °C (Termoblock o baño María), por 10 min, (LMAgarose contiene: agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en 1 x PBS). Se utilizan solamente 75 µl de LMA por muestra (por laminilla 150 µl).

d) Solución Alcalina de desdoblamiento, pH > 13, para preparar 50 ml, (Alkaline unwinding solution). USAR SIEMPRE SOLUCIÓN NUEVA.

- NaOH en presentación lentejas	0.6 g	1.8 g
- 200 mM EDTA (Cat # 4250-050-04)	250 µl	750 µl
- Agua destilada	<u>49.75 ml</u>	<u>49.250 ml</u>
	50 ml	150 ml

Agitar hasta que se disuelva, dejar a TEMPERATURA AMBIENTE hasta su uso. NOTA: la solución puede llegar a calentarse durante la preparación.

e) Solución de electroforesis pH > 13, Alcalina. USAR SOLUCIÓN NUEVA.

- NaOH en presentación lenteja	12 g
- 500 mM EDTA pH 8	2 ml
- Agua destilada aforar a 1 litro- solamente hasta que el NaOH se haya disuelto, = 300-400 ml.	

Preparar por lo menos 2 litros de solución, pues para una corrida de electroforesis en una cámara mediana, se requieren ≈ 900 ml, dependiendo del alto de la agarosa en la(s) laminilla(s). Para una cámara chica ≈ 210 ml y la para una cámara grande se ocupan $\approx 1,900$ ml.

Para preparar 0.5 M EDTA pH 8.

- Agua destilada	800 ml
- EDTA	186.1 g

Disolver con agitador magnético. Ajustar pH con NaOH (≈ 20 g de lentejas) para que se pueda disolver. Esterilizar en autoclave por 20 min.

f) Soluciones para tinción con plata:

A)	Solución fijadora.	(μ l)	1x	2x	4x	8x
	- 10 x Fixation Additive (Aditivo fijador)		10	20	40	80
	- Agua destilada		30	60	120	240
	- Metanol		50	100	200	400
	- Ácido acético glacial		10	20	40	80

B) 2 x Staining Reagent # 4 .

Antes del primer uso se añaden 12 ml de agua destilada y agitar hasta que se disuelva. Almacenar a 4 °C y dejar que llegue a TEMPERATURA AMBIENTE, ≈ 20 min. antes de usarse. NOTA IMPORTANTE: debido a que el reactivo es estable por 3 meses, se optó por pesar el polvo liofilizado en una cantidad de 100 mg para preparar 1 ml del reactivo 2 x Staining Reagent # 4. El reactivo liofilizado se mantiene en un desecador en Cromatografía para evitar que se vuelva higroscópico u obtenga humedad.

C) Staining Solution. (*Preparar fresca cada vez), (μl)

	1x	2x	4x	8x
- Agua destilada •	35	70	140	280
- 20 x Staining Reagent # 1 •	5	10	20	40
- 20 x Staining Reagent # 2 •	5	10	20	40
- 20 x Staining Reagent # 3 •	5	10	20	40

• = REACTIVOS A TEMPERATURA AMBIENTE

Se mezclan las 4 soluciones. Posteriormente se añaden 50 μl de 2x Staining Reagent # 4 por muestra, por laminilla hay 2 muestras; por lo tanto se colocan 100 μl de 2 x Staining Reagent # 4, por laminilla.

D) Stop Solution.

Por muestra 100 μl de ácido acético glacial al 5 %. Para prepararlo se requiere de 5 μl de ácido acético al 100 % en 95 μl de agua.

MANTENERSE EN FRÍO – REFRIGERADOR

PROTOCOLO ENSAYO COMETA

(Modificado de Trevigen Inc., 2001 y Collins, 2004)

El animal vivo se sostiene a lo largo y por la parte de abajo con los dedos índice y pulgar, tratando de colocar los dedos bajo los pleópodos, presionándolos hacia el abdomen para inmovilizarlo y exponer las uniones de los pleópodos con el cefalotórax. No se debe de mover mucho al animal y tampoco debe de voltearse, ya que la hemolinfa debe de estar en los pleópodos para poder extraerla, véase la Fig. 1. Esquema general de extracción de hemolinfa.

NOTA: El citrato de sodio debe mantenerse en hielo mientras se utiliza.

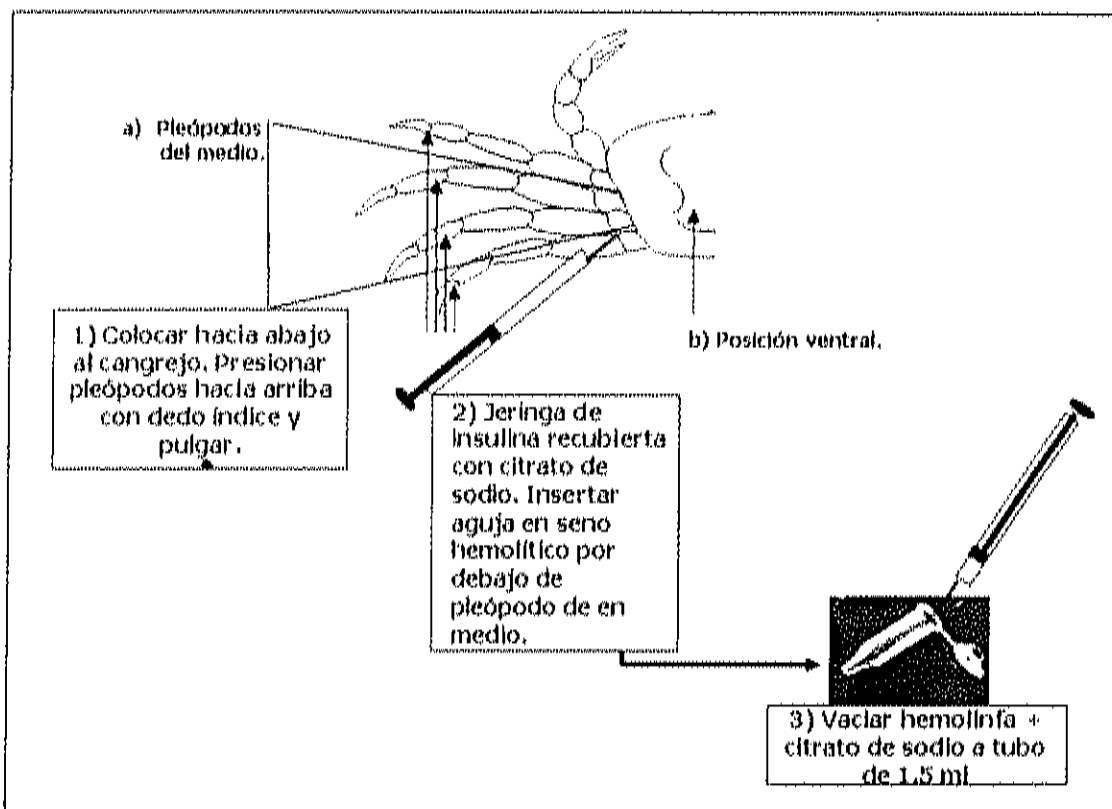


Figura 1. Esquema general de extracción de hemolinfa en cangrejos violinistas *Uca princeps*.

1) La jeringa a utilizar debe de ser nueva y necesita ser impregnada con el Citrato de Sodio previa a obtener la hemolinfa, para que permita obtener la muestra sin que ésta se coagule dentro de la jeringa.

2) Obtener 50 μ l de hemolinfa pinchando con mucho cuidado y suavidad el seno hemolítico que es la unión suave y flexible que une al pleópodo con el abdomen. Tratar de pinchar donde se encuentran los senos más grandes, son los 2 de en medio, (Fig. 1-a). No se debe meter mucho la jeringa, porque se puede lastimar al animal. Solo hay que meter lo suficiente la jeringa como para obtener muestra, una vez adentro se detecta el punto en donde empieza a salir la hemolinfa.

3) Una vez obtenida la muestra se colocan los 50 μ l de hemolinfa en 100 μ l de Citrato de sodio.

NOTA: debe de realizarse lo más rápido posible para evitar que la hemolinfa se empiece a coagular.

SOLAMENTE PARA CONTROL POSITIVO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

3.1) Colocar 50 μ l de hemolinfa en 100 μ l de Citrato de Sodio con 200 μ l de H₂O₂, incubando por 30 min. El peróxido de hidrógeno coloca en la muestra una vez que ya se vaya a concluir con la toma de todas las muestras, para evitar mantener esas células expuestas por más de 30 minutos.

4) Centrifugar 5 min. a 400 g a 4 °C. Este paso puede ser repetido 1 vez más, solo si no se llega a ver una debris o un pastilla de células.

5) Quitar el sobrenadante con mucho cuidado, la mayoría de las veces no se logra ver un pellet y se dejan alrededor de 20 μ l de citrato de sodio, finalmente se debe resuspender con cuidado en 150 μ l 1 x PBS / 20 mM EDTA. Se recomienda que el sobrenadante se conserve en un tubo eppendorf, por si se llegasen a necesitar más células.

- 6) Las células resuspendidas se mantienen en hielo.
- 7) Mezclar las células pipeteando muy bien y con mucho cuidado, tomar 10 μ l y colocarlos en un portaobjetos para observar al microscopio las células en la solución.
- 8) Colocar agarosa de bajo punto de fusión (LMAgarose) en un termoblock a 90-100 °C por 5 min.
- 9) Traspasar LMAgarose a otro termoblock a 42 °C por 10 min. Los pasos 8 y 9, pueden llevarse a cabo desde el principio, manteniendo a 42 °C la agarosa hasta su uso.
- 10) Colocar la laminilla 1 min o más sobre la plancha del termoblock a 42 °C, solo para que se adhiera mejor la agarosa que se colocará a la laminilla. NOTA: las laminillas deben de estar previamente identificadas para su uso, Fig. 2-1.
- 11) Obtener 7.5 μ l de células en suspensión e incorporarlas (lo ideal sería tener $\approx 1 \times 10^5$ céls. / ml) con 75 μ l LMA a 42 °C, dando una proporción de 1:10. Fig. 2-2 .
- 12) Mezclar lentamente las células + LMA y colocar en el portaobjetos, EVITANDO HACER BURBUJAS. Si existen burbujas hay que tratar de eliminarlas, Fig. 2-3.
- 13) Esparcir la muestra con la punta de la pipeta, Fig. 2-4.

17) Con unas pinzas y con cuidado transferir las laminillas al aparato de electroforesis, cuidando que todas queden de un mismo lado. El aparato debe estar en frío a 4 °C, al igual que la solución de electroforesis alcalina, previo a su uso.

NOTA: la cámara y su solución de electroforesis puede ser puesta en el refrigerador desde los primeros pasos para que al enfriarse la sol., pueda correr un mayor voltaje.

Añadir suficiente solución alcalina para cubrir las muestras. (Cámara chica: ≈210 ml; cámara mediana: ≈900 ml; cámara grande: ≈1, 900 ml).

18) Correr a 20-25 volts (hasta 26-28 en la cámara grande), según de la fuente de poder y depende también de lo alto o bajo que haya quedado esparcida la agarosa en la laminilla, pues se debe de verter solución de electroforesis hasta cubrir la(s) laminilla(s). generalmente se corre a 22 volts / 300 mA / 45 min. Si el voltaje se baja durante la electroforesis, se debe de correr 5 min. más, por cada decimal que disminuya o viceversa, dependiendo el voltaje y con qué cámara se trabaje.

19) Eliminar con cuidado el exceso del buffer y sumergir la(s) laminilla(s) en etanol al 70%, (previamente vertido en los vasos de Coplin 30 ml aprox.) por 5 min. en oscuridad.

20) Secar al aire por 20 min. en oscuridad. Máx. de secado 22 min. Si se deja más tiempo la agarosa se empieza a cuartear.

21) Guardar en el refrigerador en una caja de petri ó un envase cerrado envuelto en papel aluminio, para teñir al día siguiente.

TINCIÓN

22) Cubrir las muestras con 100 μ l de Fixation Solution e incubar por 20 min. a temperatura ambiente.

	(μ l)	1x	2x	4x	8x	11x	22x
- 10 x Fixation Additive (Aditivo fijador)		10	20	40	80	110	220
- Agua destilada		30	60	120	240	330	660
- Metanol		50	100	200	400	550	1100
- Ácido acético glacial		10	20	40	80	110	220

23) Lavar con agua destilada por 30 min.

NOTA: Secar el agua que se queda alrededor de las muestras, para evitar que la solución de tinción se corra hacia fuera de la muestra.

24) Cubrir la muestra con 100 μ l de mezcla del "Staining Solution", por 20 min. o un poco más dependiendo de la aparición de la tinción. Se debe preparar la mezcla en el momento.

	(μ l)	1x	2x	4x	8x	11x	22x
- Agua destilada •		35	70	140	280	385	770
- 20 x Staining Reagent # 1 •		5	10	20	40	55	110
- 20 x Staining Reagent # 2 •		5	10	20	40	55	110
- 20 x Staining Reagent # 3 •		5	10	20	40	55	110

• = REACTIVOS A TEMPERATURA AMBIENTE

Se mezclan las 4 soluciones. Posteriormente se añaden 50 μ l de 2x "Staining Reagent" # 4 por muestra y se mezcla bien por laminilla hay 2 muestras, se colocan 100 μ l de 2 x Staining Reagent # 4, por laminilla. El "Staining Reagent" se almacena a 4 ° C).

25) Parar la reacción cuando los cometas sean visibles con 100 μ l de ácido acético glacial al 5 % por 15 min por muestra.

26) Lavar con agua destilada, secar al aire libre en la oscuridad (ej. toda la noche) y almacenar en oscuridad.

12.3 Anexo 3.

Protocolo de disección.

DISECCIÓN (Realizar en hielo molido. NOTA: se requiere MUCHO hielo molido, para mantener las muestras de hepatopáncreas y branquias, en hieleras largas y rectangulares):

a) El animal se sacrifica solamente momentos antes de utilizarlo, mientras tanto se mantiene en un envase aparte, tapado y/o apartado del paso y vista de la gente (Fig.1, a).

b) Se coloca en un envase con agua de mar y hielo por 3 min. NOTA: NO SE COLOCA EL CANGREJO A UTILIZAR ANTES, PORQUE PUEDE AFECTAR LA CONDICIÓN DEL HEPATOPÁNCREAS Y EL PESO TOTAL DEL ANIMAL.

El animal tardará en morir alrededor de 30 min, así que solamente con estar inmóvil se puede utilizar. No puede mantenerse mucho tiempo (ej. 1 h y 30 min.) en el agua con hielo, porque no se conoce el efecto que provoque en las células de los órganos necesarios (Fig. 1, b).

c) Al concluir los 3 min. se saca del agua el cangrejo y se seca lo mejor posible (Fig.1, c).

d) Obtener el peso completo del cangrejo, anotar cualquier anomalía y/o observaciones (Fig. 1, d).

e) Medir con el Verniere Digital, largo (Fig. 1, e).

f) Medir con el Verniere Digital, ancho (Fig. 1, f).

g) Medir con el Verniere Digital, altura (Fig. 1, g).

h) Quitar los pleópodos, (se tiran en una bolsa de plástico) (Fig. 1, h).

i) Voltear al animal con la parte ventral / abdominal hacia arriba. Se empieza a hacer una incisión no muy profunda y firme, justo debajo las maxilas con las tijeras delgadas de disección. El corte debe seguirse todo alrededor de las articulaciones donde se encuentran los pleópodos, hasta llegar al final del abdomen. (Fig. 1, i). Debe de hacerse sobre hielo.

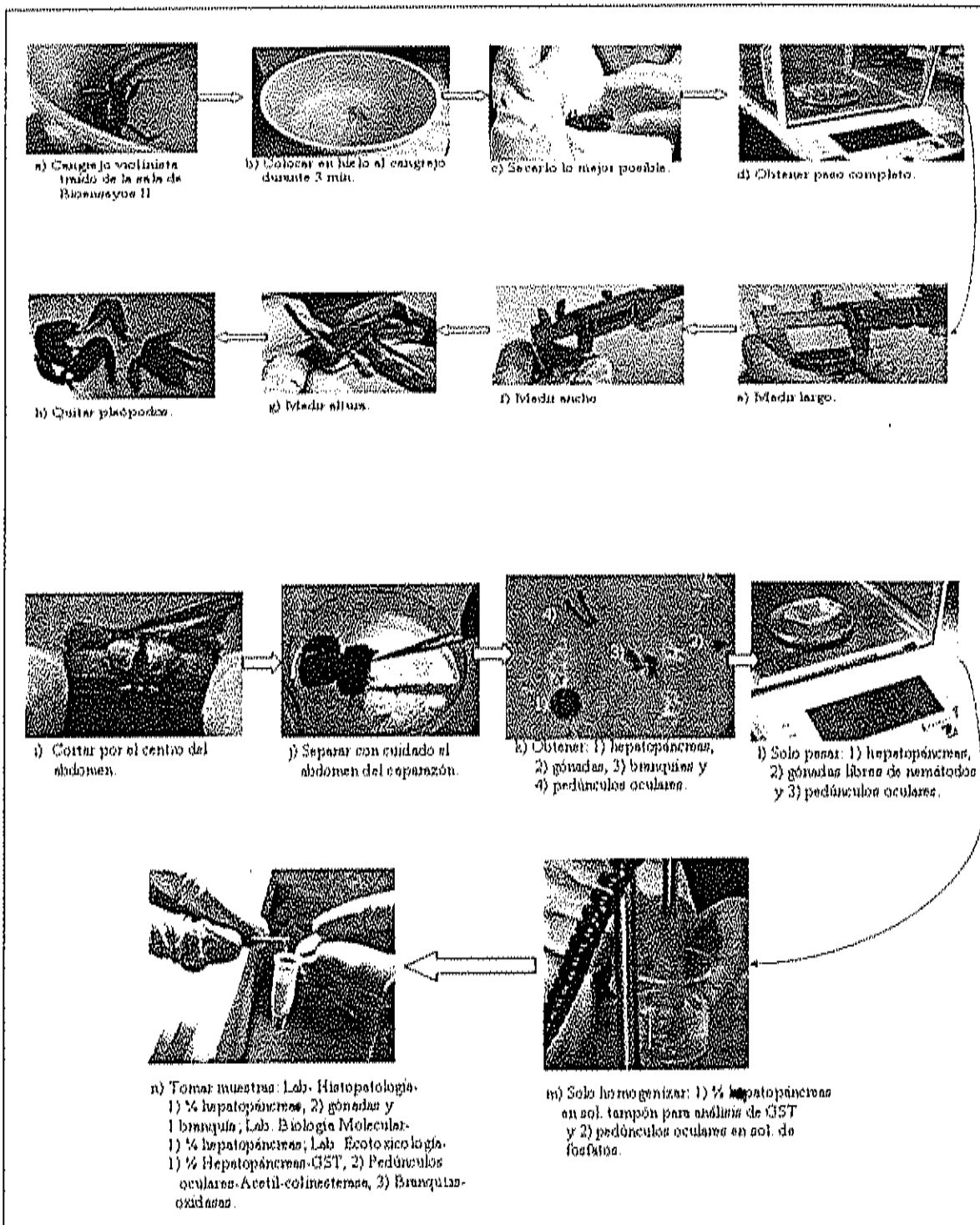


Figura 1. Disecación general de cangrejo violinista *Uca princeps*.

j) Tomar con las pinzas con mucho cuidado, justo debajo de las maxilas el abdomen; jalarlo hacia delante para separarlo del cuerpo del animal. (Fig. 1, j).

k) Obtener: 1) Hepatopáncreas (ver nota -GST), 2) Branquias, 3) Gónadas (ver nota importante-Gónadas) y 4) Pedúnculos oculares (ver nota importante Pedúnculos oculares) (Fig. 1, k). Al abrir el abdomen del animal, las branquias usualmente se quedan adheridas en la parte del abdomen que se separa del cuerpo. Sin embargo, hay veces que se pueden quedar adheridas dentro del caparacho, cerca de las maxilas, por lo que hay que buscarlas. Las branquias son de color beige, existen 3-4 branquias por animal / lado.

NOTA: en ocasiones cuando el corte del abdomen no se hace como se indica, puede las branquias pueden quedar pegadas dentro del animal en los lados derecho e izquierdo. (Fig. 1, k).

l) Pesar solo: 1) Hepatopáncreas, 2) Gónadas y 3) Pedúnculos oculares, que son los órganos que requieren ser pesados para después obtener el factor de dilución al cual se está colocando cada órgano, dependiendo de su peso (Fig. 1, l).

m) Se homogenizan en el momento y se mantienen en hielo hasta su procesamiento en la centrifuga: 1) $\frac{1}{2}$ del Hepatopáncreas-GST y 2) Pedúnculos oculares (Fig. 1, m).

n) Todas las muestras se han obtenido y deben de ser dirigidas hacia los Laboratorios correspondientes (Fig. 1, n).

NOTA IMPORTANTE-GST: Al abrir al animal, inmediatamente se debe de obtener el hepatopáncreas y las gónadas. Debe estar tarada la báscula y lista la charola en la cuál se va a pesar cada órgano.

- 1) Obtener el peso total del hepatopáncreas.
- 2) Quitar la parte que se va a utilizar para $\frac{1}{4}$ Histopatología y $\frac{1}{4}$ Biología Molecular.
- 3) El resto del hepatopáncreas se pesa nuevamente y su valor se multiplica por 20, para diluirlo 20 veces en una solución de fosfatos (ver Anexo 5). NOTA: SIEMPRE TENER

EN CUENTA QUE YA EXISTE 1 ML DE SOLUCIÓN TAMPÓN (PROTOCOLO GST) EN EL TUBO DE CENTRÍFUGA, DONDE SE COLOCA EL HEPATOPÁNCREAS. Así que el dato arrojado por la multiplicación del peso del hepatopáncreas por 20, se le restará al ml que ya tiene el tubo y únicamente se colocará el volumen restante, para completar el vol. indicado por la multiplicación.

- 4) Colocar el hepatopáncreas en el tubo de centrifuga, completar el volumen correspondiente y homogenizar a 7000 rpm x por 1 min.
- 5) Colocar el tubo con el hepatopáncreas ya homogenizado en hielo hasta tener 10 tubos, para poder colocarlos en la centrifuga de Ecotoxicología a 9000 g, 30 min. a una temperatura de 4 ° C. NOTA: habrá varias personas procesando las muestras, mientras se disecta al animal.

NOTA IMPORTANTE-Gónadas:

- 1) Extraer gónadas, separar los nemátodos que están presentes en las mismas, para evitar pesarlos, solamente se quiere obtener el peso real de gónadas.
- 2) Colocar una parte de gónadas en un tubo eppendorf en RNA Later y otra en otro tubo con Davidson para las muestras de histología.

NOTA IMPORTANTE-Pedúnculos Oculares:

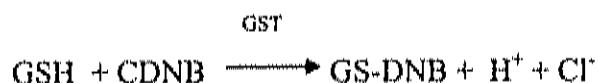
- 1) Cortar los ojos, pesarlos.
- 2) Homogenizarlos en Solución tampón con un pH 6.0, para procesarlos para la prueba de Acetil-colinesterasa.

12.4 Anexo 4.

Protocolo para cuantificar la actividad de la enzima Glutación-S- Transfersasa (GST).

- Principio del método.

La enzima GST cataliza el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutatión (GSH) sobre los grupos electrofílicos del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB). La actividad de GST se cuantifica espectrofotométricamente a $\lambda = 340$ nm del complejo formado por el glutatión y el sustrato (GS-DND) (Habig *et al.*, 1974).



- Material

- K_2HPO_4 a 0.1 M (Fosfato de Potasio dibásico).
- KH_2PO_4 a 0.1 M (Fosfato de Potasio monobásico).
- GSH a 10 mM.
- CDNB (1-Cloro-2,4-dinitrobenceno) a 60 mM.
- Albúmina de suero bovino a 0.5 mg/ml (BSA).
- Reactivo concentrado de proteínas BIORAD, dilución 1:4 con agua destilada
- Espectrofotómetro (o lector de microplacas).
- Centrífuga refrigerada
- Microbalanza (mg).
- Homogenizador de tejidos
- Hielo molido.
- Hielera.
- Jeringas de insulina.
- Microplacas (Costar 3590).

Preparación de Soluciones

a) Solución Tampón de Fosfatos 0.1 M, pH=6.5:

i) Preparar (dependiendo de lo que se necesite) ≈ 500 ml solución 0.1 M ($17.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) de K_2HPO_4 (Fosfato de Potasio dibásico).

ii) Preparar ≈ 1 L 0.1 M ($13.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) KH_2PO_4 (Fosfato de Potasio monobásico).

iii) Verter poco a poco en K_2HPO_4 (Fosfato de Potasio dibásico) en la solución de KH_2PO_4 hasta obtener un pH = 6.5. (Se prepara el doble de KH_2PO_4 ya que es la solución con la que se regula el pH de la solución tampón).

b) Solución de Glutación (GSH-MM= 307.3 g·mol-prepararse fresca): 10 mM ($3.073 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de Glutación en solución tampón fosfato.

c) Solución de 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno(CDNB-MM= 202.55 g·mol-prepararse fresca): 60 mM ($12.153 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de CDNB en etanol al 100 %.

d) Solución Reacción (preparar únicamente lo necesario, ya que se debe utilizar fresca):

	150 μl CDNB
	900 μl GSH
	<u>4950 μl</u> Sol. Tampón Fosfato
Total	6000 μl

NOTA: Una vez listas las soluciones se deben mantener a temperatura ambiente y en la oscuridad.

- **Protocolo Experimental.**

- *Procesamiento de muestras (EN FRÍO/ HIELO MOLIDO).*

- 1) Al abrir al animal, inmediatamente extraer el hepatopáncreas y pesarlo.
- 2) El hepatopáncreas pesado se coloca en un tubo de centrifuga y se diluye en una relación 1:20 (p/v) de solución tampón de fosfatos.
- 3) Una vez en el tubo de centrifuga homogenizar a 7000 rpm en hielo durante 1 minuto como máximo.
- 4) Centrifugar los homogenizados a 9000 g, 30 min. a una temperatura de 4 ° C.
- 5) Una vez centrifugados los tubos se colocan en hielo.
- 6) Retirar aprox. 1.5 ml de sobrenadante con una jeringa de insulina previamente lavada con sol. tampón, atravesar con la aguja y con cuidado la capa de grasa que se forma en la superficie para evitar contaminar la muestra. Guardar los sobrenadantes en el congelador hasta su análisis al siguiente día.
- 7) Realizar otra dilución del sobrenadante de 1:3 con solución tampón. En esta dilución se llevan a cabo los análisis de proteínas y de actividad de GST.

Determinación de proteínas

- 8) Determinar la concentración inicial de proteína total en el sobrenadante de hepatopáncreas, a través del método Bradford (1976), para lo cual se prepara una solución de con el reactivo concentrado de BIORAD a una dilución 1, BIORAD: 4, H₂O.
- 9) Preparar una solución de albúmina de bovino (BSA) a 0.5 mg/ml y preparar diluciones para hacer una curva patrón.
- 10) Realizar un mapa de ubicación de las muestras en la microplaca.

11) Leer la placa vacía a 595 nm en el espectrofotómetro (por precaución grabar e imprimir la información).

12) Llenado de la microplaca. El 1º carril siempre se mantiene vacío. Colocar por cuadruplicado en los carriles del 2 al 7 las diferentes cantidades de la solución de BSA para la curva patrón de acuerdo a la Tabla. 1.

Tabla 1. Orden en el cual deben de colocarse las muestras para la curva patrón en microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7
		$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$	$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$	$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$	$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$	$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$	$\mu\text{l BSA} +$ $\mu\text{l H}_2\text{O}$
A	VACÍA	0 + 10	2 + 8	4 + 6	6 + 4	8 + 2	10 + 0
B	VACÍA	0	2	4	6	8	10
C	VACÍA	0	2	4	6	8	10
D	VACÍA	0	2	4	6	8	10

13) Posteriormente, colocar con una pipeta multicanal, en los carriles 2-7 de la microplaca, 250 μl de solución diluida de BIORAD.

15) Esperar 15 min. y leer la placa a 595 nm en el espectrofotómetro. Es importante observar que las absorbancias sean homogéneas entre los cuadruplicados y que los valores no sean mayores a 1. Si no es el caso, hay hacer una dilución y volver a preparar otra placa.

16) Una vez obtenida la curva patrón de proteínas se colocan 10 μl del sobrenadante de cada muestra y se le adicionan 250 μl de la solución BIORAD y se sigue el mismo procedimiento que la curva patrón.

- Ensayo Enzimático GST.

17) Colocar en una microplaca a partir del carril 2 (carril 1 se queda vacío), 100 μ l de muestra por cuadruplicado.

18) Adicionar con una pipeta multicanal 200 μ l de Solución Reacción.

19) Leer en el espectrofotómetro la microplaca a 340 nm, inmediatamente después de haber vertido la solución reacción.

20) Realizar lecturas cada 30 segundos durante 10 min. a 23- 25 ° C.

Cálculos

21) Las lecturas son ingresadas a una hoja de cálculo donde se calcula:

22) La concentración total de proteínas en mg ml^{-1} . La absorbancia real de las muestras se obtiene restando los valores de absorbancia de las muestras y de la curva patrón, de los valores de la placa vacía.

23) Una vez obtenidos los datos anteriores se calcula la concentración de proteína presente en las muestras. Con los datos de absorbancia de la curva patrón y la concentración conocida de BSA (mg/ml) hacer una regresión lineal y obtener la ecuación de la recta.

24) Con los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) de la regresión lineal, se calcula la concentración de proteína en las muestras.

$$[x] \text{ proteína} = ((\text{absorbancia de muestra (y)} * \text{ordenada al origen (b)}) / \text{pendiente (m)})$$

25) Los cálculos de la actividad de la GST se expresan de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta A \cdot 10^3}{\epsilon (9.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})} \cdot \frac{\text{Vol}(\text{microcelda}) \mu\text{l}}{\text{Vol}(\text{muestra}) \mu\text{l}} \cdot \frac{1}{\text{prot}(\text{mg / ml}) * b} = \text{nmol/min/mg prot.}$$

ΔA = Diferencia de absorbancias de los tiempos a comparar, en este caso el tiempo transcurrido entre la 15^{ava} lectura –las absorbancias al tiempo 0.

ϵ = Coeficiente de extinción molar de la reacción GS-DNB 9, $600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b = Espesor de la microcelda corresponde a 0.9 cm.

Volumen total de la microcelda = $300 \mu\text{l}$

Volumen de la muestra = $100 \mu\text{l}$

12.5 Anexo 5.

Experimentación a la 2^o semana del Bioensayo y Preliminar.

Existieron mortalidades en el tratamiento U3 en las javas 17 y 22 de los cuales se realizó de emergencia el análisis del ensayo cometa (Fig. 1), en donde se encontró una disminución en los hemocitos dificultando el conteo para esta cuestión.

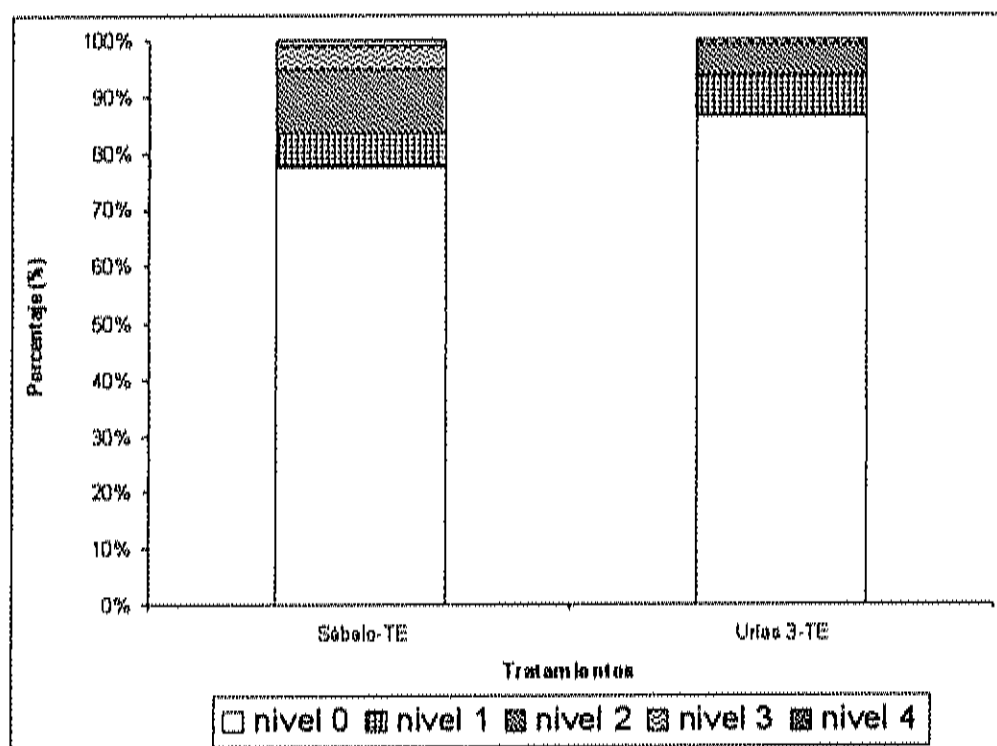


Figura 1. Daño al ADN, expresado en porcentajes acumulados, en hemocitos de *Uca princeps* expuesto a sedimentos contaminados al T7=Día 7-Tiempo de Emergencia (TE). El nivel 0 se refiere a que no existe daño, mientras que el nivel 4 es un daño severo.

No existieron diferencias significativas entre el sedimento de referencia y el sedimento proveniente al lado de la sardinera (U3), adicionalmente se muestra un bajo nivel de células dañadas, lo cual sugiere que la muerte que estaba presentándose en las javas problema se debió como se vió en la parte de resultados a otras cuestiones ambientales como el aumento de amonio en sedimento y agua, probablemente a microorganismos descomponedores.

Con ese antecedente, se tomaron muestras de agua, sedimento e inclusive hemolinfa de organismos de la java 3-U3 y de la java 5-Sábalo, con el propósito de realizar el conteo total de hemocitos en la hemolinfa y cultivarla junto con el agua y el sedimento en medio TCBS, específico para el crecimiento de *Vibrio sp.*, ya que uno de los signos de su presencia es la disminución de hemocitos en la hemolinfa. El agua y sedimentos también fueron cultivados en agar marino en donde crecen en general la mayoría de las bacterias presentes, solamente funciona como una prueba semi-cuantitativa para conocer la abundancia de bacterias en las muestras. A continuación en la Tabla 1 se muestran los resultados de los análisis bacteriológicos.

Tabla 1. Resultados bacteriológicos de análisis de hemolinfa, al igual que algunos sedimentos y agua de diferentes tratamientos de jivas problemáticas en donde se registraron mortalidades de cangrejos violinistas *Uca princeps* al día 7.

Muestra	Medio de cultivo	
	TCBS (UFC/ml)	Agar marino (UFC/ml)
Agua Tanque	1×10^2	3×10^3
Agua Sábalo-J5	2×10^4	1.1×10^4
Agua Urías 3-J17	8.3×10^3	5.8×10^4
Agua Urías 3-J3	4×10^3	9.6×10^3
Sedimento Sábalo-J5	2.7×10^4	3.25×10^5
Sedimento Urías3-J17	2.8×10^3	3.6×10^6
Sedimento Urías3-J3	3.6×10^3	4.2×10^5
Hemolinfa-U3	2.0×10^3	6×10^5
Hemolinfa-S	1×10^2	NO se sembró
	NO hubo crecimiento	NO se sembró

Se debe notar que las unidades formadoras de colonias en el tanque que distribula el agua a todo el sistema, fue el que presentó la menor cantidad de bacterias.

Al realizarse los conteos totales de hemocitos en la hemolinfa, se encontraron valores para el tratamiento de referencia entre 2, 310, 000-3, 910,000 células/ ml, mientras que en Urías 3 los valores fueron de 1, 080, 000-1,060,000 células/ml. Se encontró una disminución notable de hemocitos circulantes en la hemolinfa, lo que podría ser explicado

por la presencia de alguna infección bacteriana (Lightner, 1996) o por el aumento de amonio que se presentó en el sedimento y agua de esas jivas (Le Moullac y Haffner, 2000).

En un experimento donde se aumentó el amonio en dos dosis 1.5 y 3.0 mg ml⁻¹ versus el control, se observó que en la concentración de 1.5 mg l⁻¹ la cantidad de hemocitos disminuyó en un 15 % y en la concentración de 3.0 mg ml⁻¹ disminuyó en un 50 %, al mismo tiempo la producción de melanina por el sistema profenoloxidasa y peroxinectina disminuyeron en un 60 y un 50 % en respuesta al estrés, que también ayudan a combatir a los agentes microbianos o heridas. Debido a la disminución de hemocitos, el potencial de fagocitosis se ve aminorado, así como otras capacidades antibacterianas (Le Moullac y Haffner, 2000).

Con ello se podría explicar la disminución de hemocitos y la presencia de *Vibrio sp.* en la hemolinfa del organismo de U3, pues una vez que disminuye la actividad inmune del animal por estrés ambiental, en este caso el incremento de amonio en sedimento y agua, cualquier agente microbiótico oportunista puede proliferar, sin que el sistema inmune lo detenga. No obstante, los valores de *Vibrio sp.* están por debajo del tratamiento de referencia, tanto en el agua, como en el sedimento. Lo que probablemente indique que efectivamente el aumento de amonio, aunado a la presencia de uno o varios xenobióticos en el sedimento, afectaron el sistema inmune de los organismos específicamente en dos de tres jivas de ese mismo tratamiento. Por lo tanto, también se sugiere que la homogenización de los sedimentos para ese tratamiento no fue equitativa.

Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis de la actividad del grupo de enzimas Glutación-S-Transfersasas en estos mismos organismos, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los organismos expuestos al sedimento de referencia y al sedimento de U3.

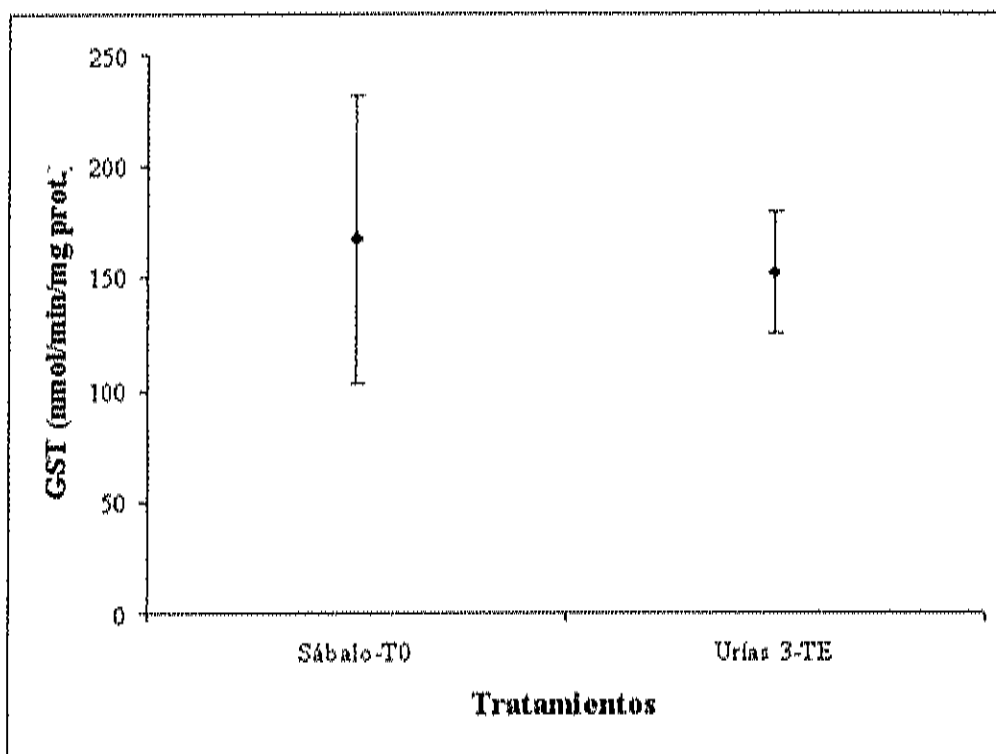


Figura 2. Actividad del grupo de enzimas Glutación-S-Transferasas en *Uca princeps* al T7= Día 7 (Tiempo de Emergencia -TE) de exposición a los sedimentos de referencia (Sábalo) y Urías 3 (U3).

Para encontrar un control positivo para la actividad de Glutación-S-Transferasa se llevó a cabo la exposición de *Uca princeps* durante 5 días a dos hidrocarburos Diesel (1.46 ml/L) y β -naftoflavona (BNF) ($413 \mu\text{M}$), junto con sedimento del Estero de Urías y del Estero del Sábalo (Fig.3). Gravatos y Santos (2002) encontraron actividad de este grupo de enzimas en la lubina (pez marino) a una concentración de $2.7 \mu\text{M}$ BNF, a partir de esa concentración en el presente trabajo se fue aumentando la concentración de BNF hasta ver inducción en los organismos sobre la actividad de: a) grupo de enzimas Glutación-S-transferasas, b) ensayo cometa y c) donde los organismos sobrevivieran.

Una vez obtenidos los datos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos debido a la variabilidad de la respuesta entre los organismos, sin embargo es claro que hubo un aumento aproximado del 290 % de la actividad de la GST en el tratamiento con BNF, con respecto a los organismos expuestos al sedimento del Sábalo.

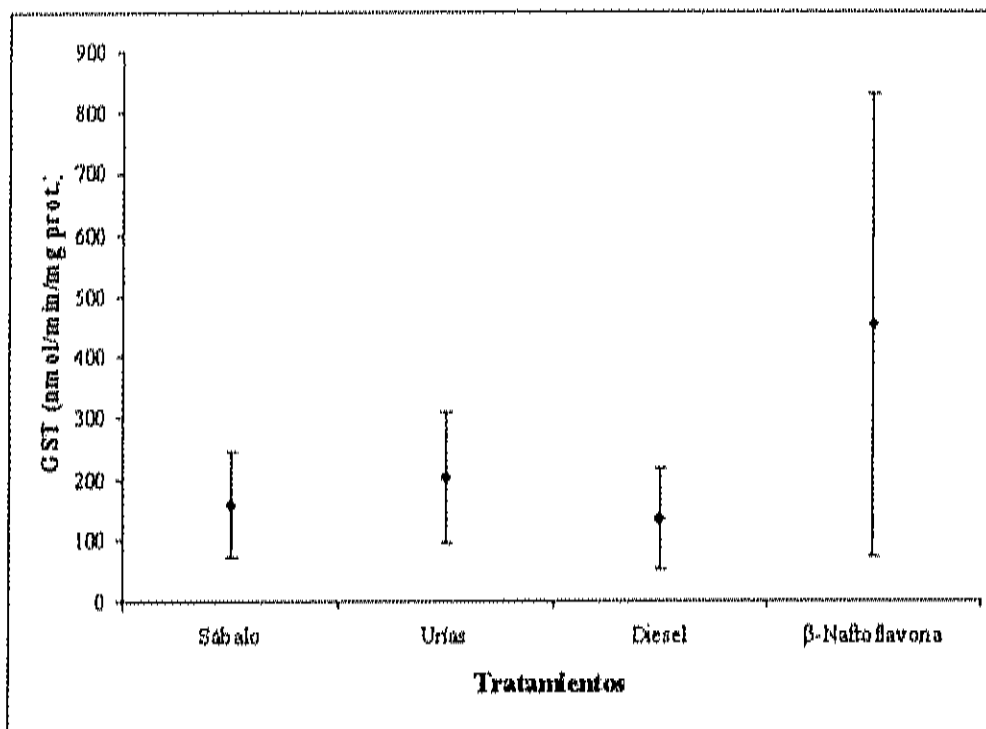


Figura 3. Actividad del grupo de enzimas Glutación-S-Transferasas en *Uca princeps* expuestos a sedimentos del Estero del Sábalo, Estero de Urias y sedimento del Estero del Sábalo donde se incorporó Diesel y β -nafto flavona.

Esto sugiere que este químico activó este grupo de enzimas a los cinco días de exposición, lo cual significa que los organismos tuvieron disponible el químico en su cuerpo, al grado que empezó a activarse el grupo de enzimas de la GST. Asimismo, en la Fig. 4 se muestra el porcentaje acumulado de células dañadas en el ensayo cometa en los hemocitos de *Uca princeps* se observa una tendencia de aumento de daño en los tratamientos con Diesel y BNF, observándose mayormente un daño severo en los hemocitos de los organismos de BNF.

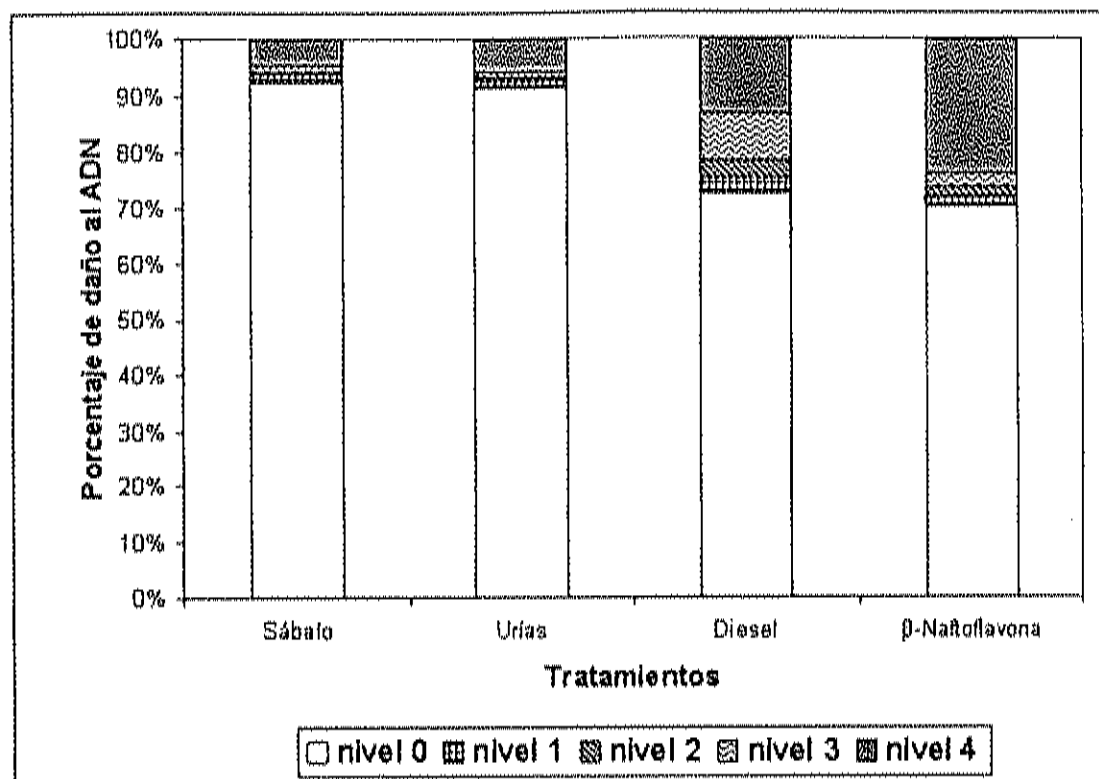


Figura 4. Daño al ADN en hemocitos de *Uca princeps* expuestos a sedimentos contaminados. Expresado en porcentajes acumulados con 4 diferentes sedimentos, Sábalo (Referencia); Uria; Sábalo+Diesel, Sábalo+BNF- β -naftoflavona. El nivel 0 se refiere a que no existe daño, mientras que el nivel 4 es un daño severo.

Por tales razones, se trabajó con β -naftoflavona a una concentración de 413 μ M.