



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

---

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN**

**CIENCIAS AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL BAZO DE SAPO GIGANTE  
(*RHINELLA MARINA*), EXPUESTO A UNA MEZCLA DE CONTAMINANTES EN  
LA ZONA DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.**

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

**PRESENTA:**

**Q.F.B. MARÍA EUGENIA PÉREZ FRAGOSO**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA**

**DRA. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ**

**COMITÉ TUTELAR:**

**DRA. MARÍA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMA MULTIDISCIPLINARIO DE POSGRADO EN  
CIENCIAS AMBIENTALES**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL BAZO DE SAPO GIGANTE  
(*RHINELLA MARINA*), EXPUESTO A UNA MEZCLA DE CONTAMINANTES EN  
LA ZONA DE COATZACOALCOS, VERACRUZ.**

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

**PRESENTA:**

**Q.F.B. MARÍA EUGENIA PÉREZ FRAGOSO**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA.**

**DRA. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ.**

**SINODALES:**

**PRESIDENTE:**

**DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA** \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:**

**DRA. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ** \_\_\_\_\_

**VOCAL:**

**DR. ISRAEL RAZO SOTO** \_\_\_\_\_

**PROYECTO REALIZADO EN:  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.**

**CON FINANCIAMIENTO DE:**

**ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DEL BAZO DE *RHINELLA MARINA* (SAPO GIGANTE)  
EXPUESTO A MEZCLAS DE CONTAMINANTES EN LA ZONA DE COATZACOALCOS,  
VERACRUZ.  
C09-FAI-03-16.16**

**MONITOREO AMBIENTAL, DETERMINANTES DE LA EXPOSICIÓN Y EFECTOS DE  
CONTAMINANTES CRÍTICOS EN HUMANOS Y BIOTA EN COATZACOALCOS,  
VERACRUZ.  
INE/A1-047/2007**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)  
BECA-TESIS (CONVENIO No. 265964/217867)**

# Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	9
1.1	Compuestos tóxicos: situación global.....	9
1.1.1	Contaminantes en México. ....	10
1.2	Ecotoxicología. ....	16
1.2.1	Biomarcadores. ....	17
1.3	Los anfibios. ....	22
1.3.1	Características fisiológicas y comportamiento. ....	22
1.3.2	Sapo gigante ( <i>Rhinella marina</i> ). ....	23
1.4	El bazo. ....	26
1.4.1	Descripción.....	26
1.4.2	Morfología.....	26
1.4.3	Función.....	27
2	JUSTIFICACIÓN .....	28
3	HIPÓTESIS.....	28
4	OBJETIVO GENERAL.....	29
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
6	MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
6.1	Muestras biológicas. ....	29
6.2	Equipo. ....	29
6.3	Reactivos.....	30
6.4	Metodología.....	31
6.4.1	Descripción de la zona de estudio. ....	31
6.4.2	Muestreo.....	32
6.4.3	Análisis histológico.....	34
6.4.4	Análisis morfométrico.....	35
7	RESULTADOS .....	36
7.1	Análisis histológico.....	36
7.1.1	Análisis cualitativo.....	38
7.1.2	Análisis morfométrico.....	44
7.2	Análisis estadístico.....	52

8	DISCUSIÓN .....	54
9	CONCLUSIONES.....	60
10	ANEXO I.....	62
10.1	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES .....	62
10.1.1	Fijador .....	62
10.1.2	Preparación de alcoholes.....	62
10.1.3	Preparación de laminillas.....	62
10.1.4	Técnica de Hematoxilina-Eosina.....	63
10.1.5	Técnica de Fontana-Masson.....	64
10.1.6	Técnica de Perls.....	65
10.1.7	Técnica de Gomori.....	66
11	ANEXO II.....	68
11.1	Preparación de laminillas.....	68
12	ANEXO III.....	69
12.1	TINCIONES.....	69
12.1.1	Técnica de Hematoxilina – Eosina.....	69
12.1.2	Técnica de Fontana-Masson.....	69
12.1.3	Técnica de Perls (1867).....	70
12.1.4	Técnica de Gomori (1950).....	71
13	NOMENCLATURA .....	72
14	REFERENCIAS.....	74

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de la producción de hemosiderina.....	20
<b>Figura 2.</b> Sapo gigante adulto. ....	24
<b>Figura 3.</b> Distribución mundial del sapo gigante. ....	24
<b>Figura 4.</b> Ubicación anatómica del bazo en sapos gigantes.....	26
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de la histología del bazo.....	26
<b>Figura 6.</b> Localización de Coatzacoalcos, Veracruz, México.....	31
<b>Figura 7.</b> Localización de zonas de muestreo .....	33
<b>Figura 8</b> Diagrama de procesamiento de muestras.....	34
<b>Figura 9.</b> Metodología para el análisis de imágenes.....	35
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografías de la morfología general del bazo de sapo gigante.....	36
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografías de los CMM en el bazo de sapo gigante. ....	37
<b>Figura 12.</b> Bazo de sapo gigante de la zona rural.. ....	38
<b>Figura 13.</b> Bazo de sapo gigante de la zona urbana-industrial.. ....	39
<b>Figura 14.</b> Bazo de sapo gigante de la zona industrial.....	40
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografías de bazo de sapo gigante de la zona rural.. ....	41
<b>Figura 16.</b> Bazo de sapo gigante de la zona urbana-industrial. ....	42
<b>Figura 17.</b> Bazo de sapo gigante de la zona industrial.....	43
<b>Figura 18.</b> Bazo de sapo gigante.....	44
<b>Figura 19.</b> Gráfica de NCMMM: número de CMM con melanina por tipo de sitio.....	45
<b>Figura 20.</b> Gráfica de %ACMMM: porcentaje de área ocupada por CMM con melanina por tipo de sitio.....	46
<b>Figura 21.</b> Gráfica de TCMMM: tamaño promedio de los CMM con melanina por tipo de sitio.....	47
<b>Figura 22.</b> NCMMH: Número de CMM con hemosiderina por tipo de sitio.....	48
<b>Figura 23.</b> %ACMMH: Porcentaje de área ocupada por CMM con hemosiderina por tipo de sitio.....	49
<b>Figura 24.</b> TCMMH: Tamaño de CMM con hemosiderina por tipo de sitio.....	49
<b>Figura 25.</b> NCMLL: Número de CMM con lipofuscina por tipo de sitio. ....	50
<b>Figura 26.</b> %ACMLL: Porcentaje de área ocupada por CMM con lipofuscina por tipo de sitio.....	51
<b>Figura 27.</b> TCMLL: Tamaño de CMM con lipofuscina por tipo de sitio. ....	51
<b>Figura 28.</b> Gráfica de correlación entre pigmentos.....	52
<b>Figura 29.</b> Gráficas de correlación entre pigmentos.....	53

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Industrias presentes en la zona de Coatzacoalcos y sus productos. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Resultados obtenidos para cada indicador en cada sitio. ....	45
<b>Tabla 3.</b> Concentración de contaminantes en hígado y sangre de sapo gigante.....	54

## RESUMEN

Los centros de melano macrófagos (CMM) son acumulaciones de células pigmentadas, que pueden encontrarse en el parénquima de órganos como el hígado, el riñón, el bazo y las gónadas de peces, anfibios y reptiles. Se ha reportado que los CMM de peces, se ven incrementados como consecuencia de la exposición a sustancias tóxicas, así como por la edad, época del año, periodo reproductivo, nutrición y enfermedades. Los pigmentos que contienen son: melanina, hemosiderina y lipofuscina. (Agius y Roberts, 2003).

Los anfibios como el sapo gigante, se caracterizan por poseer una piel permeable y porque su ciclo de vida es tanto acuático como terrestre. Ecológicamente, los sapos ayudan a controlar ciertas plagas, ya que se alimentan de insectos, así como de otros objetos (Zug y Zug, 1979); por lo que estos organismos, representan una parte fundamental del ecosistema, así como varias vías y rutas de exposición.

Se realizó la cuantificación de los CMM en cortes histológicos del bazo de los sapos gigantes de la zona de Coatzacoalcos, Veracruz, (N=70), teñidos con tres técnicas histoquímicas para identificar los pigmentos que contienen. Las muestras se agruparon en tres tipos de sitios de acuerdo con el tipo de actividad que se desarrolla en cada uno: industrial, urbano-industrial y rural. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los CMM de los tres grupos antes mencionados (ANOVA  $P > 0.05$ ) para ninguno de los pigmentos, sin embargo, se observó que en la zona industrial, los resultados de hemosiderina y la lipofuscina tienden a presentar mayor variabilidad, siendo la zona rural donde los datos se presentaron de forma más homogénea. Mientras que en el caso de la melanina, la zona urbana-industrial es donde se presenta la mayor variabilidad en los resultados. Es importante mencionar que la dispersión de los resultados, hace referencia a la variabilidad de exposición y a la susceptibilidad de los individuos en las zonas impactadas.

Aunque los resultados obtenidos, no fueron contundentes en cuanto a la utilidad de los CMM como biomarcadores en los sapos gigantes; no se descarta la utilidad de estos, ya que probablemente la exposición a los contaminantes, fue similar entre los sitios, ya que las condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc.) y las características fisicoquímicas de los contaminantes favorecen su dispersión de un lugar a otro. (Walker, 2009). Aunado al hecho de que los CMM son biomarcadores inespecíficos y que por tanto pueden estar respondiendo a otros factores tanto internos como externos. (Montero y cols., 1999; Jordanova y cols., 2006; Rosseland y cols., 2007; Kranz, 1989).

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1.1 Compuestos tóxicos: situación global.

El desarrollo tecnológico ha traído consigo grandes beneficios para la humanidad: energía, electricidad, aumento en la producción de alimentos, salud, entre otros. Sin embargo, todos estos avances conllevan un costo ambiental, como la emisión de gases y compuestos de desecho al medio ambiente, contaminando así el aire, el suelo y el agua, lo que puede ocasionar daños severos en los seres vivos incluyendo el hombre. (Commoner, 1992). Algunas sustancias de desecho pueden ser tóxicas para los organismos que se encuentran en contacto con ellos. Un compuesto tóxico, es aquel que tiene la capacidad de ocasionar daño, de intoxicar o en casos extremos hasta de causar la muerte de un organismo vivo. Sin embargo, esta capacidad depende de diversos factores como: el tiempo y la ruta de exposición, la dosis, las condiciones del individuo receptor, etc. (Nebel y Wright, 2000).

En la actualidad existen una gran variedad de agentes tóxicos, algunos de forma natural como los metales pesados, entre ellos Pb, Hg, Cd, Mn y metaloides como el As, por ejemplo. Sin embargo, a partir de la revolución industrial y el inicio de la química orgánica en 1828 con los experimentos de Wöhler, se produjo un incremento masivo en la cantidad y el número de sustancias nuevas y nocivas en el mundo. (Commoner, 1992).

Se ha calculado que en el año 2000 existían 70 000 sustancias químicas en el mercado, muchas de ellas son capaces de ingresar al organismo y causar efectos nocivos. Se ha reportado que una persona estadounidense común presenta en su tejido graso al menos 700 sustancias exógenas. (Thornton, 2000).

El Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos (USNTP, por sus siglas en inglés) realiza evaluaciones y perfiles toxicocinéticos de 10 a 20 compuestos nuevos cada año, sin embargo la forma acelerada con la que aparecen nuevas sustancias impide un avance real, ya que la industria química del mundo produce de 500 a 1000 químicos nuevos por año. Esto implica que de la mayoría de los nuevos compuestos químicos producidos, se desconocen sus efectos o bien están subestimados. (Thornton, 2000).

A pesar de los intentos por desarrollar tecnologías y procedimientos que reduzcan las emisiones y mitiguen los impactos de los contaminantes en el ambiente, en muchas ocasiones éstos métodos no son suficientes, ya que el problema que se enfrenta es la presencia de

contaminantes de forma global, que no son selectivos y que pueden dañar la biosfera. (Thornton, 2000).

### **1.1.2 Contaminantes en México.**

Se estima que en México se utilizan alrededor de cien mil compuestos químicos para diferentes fines, y que de éstos únicamente entre mil y dos mil, resultan peligrosos. Sin embargo, resulta muy arriesgado decir que el resto de las sustancias son inofensivas y que no representan riesgo alguno para la salud, si no se cuenta con bases científicas que lo confirmen. Las empresas que pertenecen al Padrón de Generadores de Residuos Peligrosos (27 465 industrias) reportaron que para el periodo de 2004 a 2008, se generaron un millón veinticinco mil ciento veintiocho toneladas de residuos peligrosos, dentro de los que se encuentran las sustancias tóxicas. (SEMARNAT, 2009).

Para el año 2004, se tenían registrados 297 zonas contaminadas con compuestos peligrosos, de los cuales 119 estaban caracterizados y 12 de ellos estaban rehabilitados o en el proceso. Cuatro años después, en el 2008, se incrementó el número de sitios contaminados a 333. La industria química y petroquímica del país aporta la mayor parte de la materia prima para otras industrias, tan solo en el año 2006 el 40.5 % de los 19.6 millones de toneladas de compuestos químicos corresponden a petroquímicos de PEMEX. (SEMARNAT, 2009).

Además de la industria química y petroquímica, la minería representa otra importante fuente de contaminantes. Aunado a esto, se presentan diversos accidentes o derrames de compuestos tóxicos durante el transporte y manejo de la producción. Se calculó que entre 1997 y 1999 se presentaron alrededor de 550 de estas emergencias al año en el país, donde el 40% correspondieron al manejo del petróleo crudo y otro 27% a los combustibles. (INE, *fuentes de contaminación en México*, 2010).

En la zona aledaña al río Coatzacoalcos, se ubican diversos complejos de PEMEX de gran importancia para el país debido a la magnitud de su producción, así mismo, este sitio ha sido considerado como uno de los más contaminados del país, debido a las emisiones, derrames y accidentes ocurridos en la zona. (Bozada y Bejarano, 2006).

### 1.1.2.1 Problemática ambiental de Coatzacoalcos.

La instalación de los complejos petroquímicos e industriales, así como el crecimiento de las zonas urbanas ocasionaron la pérdida de las condiciones naturales en los alrededores del río Coatzacoalcos. El sistema de ductos, el transporte de los hidrocarburos y los accidentes han ocasionado graves problemas al sitio. (Bozada y Bejarano, 2006).

Actualmente, la zona de Coatzacoalcos se considera como uno de los centros industriales más importantes del país, donde destacan las industrias químicas y petroquímicas. A continuación se mencionan algunas de ellas y sus productos:

Tabla 2. Industrias presentes en la zona de Coatzacoalcos y sus productos. (Bozada y Bejarano, 2006; PEMEX, 2010).

EMPRESA	PRODUCTO
PEMEX Petroquímica: los complejos de Cangrejera, Morelos y Pajaritos. PEMEX Refinación PEMEX Gas y Petroquímica Básica.	Petróleo crudo e hidrocarburos derivados. Además de: Acetaldehído, estireno, etileno, oxígeno, polietileno, óxido de etileno y cloruro de vinilo II y III.
Agronitrogenados, S.A. A.W. Troy, S.A.	Agroquímicos y fertilizantes.
Cloro de Tehuantepec, S.A. Industrias Químicas del Istmo, S.A.	Cloro y sosa cáustica.
Grupo Idesa Celanese Mexicana, S.A. Industrias Cydsa-Bayer, S.A., Resirene, S.A. Productos Químicos Coin, S.A.	Producción y distribución de productos químicos y petroquímicos.
Sales del Istmo	Producción de sal.

El crecimiento industrial, ha traído consigo el desarrollo de la zona urbana y los desechos generados por la población han sido vertidos a las aguas del río Coatzacoalcos, por lo que, estudios microbiológicos realizados a sus aguas, han demostrado la presencia crónica de contaminación microbiológica; hay que añadir la problemática de los incendios forestales en la zona de los humedales, además del uso de plaguicidas para el control de vectores. (Bozada y Bejarano, 2006).

En un estudio realizado por la red internacional para la eliminación de los compuestos orgánicos persistentes (IPEN, International POPs Elimination Network) en las zonas aledañas al complejo petroquímico de Pajaritos, demostró que los huevos de gallina que se producen en

el lugar presentan altos niveles de dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs) y hexaclorobenceno (HCB), esto muy por encima de los niveles observados en Europa y los establecidos por Estados Unidos de América.

El análisis químico de sedimentos de la zonas aledañas al complejo petroquímico Pajaritos, realizado por Stringer y cols., (2001) observaron que aguas arriba de la zona de descarga de desechos, las concentraciones de los contaminantes son bajas y en algunos casos no detectables, encontrando únicamente zinc, manganeso y 1,4-diclorobenceno. Las muestras de sedimento obtenidas aguas debajo de la zona de descargas mostraron la presencia de: 1,2-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno, dietil ftalato, hexaclorobenceno (HCB) y 9 hidrocarburos alifáticos además de mercurio, cobre, zinc, cromo y plomo. Siguiendo ese curso aguas abajo, la muestra de sedimento registró un aumento en la concentración de contaminantes sobre todo en lo que se refiere a mercurio, cobre, plomo y zinc, además de que se reportan más de 100 compuestos orgánicos detectables de los cuales se identificaron 9 clorobencenos, 3 PCBs y diversos hidrocarburos. Los análisis en diferentes puntos en los alrededores del complejo petroquímico Pajaritos muestran variaciones en la composición de la mezcla de contaminantes, sin embargo es claro que las aguas y sedimentos en las zonas arriba de la descarga presentan una menor cantidad de contaminantes y a concentraciones menores. (Stringer y cols., 2001).

Ruelas-Inzunza y cols., (2007), estudiaron peces que habitaban en el río Coatzacoalcos y encontraron plomo en músculo, branquias e hígado, así como en almejas. Donde las concentraciones más altas encontradas se registraron en el riachuelo San Francisco, mientras que las más bajas se presentaron en la laguna El Ostión, considerada como sitio de referencia. También se realizó la determinación de plomo en tejidos de almejas, y se demostró que las concentraciones más altas se presentaron en las muestras recolectadas del río Calzadas, comparadas con el sitio de referencia (Hidalgotitlán).

El informe técnico del proyecto: "Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México: caso de estudio Coatzacoalcos, Veracruz" INE, (2007), reportó la presencia de los siguientes metales en suelo y sedimento: Al, As, Be, Cd, Cr (VI), Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Ti y V, sin embargo ninguno de ellos se encontró por arriba de los niveles de la NOM-147-SEMARNAT/SSA-2004. Además se detectó la presencia de los siguientes compuestos orgánicos persistentes (COPs): HCB, alfa-HCH, beta-HCH, lindano, DDT, DDE, mirex y varios congéneres de PCBs. El análisis

químico de las muestras biológicas demostró que la mayor parte de estos contaminantes se encuentra en forma biodisponible.

La presencia de metales y COPs en Coatzacoalcos (aun en niveles por debajo de la norma) sugieren la presencia de una mezcla muy compleja de contaminantes.

#### 1.1.2.1.1 Contaminantes orgánicos.

Cuando se habla de contaminación por compuestos orgánicos, se hace referencia principalmente a sustancias químicas creadas de forma sintética por el hombre. Existen además otros contaminantes orgánicos que se pueden encontrar de forma natural, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) o la forma orgánica del mercurio. (Walker, 2009). Dentro del grupo de los compuestos orgánicos, podemos encontrar a los COPs, los cuales son químicos sintéticos que pueden persistir por largo tiempo en el ambiente, bioacumularse y biomagnificarse, así como causar efectos tóxicos en los organismos expuestos. (UNEP, consultado 2010). La bioacumulación es un término utilizado para referirse a la concentración de un compuesto o elemento químico (generalmente orgánico) que presenta un organismo, y que suele ser mayor a la concentración presente en el medio en el que habita. La magnitud a la que un agente tóxico puede bioacumularse depende de la absorción y la vía por la cual se llevó a cabo, los procesos de metabolismo y excreción, el contenido graso del organismo, la polaridad de la sustancia, otros factores biológicos, físicos y ambientales. Se puede decir de forma general que cuanto mayor sea la hidrofobicidad de una sustancia, su bioacumulación aumentará de forma proporcional, si se expresa través del coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), tanto mayor sea su valor, el compuesto tendrá una mayor bioacumulación. (USGS, *bioaccumulation*, 2010). Por otro lado, la biomagnificación es el término usado para referirse a la bioacumulación de una sustancia a través de la red trófica, es decir, los organismos que se encuentran en los últimos niveles (consumidores terciarios), van a presentar mayores concentraciones de éste compuesto en su organismo que aquellos que son su alimento. (USGS, *biomagnification*, 2010).

Algunos de los COPs fueron creados intencionalmente, sin embargo otros son productos alternos de diferentes procesos y tienen usos diversos, sobretodo como plaguicidas y algunos aditivos. (EPA, *POPs*, 2010). Originalmente, los compuestos considerados como COPs por el convenio de Estocolmo son: aldrín, clordano, dieldrín, dioxinas, DDT, endrín, furanos, heptaclor, HCB, mirex, PCBs y toxafeno. (UNEP, consultado 2010). Se han agregado

recientemente a la lista: clordecano, hexabromodifenil, hexabromodifenil éter, heptabromodifenil éter,  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, pentaclorobenceno, ácido perfluorooctano sulfónico, fluoruro perfluorooctano sulfonil, tetrabromodifenil éter y pentabromodifenil éter. (Stockholm convention on persistent organic pollutants POPs, consultado 2010).

Los efectos tóxicos de los contaminantes orgánicos, son muy diversos y dependen de varios factores como son: la duración, frecuencia, dosis, vía y ruta de exposición, así como las propiedades fisicoquímicas del compuesto; y en los organismos influye el sitio de acción (órgano blanco), tipo de metabolismo, así como el sitio de almacenamiento. (Walker, 2009).

Los PAHs son productos de la combustión incompleta de materia orgánica, debido a ello son contaminantes ubicuos. Éstos tienen la capacidad de bioacumularse sin embargo, debido a que se metabolizan rápidamente en el organismo, no se biomagnifican. (IARC monographs, consultado 2010). Pueden ocasionar problemas reproductivos en ratas expuestas durante la gestación, así como en sus crías. También, éstas pueden presentar defectos congénitos y bajo peso al nacimiento. (ATSDR, 1996).

Por otro lado, estudios de laboratorio han demostrado una serie de alteraciones inmunológicas (atrofia del timo y del bazo, baja respuesta de los anticuerpos y susceptibilidad a infecciones virales), en organismos expuestos a la mezcla comercial de PCBs (Aroclor). (ATSDR, 2001). Bursian, y cols., (2006), reportan la proliferación de células escamosas en mandíbulas y maxilar de peces juveniles de la especie *Mustela vison*, expuestos a PCBs (0.96  $\mu\text{g/g}$  de alimento) y la equivalencia tóxica de la dioxina TCDD (9.2  $\text{pg/g}$  de alimento), además sugieren que un aumento de la dosis, podría ocasionar la pérdida de los dientes, lo cual disminuiría la supervivencia de éstos organismos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, (IARC, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos de América (EPA, por sus siglas en inglés) los han clasificado como probables cancerígenos para seres humanos. (ATSDR, 2001).

Dentro de los compuestos orgánicos volátiles podemos encontrar al benceno, el cual está clasificado como un agente cancerígeno por la IARC y la EPA, se sabe que en humanos puede ocasionar leucemia mieloide aguda. (ATSDR, 2007).

El mercurio es un elemento metálico que se encuentra de forma líquida en la naturaleza. En un estudio controlado realizado por Devlin, (2006), en el cual se expuso a embriones de peces de la especie *Pimephales promelas*, a diversas concentraciones de metil mercurio, se

registró el desarrollo de deformaciones de la columna vertebral de los peces, así mismo, tejido desorganizado en la aleta media, edema en el pericardio, malformaciones cardíacas, mandíbula inferior más pequeña y microoftalmia. Meinelt, y cols., (1997), reportan la existencia de correlación positiva entre la concentración de metil mercurio y el número de centros de melano macrófagos (CMM) en hígado, bazo y riñón de peces de la especie *Esox lucius* del río Oder.

Existe una gran cantidad de plaguicidas, que incluyen los insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, etc. (Walker, 2009). Químicamente podemos mencionar los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, etc. Muchos plaguicidas, sobre todo los organoclorados, son altamente persistentes y por lo tanto se bioacumulan y biomagnifican comúnmente. Por ejemplo, el DDT y sus metabolitos pueden ocasionar daños en los procesos reproductivos y de desarrollo, debido a que tienen actividad estrogénica. Se ha registrado que en algunas aves como el águila calva el DDT ocasiona el adelgazamiento de los cascarones de huevo, infertilidad y fetotoxicidad. (EPA, POPs, 2010).

Shenoy, y cols., (2009), realizaron un estudio con larvas de la especie *Rana pipens*, exponiéndolas de forma controlada y por separado a endosulfán (organoclorado) y mancozeb (carbamato) (0.2 µg/L y 16 µg/L, respectivamente) y encontraron que a esas concentraciones inhiben el desarrollo de las larvas y pueden ser letales. Un estudio realizado por Hayes y cols., (2006), reportan daño en el timo e inmunosupresión en ranas de la especie *Rana pipens* como consecuencia de la exposición a nueve plaguicidas (cuatro herbicidas, dos fungicidas y tres insecticidas), los mismos plaguicidas fueron administrados individualmente, y se observó que algunos disminuían el desarrollo de las larvas, sin embargo, comparando con los efectos generados por la mezcla, éstos fueron menores.

#### 1.1.2.1.2 Metales pesados.

Poleksic, y cols., (2009), estudiaron peces de la especie *Acipenser ruthenus*, que habitan el Río Danubio. Los peces se colectaron en tres sitios diferentes y se analizaron las concentraciones de Cd, As, Pb, Cr, Hg, Cu, Ni, Fe, Mn, y Zn, en branquias, músculo, hígado e intestino, así como la histología de los tejidos. Se reportó que la presencia de alteraciones histopatológicas, correlaciona de forma positiva con la concentración de metales.

El plomo es un metal pesado que puede provocar alteraciones hematológicas y del desarrollo neurológico, en seres humanos expuestos. A nivel reproductivo también puede

alterar la calidad espermática. (EPA, *toxicity profiles*, 2010). Un estudio controlado de laboratorio, demostró que la exposición de embriones de la especie *Bufo arenarum* a 30 mg de Pb /L, después de 72 horas, ocasiona que se detenga el desarrollo y crecimiento además de deformidad del eje céfalocaudal. Cuando las concentraciones fueron de 10 a 20 mg de plomo/L, nuevamente el desarrollo se vio afectado, disminuyendo la talla (comparado con los controles) así como el desarrollo de branquias y aletas. (Sandoval y cols., 2004).

Suresh, (2009), realizó un estudio en el cual se expusieron peces de la especie *Tilapia mossambica* a 20.93 mg/L de cloruro de cadmio por 120 h, reportando que el número y tamaño de los CMM fueron mayores que en los peces control. Un estudio realizado por James y Little, (2003), reporta una disminución en la supervivencia y la metamorfosis, en larvas de sapos de la especie *Bufo americanus*, cuando han sido expuestos a concentraciones de 540 µg/L de cadmio, mientras que a concentraciones de 5 a 54 µg/L se reporta un aumento en el crecimiento de los organismos comparado con el grupo control.

Es importante resaltar, la gran cantidad de efectos adversos ocasionados por los contaminantes ambientales anteriormente mencionados, además de que se ha reportado que los efectos de una mezcla química difieren de los efectos que provocan cada uno de sus componentes de forma individual. (Pestizid Aktions Netzwerk, 2007).

## **1.2 Ecotoxicología.**

La ecotoxicología estudia el impacto de las sustancias tóxicas en los procesos normales de los ecosistemas naturales, como son el intercambio de materia y energía, la estructura de las redes tróficas, la composición de las poblaciones y de las comunidades. (Clements y Rohr, 2009; Galloway y Depledge., 2001). Ésta ciencia, proporciona las bases técnicas y científicas para la evaluación de riesgo ecológico, identificando y caracterizando los posibles efectos ocasionados por la presencia de compuestos y sustancias tóxicas en los ecosistemas, lo cual es de gran utilidad para poder diseñar las medidas de prevención y disminución del riesgo. (Calow y Forbes, 2003). Cuando se estudian ecosistemas, se debe tomar en cuenta que los contaminantes tóxicos no se presentan de manera aislada sino en mezclas, o bien combinados con agentes nocivos físicos y biológicos. Además de lo anterior, los escenarios que se evalúan suelen ser ampliamente complejos debido a procesos naturales como son: cambios en la diversidad genética, la comunicación entre los organismos, las interacciones con el medio

ambiente y la estructura de la red trófica, además de los diferentes niveles de organización biológica. (Eggen, y cols., 2004). Para evaluar los efectos ocasionados por los agentes tóxicos, se utilizan diversas herramientas como son los biomarcadores.

### **1.2.1 Biomarcadores.**

Un biomarcador, es un parámetro biológico que proporciona un valor cualitativo o cuantitativo como respuesta a la exposición a un agente tóxico. (Chambers y cols. 2002; Handy y cols., 2002). La respuesta generada por la exposición a un agente químico depende de factores como la herencia genética del organismo, su tipo de alimentación, su comportamiento, las propiedades fisicoquímicas del compuesto, la dosis, duración y frecuencia de la exposición, así como la vía y ruta de exposición. (EHC 155, 1993).

Los biomarcadores pueden estudiar las alteraciones en los diferentes parámetros biológicos de los organismos, por ejemplo, la modificación de factores fisiológicos, histológicos, bioquímicos y en ocasiones los genéticos, que pueden relacionarse con susceptibilidad. (Afshar y cols., 2008; Handy y cols., 2003). La aplicación de los biomarcadores se lleva a cabo en evaluaciones de riesgo en salud, el diagnóstico clínico, así como en los estudios de biomonitorio. (EHC 155, 1993).

Los biomarcadores pueden clasificarse en:

- Biomarcadores de exposición, los cuales permiten demostrar que un organismo o población se encuentra expuesto a un compuesto tóxico o un agente estresante.
- Biomarcadores de efecto, que se encuentran directamente relacionados con el mecanismo de acción del compuesto tóxico en un organismo. (Chambers, y cols., 2002).
- Biomarcadores de susceptibilidad, indican la capacidad innata o adquirida de un organismo, para responder adecuadamente cuando se encuentra expuesto a algún xenobiótico. (EHC 155, 1993).

Los biomarcadores de exposición pueden evaluar la dosis externa (concentración de cierto agente tóxico en alguna matriz ambiental, por ejemplo, el agua que ingiere

organismo), y la interna, que es la concentración o cantidad del compuesto químico absorbido por el organismo en un tiempo determinado. (EHC 155, 1993; Gil y Pla, 2001).

Por otro lado, los biomarcadores de efecto son la medida en la que los parámetros biológicos, se ven alterados como respuesta a la exposición a ciertos factores ambientales, así como a agentes tóxicos. (Chambers, y cols., 2002). Es importante resaltar que los mejores biomarcadores de efecto tóxico, son aquellos que demuestran que hay una alteración en las funciones normales ya sea de una célula, un tejido u organismo, de forma específica y sensible a un agente tóxico o a un grupo de ellos. (Handy y cols., 2003). Handy y Depledge, (1999), sugieren que es mejor realizar una batería de biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, para evaluar los efectos de la contaminación ambiental, ellos proponen que se utilicen marcadores moleculares, celulares y fisiológicos, para evaluar la mayor parte de efectos posibles ocurridos. Es importante que al seleccionar los biomarcadores a utilizar, sean considerados tanto sus ventajas como sus desventajas. Por ejemplo, el tiempo en el cual los efectos permanecen en el organismo, cuál es el órgano blanco, además de su sensibilidad y las posibles variables externas que lo puedan alterar.

En este caso, nos enfocamos a los biomarcadores histológicos. Este tipo de biomarcador nos permite evaluar los efectos de la exposición a compuestos tóxicos a nivel tisular. (Adeyemo, 2008). La histología es la ciencia que se encarga del estudio de los tejidos, los cuales, se pueden definir como conjuntos de células con funciones y origen común, que realizan actividades especializadas. (Tortora y Grabowski, 2000). Por otro lado, la histopatología se encarga del estudio de los cambios estructurales y funcionales de las células, tejidos y órganos que pueden ser causa o consecuencia de enfermedades. (Adeyemo, 2008). Las características de los biomarcadores histológicos son:

- Permiten evaluar la morfología de los diversos órganos, tejidos y células de organismos expuestos a agentes tóxicos de forma aguda o crónica.
- Se pueden utilizar tanto para valorar exposición como efecto.
- Ofrecen resultados cualitativos y/o cuantitativos. (Handy y cols., 2003).

Así mismo, los estudios morfológicos pueden proporcionar datos más confiables en lo que respecta a la salud del organismo, en comparación con algunos parámetros hematológicos, debido principalmente a que pueden permanecer por más tiempo en el organismo. (Adeyemo, 2008; Handy y Depledge, 1999).

Handy y cols., (2002), proponen el uso de los biomarcadores histopatológicos en peces, como un indicador de la calidad del agua en la que habitan. La aplicación de éstos, puede llevarse a cabo en un campo muy amplio, donde se pueden aplicar a diferentes especies, distintos órganos y/o tejidos, con diferentes elementos tóxicos, en condiciones controladas de laboratorio, o bien en condiciones de campo. Por ejemplo, Stehr y cols., (1997), reportan una relación directa entre las alteraciones hepáticas en peces y su exposición a PAHs, PCBs, DDT, clordanos y dieldrín en sedimento y tejidos, esto durante un estudio no controlado, mientras que Adeyemo, (2008), realizó un estudio controlado en laboratorio donde reporta efectos histológicos adversos en ovarios y agallas de peces expuestos a plomo. Por otro lado, un estudio realizado en ratas Wistar, demostró una relación dosis dependiente entre el fenitrotion (plaguicida) y la aparición de efectos histopatológicos. (Afshar y cols., 2008). Por otro lado, McCoy y cols., (2008), encontraron alteraciones morfológicas en las gónadas de sapos gigantes, que se encuentran directamente relacionadas con la magnitud de la actividad agrícola que se desarrolla en la zona de captura.

Por lo tanto, los biomarcadores histológicos, tienen como objetivo identificar o demostrar si los organismos que han estado expuestos a cierto agente tóxico, están sufriendo daños o no como consecuencia de la exposición a los agentes tóxicos. (Forbes y cols., 2006).

#### **1.2.1.1 Centros de melano macrófagos (CMM).**

Como ya se mencionó anteriormente, los peces se han estudiado para valorar la calidad del agua en la que habitan, y para ello se utilizan los centros de melano macrófagos como biomarcadores de daño ambiental ocasionado por exposición a compuestos químicos tóxicos. (Agius y Roberts, 2003; Spazier y cols., 1992).

Los CMM son acumulaciones de células pigmentadas, generalmente incluidas en la matriz retículo endotelial de los tejidos hematopoyéticos, como son el bazo, el hígado, los riñones y en algunos casos en las gónadas; en organismos como peces, anfibios y reptiles. Estos centros se pueden presentar en conjunto con una reacción inflamatoria crónica y pueden presentar los siguientes pigmentos: melanina, hemosiderina y lipofuscina. (Agius y Roberts, 2003).

La melanina es un potente antioxidante, que tiene la capacidad de remover y neutralizar radicales libres que pueden dañar a la célula. (Ravaglia y Maggese, 1995). Inicialmente, se

consideraba que los melano macrófagos fagocitaban la melanina, sin embargo, se ha demostrado que también pueden producirla. (Agius y Roberts, 2003).

Kalashnikova, (2000), indica que la hemosiderina se produce por degradación de la hemoglobina de los eritrocitos. Durante este proceso, la hemoglobina se disocia en el grupo hemo y globina, el hierro del grupo hemo interactúa con apoferritina formando ferritina, cuando ésta interactúa con los lípidos y carbohidratos se convierte en hemosiderina (Fig. 1). Otro origen de la hemosiderina puede ser por un aumento en la retención de hierro por los macrófagos como un mecanismo de protección. (Kranz, 1989).

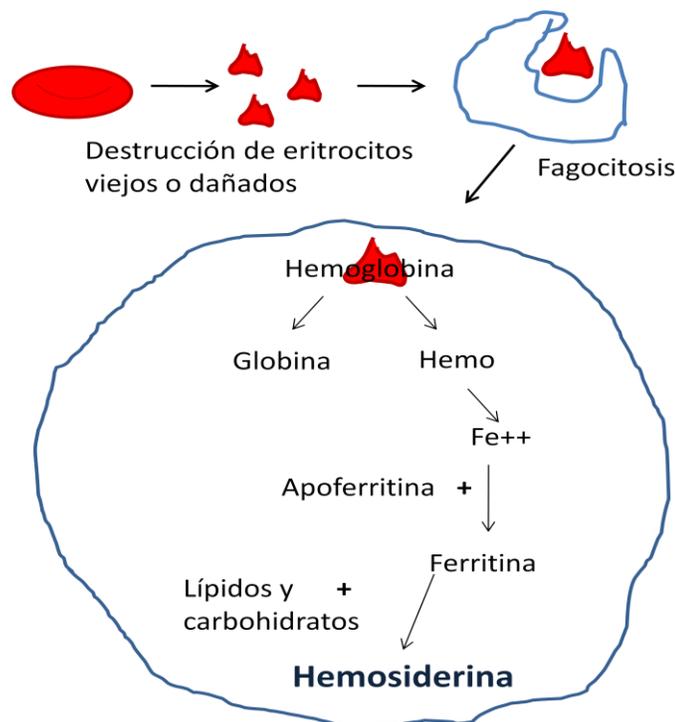


Figura 1. Diagrama esquemático de la producción de hemosiderina.

La lipofuscina se produce por la degradación de membranas celulares, (Kranz, 1989; Agius y Roberts, 2003; Kranz y Peters, 1984), el exceso de hierro estimula la lipoperoxidación, proceso en el que los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos de la membrana. Los anfibios requieren un alto contenido de lípidos insaturados para mantener la integridad de su membrana y conservar sus funciones aún a bajas temperaturas, estos lípidos son susceptibles a la peroxidación. (Kalashnikova, 2000).

En general, los CMM permiten el almacenamiento, reciclaje y detoxificación de desechos celulares y sustancias exógenas, por lo tanto mantienen libre de estos compuestos al organismo (Agius y Roberts, 2003; Montero y cols., 1999; Ravaglia y Maggese, 1995; Spazier, y cols., 1992), además de que son puntos de acción del sistema inmune en contra de los microorganismos patógenos. Debido a lo anterior, una disminución de la densidad numérica de los eritrocitos implica una deficiencia en la respuesta inmunológica, así como una alteración de los procesos metabólicos del bazo. Algunos autores sugieren que cuando hay una imposibilidad de los melano macrófagos para acumularse, se debe probablemente a una reducción de la actividad quimiotáctica (capacidad propia de los macrófagos de migrar hacia donde se presenta un estímulo), aunque se ha observado que no se presenta un aumento de melano macrófagos dispersos. (Spazier y cols., 1992). Por otro lado, se considera que a bajas dosis en exposición crónica a los contaminantes, el sistema de defensa celular puede funcionar de forma efectiva, mientras que a mayores dosis, la fagocitosis falla provocando la disminución de los CMM. (Sinderman, 2006).

Se ha establecido que los CMM son más numerosos cuando el organismo presenta alguna alteración del estado fisiológico normal, como ocurre con las enfermedades infecciosas o bien, la exposición a compuestos tóxicos y en algunos casos por daño térmico. (Hur y cols., 2006; Kranz y Peters, 1984; Spazier y cols., 1992). Cuando un organismo se encuentra en condiciones de estrés por contaminación, ocurren una serie de procesos inmunológicos en los CMM en el bazo, que conllevan una disminución en la cantidad de células sanguíneas que pueden estar dañadas. (Kranz y Peters, 1984; Agius y Roberts, 2003).

La presencia y la cantidad de CMM en un organismo pueden ser muy variables, de acuerdo con la especie y el órgano del que se trate. Es importante señalar que los CMM se pueden ver afectados por factores que alteran el metabolismo directa o indirectamente. (Montero y cols., 1999). En los peces, la acumulación de CMM se ve influenciada por la edad, ya que no tienen la capacidad de degradarlos. Sin embargo, en los anfibios, los CMM en el hígado no se presentan de forma acumulativa en el tiempo, ya que tienen la capacidad de degradarlos. (Kalashnikova, 2000). Como característica importante de los CMM es su origen, ya que su tamaño, frecuencia y tipo de pigmento puede variar considerablemente de acuerdo con la desnutrición, enfermedades, estrés ambiental; en algunos casos los efectos se revierten una vez removido el agente causal. (Kranz, 1989). Según Fournie y cols., (2001), para peces marinos y de estuario existe un valor basal de 40 CMM/mm<sup>2</sup>, éste estudio fue realizado en bazo

de siete especies de peces silvestres, colectados en 266 puntos de muestreo en el Golfo de México.

### **1.3 Los anfibios.**

Duellman y Trueb, (1986) definen a los anfibios como organismos vertebrados cuadrúpedos, que poseen dos cóndilos occipitales en el cráneo y una vértebra sacral. Su piel es glandular y carece de anexos como las plumas o el pelo. Su anatomía interna puede definirse como el punto intermedio entre la de los peces y la de los amniotas (vertebrados tetrápodos terrestres).

#### **1.3.1 Características fisiológicas y comportamiento.**

De forma general, el ciclo de vida de los anfibios comienza cuando son huevos y habitan en cuerpos de agua, una vez que eclosionan, las larvas continúan viviendo en el agua hasta llegar a la metamorfosis donde se convierten en adultos, en esta etapa dejan la vida acuática y prácticamente se vuelven terrestres. (Duellman y Trueb, 1986). Los anfibios que siguen este ciclo, son susceptibles a diferentes alteraciones que ocurren tanto en el medio acuático como en el terrestre dependiendo de la fase del ciclo de vida. La etapa de desarrollo más intensa en los anfibios es la metamorfosis, a diferencia de lo que ocurre en otras especies donde ésta fase es al final de la etapa embrionaria. (Rowe y cols., 2003).

Cabe resaltar la importancia de las características de la piel de los anfibios. En estos organismos, este órgano es muy delgado y muy permeable, además de que se encuentra ampliamente vascularizado y permanece así durante toda su vida, mientras que para otros vertebrados la piel es prácticamente impermeable. Es importante mencionar que en los anfibios la piel es un órgano vital que le permite realizar el intercambio gaseoso así como manejar su equilibrio hídrico y osmótico. (Rowe y cols., 2003).

En todas las etapas de la vida, los anfibios se encuentran susceptibles a la absorción dérmica de tóxicos en el agua (LeBlanc, 1997), debido a la permeabilidad de su piel, en la que su estrato córneo es de una sola capa de células. (Duellman y Trueb, 1986). Además de esto, la ingestión puede ser otra vía de exposición para estos organismos. (Boyer y Grue, 1995). Las

alteraciones en el ambiente acuático ocasionadas por el hombre, pueden afectar todas las etapas de desarrollo de éstos organismos, sin embargo es importante resaltar, que los efectos en los individuos dependen también de sus características fisiológicas y ecológicas. (Rowe y cols., 2003).

En los ecosistemas, los anfibios conforman gran parte de la biomasa y la biodiversidad del lugar. Los anfibios pueden encontrarse en diferentes nichos ecológicos interactuando con otras especies, en cierto momento actuando como presas pero también como depredadores, por lo que estas relaciones resultan fundamentales para el funcionamiento del ecosistema. (Boyer y Grue, 1995).

Las alteraciones que los humanos realizan en los ecosistemas naturales, ocasionan que los anfibios se enfrenten de forma simultánea a cambios tanto en la temperatura, la humedad, la disponibilidad de presas, etc. (Rowe y cols., 2003).

Dentro de la clasificación de los anfibios, se encuentran las salamandras, las cecilias y los anuros que corresponden al 87% del total, a éste orden pertenecen las ranas y los sapos. (Duellman y Trueb, 1986).

### **1.3.2 Sapo gigante (*Rhinella marina*).**

#### **1.3.2.1 Descripción.**

El sapo marino o gigante (*Rhinella marina*) es un anfibio de la familia *Bufo* *marina*, se caracteriza por ser de color café o gris en la parte superior, mientras que en el vientre tiene manchas más claras, presenta verrugas en el lomo y tienen dos glándulas capaces de producir toxinas a cada lado de su cuerpo, que son utilizadas como sistema de defensa contra sus depredadores. (Conant y Collins, 1991). Su tamaño es de alrededor de 152 mm, con un máximo registrado de 238 mm, y en general las hembras tienden a ser ligeramente más grandes que los machos. (Fig. 2). En libertad, su esperanza de vida es de 10 a 15 años aproximadamente. (Zug y Zug, 1979).

Clasificación taxonómica del sapo gigante:

Filo: *Chordata*

Clase: *Anfibia*

Orden: *Anura*

Familia: *Bufo*

Género: *Rhinella*

Especie: *marina*



Figura 2. Sapo gigante adulto.

### 1.3.2.2 Hábitat y distribución.

El hábitat natural de esta especie se ubica desde la base del río Amazonas en Sudamérica, pasando por América Central, hasta el Sur de Texas. (Fig. 3). Los sapos marinos son muy sensibles a las bajas temperaturas, una limitante para su hábitat. (Zug y Zug, 1979). Se reporta que la temperatura ideal para el sapo gigante es en promedio de 25.2 °C, teniendo como mínima y máxima 11 y 41.8 °C, respectivamente. (Duellman y Trueb, 1986). Es normal encontrarlo en diferentes tipos de vegetación, sin embargo es común que habiten en los pastizales resultantes de las actividades humanas y también en zonas urbanas. El territorio de un organismo adulto es de 160 m<sup>2</sup> en promedio. (Zug y Zug, 1979). Las zonas aledañas al río Coatzacoalcos, resultan ser un hábitat natural para esta especie.



Figura 3. Distribución mundial del sapo gigante. En azul, de forma natural y en rojo donde es introducido (LiquidGhoul, 2006).

### **1.3.2.3 Características biológicas.**

Este sapo es de hábitos nocturnos, y suelen ocultarse durante el día. Son omnívoros, ya que prácticamente ingieren cualquier cosa que encuentren a su paso y es muy común encontrar en su tracto digestivo, objetos tales como rocas o restos de plantas. Las hormigas y los escarabajos son sus presas más comunes aunque esto depende también de su hábitat. Con el paso del tiempo, los sapos gigantes se han adaptado a la vida urbana, aprovechando los restos de comida o los alimentos para mascotas. (Zug y Zug, 1979).

El mecanismo por el cual se alimentan estos sapos, es uno de los más avanzados dentro del orden de los anuros, ya que utilizan su lengua para atrapar a sus presas. Realizan un movimiento muy rápido impulsando y jalando su lengua, a la cual se adhieren los alimentos, lo que ocasiona que también se ingieran otros objetos, como rocas, materia orgánica y suelo. (Duellman y Trueb, 1986).

El sapo gigante es considerado como uno de los anfibios más adaptables, y tolerantes a distintos ambientes, ya que pueden habitar en zonas selváticas así como en semidesiertos, puede vivir a nivel del mar o hasta en elevaciones de más de 2000 m. (Duellman y Trueb, 1986). En el caso de los anfibios nocturnos, la temperatura de su cuerpo es prácticamente igual a la temperatura ambiente durante las etapas de actividad. Por ejemplo, la temperatura corporal del sapo marino durante el día, es menor a la temperatura ambiente, probablemente como resultado de la pérdida de calor por evaporación en la superficie corporal, sin embargo durante la noche su temperatura se aproxima más a la de su entorno. (Zug y Zug, 1979).

La reproducción de éstos comienza cuando tienen un año de edad, tanto en las hembras como en los machos. Se ha registrado que la densidad de la población de sapos gigantes es menor en las áreas naturales no perturbadas que en aquellas cercanas a los asentamientos humanos, esto se debe probablemente a la mayor disponibilidad de alimentos. (Duellman y Trueb, 1986).

## 1.4 El bazo.

### 1.4.1 Descripción.

El bazo en los sapos, es un órgano que se sitúa en la cavidad abdominal ligeramente hacia la derecha, tiene forma redondeada, y su color es rojo oscuro. El tamaño del órgano puede variar con la edad y el peso del organismo, sin embargo en un adulto de tamaño medio el bazo mide alrededor de 8 mm de diámetro. (Fig. 4).

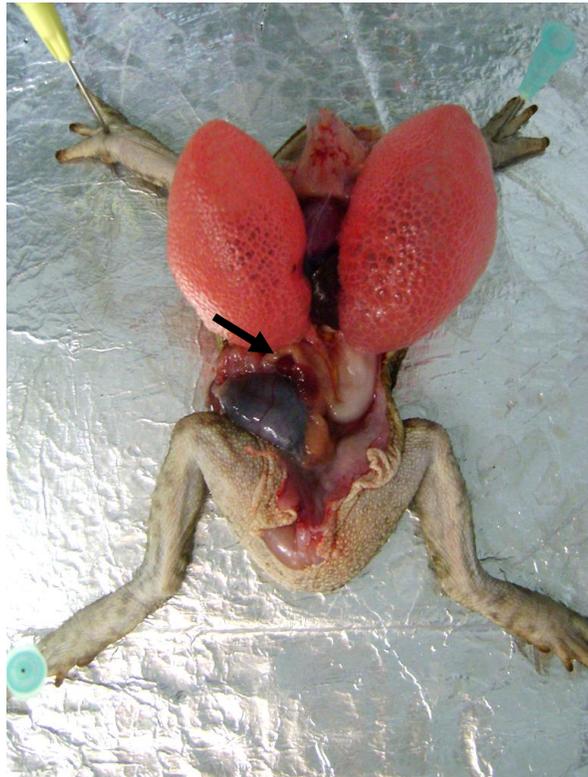


Figura 4. Ubicación anatómica del bazo en sapos gigantes (flecha).

### 1.4.2 Morfología.

El bazo es un órgano que se encuentra rodeado por una cápsula de tejido conectivo denso, con escasa musculatura lisa. Desde la cápsula se extienden trabéculas de tejido conectivo hacia el interior del parénquima, que le confieren rigidez. A través del hilio, penetran al órgano los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. La mayor parte de las células libres son linfocitos, aunque también hay macrófagos y células dendríticas. (Geneser, 2007).

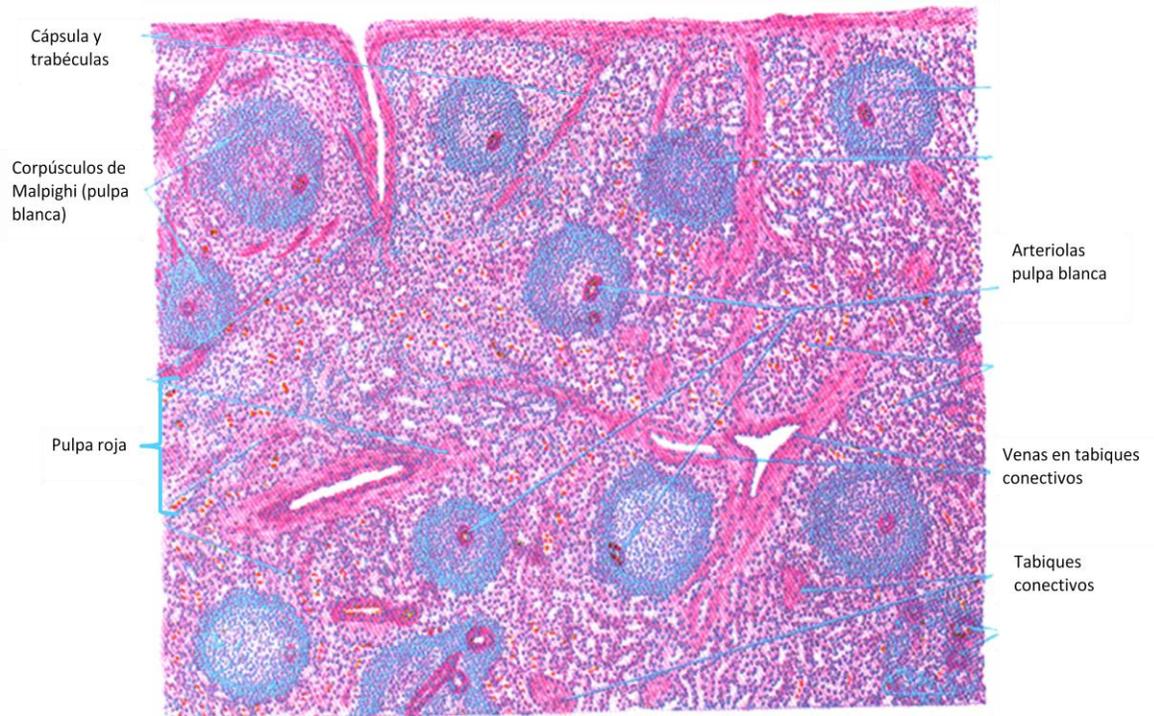


Figura 5. Representación esquemática de la histología del bazo H y E (50x). (DiFiore, 1951).

Histológicamente el parénquima del bazo se divide en pulpa roja y pulpa blanca. (Fig. 5). La pulpa roja está compuesta por grandes vasos sanguíneos irregulares, sinusoides esplénicos separados por placas o cordones esplénicos, mientras que la pulpa blanca se observa como pequeñas zonas ovals o redondeadas grisáceas, compuestas por tejido linfoide difuso y folicular con una arteriola central. (Fig. 5). En los sapos, la pulpa blanca y la pulpa roja periarteriolar del bazo, están separadas por una capa de células epiteliales. (Tizard, 2009).

### 1.4.3 Función

En el humano, el bazo se encarga de realizar el catabolismo de las células sanguíneas dañadas y partículas extrañas, además de que lleva a cabo procesos inmunológicos. (Geneser, 2007; Kranz, 1989). En los anfibios como las ranas, el bazo representa el órgano eritropoyético principal en la etapa adulta, aunque en algunas especies de clima templado, los eritrocitos también se producen en la médula ósea durante la primavera (Duellman y Trueb, 1986), lo cual sugiere que para estos organismos, la pérdida del bazo provocaría una deficiencia en la

respuesta inmunológica, además de desencadenar una alteración hematológica como la anemia, ocasionada por el déficit de producción de eritrocitos que finalmente podría llevar a la muerte.

## **2 JUSTIFICACIÓN**

El río Coatzacoalcos ha sido receptor de gran cantidad de contaminantes, lo que ha conformado una mezcla química compleja con potenciales efectos tóxicos. En este sitio, tanto la población humana como la biota, se encuentran expuestos a ésta mezcla. Lo cual, hace indispensable el uso de biomarcadores como los CMM, que permitan evaluar efectos tempranos en organismos indicadores, para que así, de ser necesario, se busquen alternativas y opciones de mitigación de los impactos ambientales, que beneficien al ecosistema en general.

El sapo gigante es una especie endémica y abundante que habita la zona de Coatzacoalcos, y que actualmente en México no cuenta con ningún estatus de protección. Estos organismos, debido a sus características ya mencionadas, pueden presentar varias vías y rutas de exposición a agentes tóxicos durante su ciclo de vida. Aunado a ello, los sapos gigantes desempeñan varios papeles fundamentales para el funcionamiento del ecosistema, su ubicación en la red trófica, así como su fisiología, su abundancia y su manejo sencillo los convierten en organismos apropiados para estudios ecotoxicológicos.

## **3 HIPÓTESIS**

Los sapos gigantes que habitan la zona de Coatzacoalcos, Veracruz, se encuentran expuestos a una mezcla compleja de contaminantes tóxicos, la cual puede ocasionar un aumento en el número y el tamaño de los CMM presentes en el bazo de estos organismos, como respuesta a la agresión de estas sustancias.

## 4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos histológicos de la mezcla de contaminantes a la cual está expuesto el sapo gigante (*Rhinella marina*), a través de los CMM y sus pigmentos como biomarcadores de efecto.

## 5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar las técnicas histoquímicas para identificar: melanina, hemosiderina y lipofuscina.
2. Evaluar la morfología del bazo del sapo gigante, para identificar posibles alteraciones, debidas a la exposición a contaminantes, a través de la técnica de hematoxilina – eosina.
3. Identificar la presencia de hemosiderina en los CMM de bazo de sapo gigante, a través de la técnica histoquímica de Perls.
4. Valorar la melanina presente en los CMM del bazo de los sapos gigantes a través de la técnica histoquímica de Fontana-Masson.
5. Evaluar la presencia de lipofuscina presente en los CMM del bazo de los sapos gigantes, a través de la técnica histoquímica de Gomori.
6. Realizar el análisis morfométrico (número y tamaño) de los CMM del bazo de sapo gigante.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Muestras biológicas.

70 bazos de sapo gigante incluidos en bloques de parafina, provenientes de la zona de Coatzacoalcos, Veracruz.

### 6.2 Equipo.

- Balanza analítica y balanza granataria, (OHAUS).
- Medidor de pH, (ORION).
- Hojas y mango de bisturí, tijeras de disección y cucharilla.

- Sonicador, (Branson 1200).
- Microtomo y placa fría, (Leica).
- Baño de flotación, (TBS Triangle biomedical sciences).
- Estufa de calentamiento, (Ríos Rocha, S.A).
- Dispensador de parafina, Barnstead/Electrothermal.
- Placa de calentamiento, Barnstead/Thermolyne.
- Tren de tinción, (Tissue Tek).
- Jarras Coplin de vidrio, rack para laminillas y cajas de vidrio, (Wheaton).
- Portaobjetos esmerilados, (MADESA).
- Cubreobjetos, (CORNING).
- Navajas de alto perfil, (SAKURA).
- Fotomicroscopio, (Nikon Labophot-2).
- Cámara fotográfica, (Nikon Coolpix S10).
- Software, Image Pro Plus 6.0
- Software, StatSoft STATISTICA 6.

### 6.3 Reactivos.

- Fijador: fosfato de sodio dibásico anhidro y fosfato de sodio monobásico (JT Baker), formaldehído (SIGMA-ALDRICH) y agua destilada.
- Alcohol etílico absoluto y xileno (CTR scientific).
- Parafina y polímeros filtrados Paraplast, (McCormick).
- Silanizado: acetona (Monterrey) y silano (SIGMA-ALDRICH).
- Tinciones: permanganato de potasio, ácido clorhídrico, hidróxido de amonio, ácido sulfúrico (JT Baker), rojo neutro (Spectrum), pararosanilina clorhídrica, ferrocianuro de potasio (SIGMA-ALDRICH), acetaldehído (CTR scientific), nitrato de plata y Hematoxilina (Merck), tiosulfato de sodio (Mallinckrodt), ácido oxálico (Monterrey), eosina amarillenta (Analit) y agua destilada.
- Montaje: entellan (Merck).

## 6.4 Metodología.

### 6.4.1 Descripción de la zona de estudio.

El sitio de estudio se ubica en puntos aledaños al río Coatzacoalcos, el cual se origina en la Sierra Atravesada, en Oaxaca, en su recorrido recibe aguas de muchos afluentes pequeños, como las de los ríos: Choapa, Uxpanapa y Calzadas. (Gozada y Páez, 1986). Éste río tiene 322 km de longitud, su caudal es de 22 500 millones de metros cúbicos, debido a ello, ocupa el cuarto lugar como uno de los ríos más caudalosos del país. Además de que el puerto de Coatzacoalcos es el tercer puerto más importante en el Golfo de México. (Fig. 6).

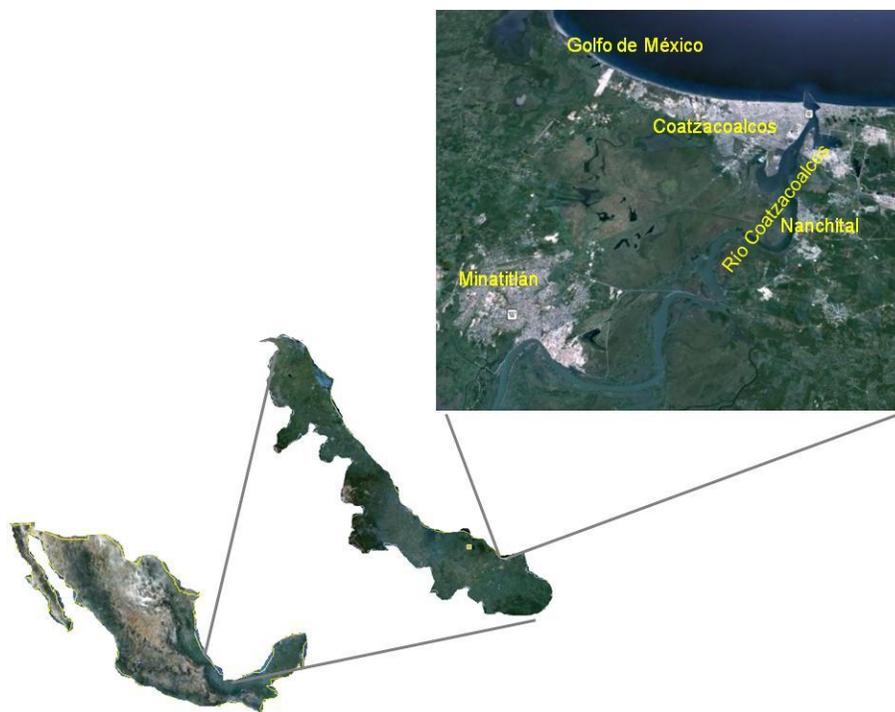


Figura 6. Localización del Río Coatzacoalcos, en Veracruz, México. (Google earth, 2010)

El tipo de clima que prevalece en la zona de Coatzacoalcos, según el sistema de clasificación climática de Köppen, que fue modificado por García, (1964) es:

- Am(i)gw: cálido húmedo con lluvias en verano, la cantidad de lluvia invernal es de entre 5 y 10,2 % de la anual, con la precipitación del mes más seco < 60 mm, con poca oscilación en las temperaturas medias mensuales, de 5 y 7 °C, comúnmente el mes

más caliente del año es mayo. El régimen de lluvias en verano es por lo menos 10 veces mayor en cantidad, que en la temporada más seca. (Álvarez, 1999).

Los tipos de vegetación que predominan son la vegetación riparia, tular y popal en las zonas inundables, selva alta perennifolia y mediana subperennifolia en lomeríos y zonas de acahual en pastizales abandonados y cultivados. (CONABIO, *cuenca media y alta del río Coatzacoalcos*, 2010).

En la zona donde el río Coatzacoalcos se une con el Río Jaltepec, se practica la agricultura de temporal y aguas abajo abunda el manglar. En las cercanías a Minatitlán se encuentran pastizales y cultivos de temporal principalmente, mientras que en la zona más baja de la cuenca, el río se extiende a lo largo de planicies, lo que da lugar a la formación de meandros, lagunetas y esteros hacia la desembocadura. La agricultura en Coatzacoalcos ocupa alrededor de 1960 Ha, donde el principal cultivo es la copra, mientras que la ganadería se lleva a cabo en alrededor de 9422 Ha. (Informe Gobierno Municipal: Coatzacoalcos, 2005-2007).

Coatzacoalcos y Minatitlán se consideran como los centros urbanos más importantes en la zona, seguidos de Las Choapas, Agua Dulce y Cosoleacaque. (Consejo de cuenca de río Coatzacoalcos, 2010).

#### **6.4.2 Muestreo.**

Se capturaron 70 sapos gigantes en la zona de Coatzacoalcos, por medio de trampas de barrera y embudo, aunque en algunos casos, lo hicieron a mano o con redes. Se consideraron 7 sitios de muestreo (Fig. 7), en cada uno de los cuales se colectaron diez individuos.

Como se observa en la figura 7, los sitios señalados en rojo son considerados como urbano-industriales (Estero del Pantano, Mundo nuevo y Nanchital), ya que tienen como característica, presentar centros urbanos y también descargas industriales. En azul se muestran los sitios industriales, ya que Cangrejera se denominó así por su cercanía con el complejo petroquímico del mismo nombre, mientras que en Minatitlán se encuentra la refinería Lázaro Cárdenas. Por último, en verde se presentan las zonas consideradas como rurales (Uxpanapa y Palomas), debido a que presentan ecosistemas bien conservados, así como escasa urbanización.



Figura 7. Localización de sitios de muestreo: 1) Estero del Pantano, 2) Mundo Nuevo, 3) Nanchital, 4) Minatitlán, 5) Cangrejera, 6) Palomas y 7) Uxpanapa. (Google earth, 2010).

De los 70 sapos recolectados se obtuvieron los bazos, los cuales fueron procesados por medio de la técnica histológica hasta su inclusión en parafina. A partir de las muestras incluidas en parafina, se realizaron cortes de 4 micras a la muestra de bazo. Para llevar a cabo la tinción con colorantes acuosos, el tejido fue desparafinado y rehidratado. Una vez teñidos, los cortes deben deshidratarse y aclararse para montar las laminillas de forma permanente con resina sintética. (Fig. 8).

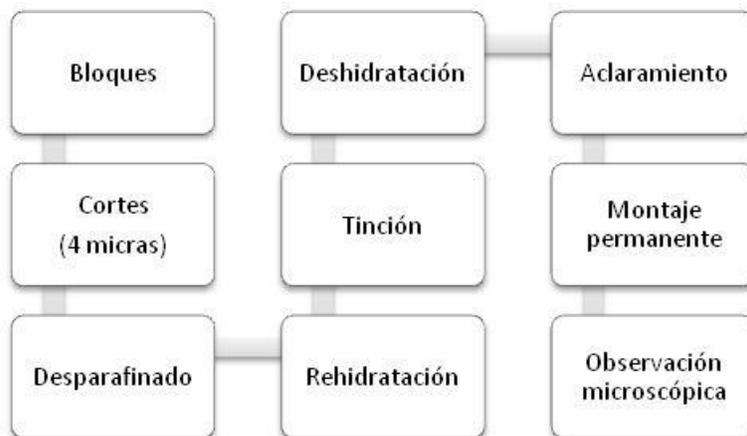


Figura 8. Diagrama de procesamiento de muestras.

### 6.4.3 Análisis histológico.

Las muestras fueron teñidas por medio de la técnica de rutina de Hematoxilina y Eosina, así como por tres técnicas histoquímicas para identificar los pigmentos contenidos en los CMM.

#### 6.4.3.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina.

La técnica de hematoxilina-eosina, permite evaluar la morfología general del tejido. Ésta tinción se detalla en el Anexo III.

#### 6.4.3.2 Tinción de Fontana-Masson.

Ésta tinción identifica la melanina contenida en los CMM. Ésta técnica se detalla en el Anexo III.

#### 6.4.3.3 Tinción de Perls.

La técnica de Perls permite identificar la hemosiderina presente en los CMM. Ésta tinción se detalla en el Anexo III.

#### 6.4.3.4 Tinción de Gomori.

La tinción de Gomori permite identificar la lipofuscina de los CMM. Ésta tinción se detalla en el Anexo III.

#### 6.4.4 Análisis morfométrico.

La cantidad total de muestras fueron 70, las cuales fueron procesadas y se obtuvieron 7 laminillas para cada una. Una laminilla teñida por la técnica de hematoxilina y eosina que permitió evaluar la morfología general del tejido, una original y un duplicado para cada una de las técnicas histoquímicas que son: Fontana-Masson, Perls y Gomori, que permiten demostrar la presencia de melanina, hemosiderina y lipofuscina, respectivamente. De forma estándar, cada laminilla debía tener al menos tres cortes de bazo (réplicas).

Para realizar el análisis de imágenes se eligió un corte de cada laminilla, como lo muestra la figura 10. Los criterios de elección incluyeron: óptima preservación del tejido, ausencia de artefactos (burbujas, pliegues, precipitados, etc.). Posteriormente se realizó la sesión de fotomicrografías.

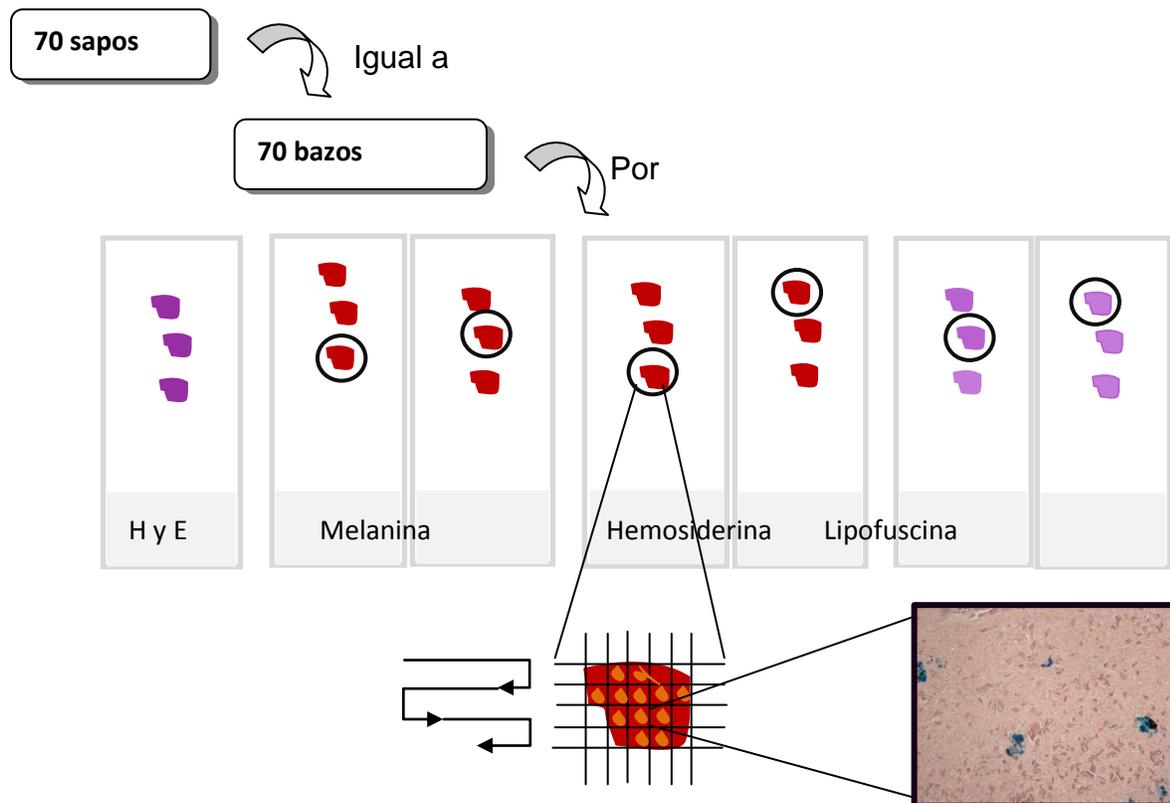


Figura 9. Metodología para el análisis de imágenes.

El método para analizar las imágenes se estandarizó con las siguientes características: se capturaron 12 fotomicrografías por corte, todas a un aumento de 20x, lo que da un área total

de 2 mm<sup>2</sup> por corte, en forma de zigzag. La cuantificación y medición de los CMM se realizó por medio del Software Image Pro Plus 6.0, como se muestra en la figura 9.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Análisis histológico.

Con el fin de realizar una evaluación histológica general del tejido del bazo de sapo gigante, se realizaron cortes que fueron teñidos con la técnica de rutina hematoxilina y eosina. Ésta tinción permitió identificar las estructuras que conforman éste órgano: la zona cortical formada por tejido fibroso, el parénquima constituido por pulpa roja y pulpa blanca (corpúsculos de Malpighi), ésta última compuesta en su mayoría por tejido linfoide localizado alrededor de una arteriola central, mientras que en la pulpa roja se encontró la presencia de CMM, que se observan como acumulaciones de células con gránulos que van desde el amarillo hasta café muy oscuro. (Fig. 10).

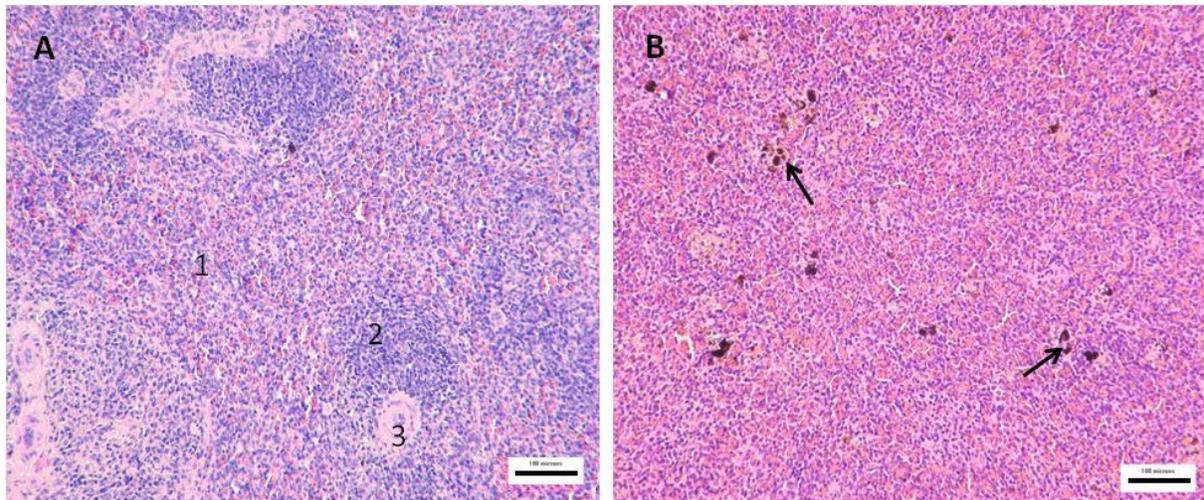


Figura 10. Fotomicrografías de la morfología general del bazo de sapo gigante. A). Parénquima. Pulpa roja (1), pulpa blanca (2) y arteriola central (3). B). Obsérvese la presencia de CMM (flechas). H-E Escala de barras=100µm.

Es importante mencionar, que los resultados obtenidos del análisis general de la histología del bazo, en el total de las muestras (N=70), la morfología se mostró muy similar a

excepción de los CMM, que si bien se presentaron en todas las muestras, se observaron diferencias con respecto a la cantidad y tamaño de éstas estructuras, cuando se llevo el análisis histológico. Debido a lo anterior, se realizó el análisis morfométrico de los CMM, el cual se presenta posteriormente.

Como se mencionó anteriormente, los CMM albergan tres tipos de pigmentos: melanina, hemosiderina y lipofuscina, para la identificación de éstos compuestos, se aplicaron tres técnicas histoquímicas: Fontana-Masson para melanina, Perls para hemosiderina y Gomori para lipofuscina. (Fig. 11).

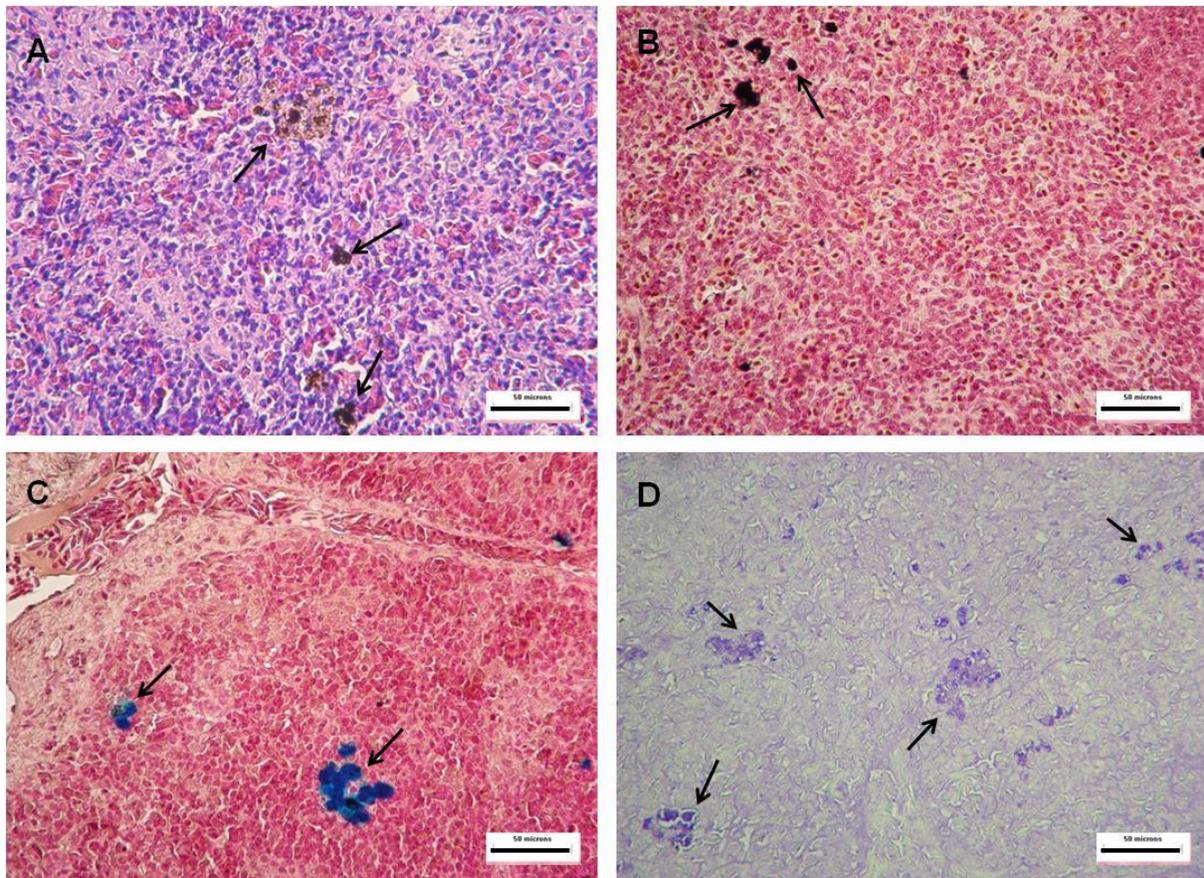


Figura 11. Fotomicrografías de los CMM en el bazo de sapo gigante. A) Tinción H-E. B) CMM positivos para melanina (flechas). Tinción Fontana-Masson. C) Las flechas señalan los CMM con hemosiderina. Técnica de Perls. D) Obsérvese los CMM con lipofuscina (flechas). Técnica de Gomori. Escala de barras=50  $\mu$ m.

## 7.1.1 Análisis cualitativo.

### 7.1.1.1 Melanina.

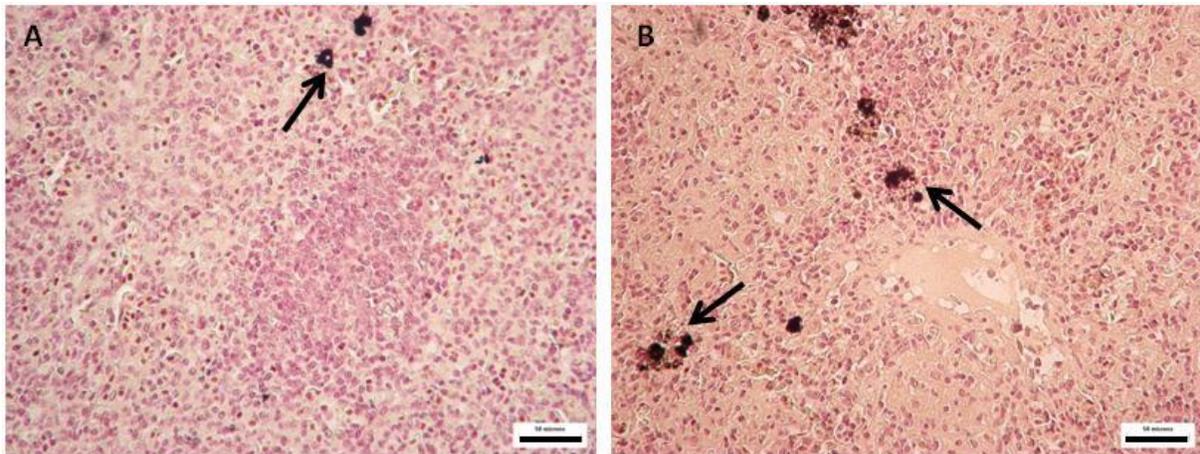


Figura 12. Bazo de sapo gigante de la zona rural. Nótese el contraste entre la distribución y el tamaño de los CMM con melanina (flechas). A) Uxpanapa. B) Palomas. Tinción de Fontana-Masson. Escala de barras=50 µm.

La aplicación de las diferentes técnicas histoquímicas nos permitieron conocer que en todas las muestras experimentales (N=70) de los distintos sitios de estudio, los CMM contienen: melanina, hemosiderina y lipofuscina, en cantidades variables. El análisis histológico demostró que estas estructuras presentaron amplias diferencias en número, tamaño y distribución. En las figuras 12, 13 y 14 se muestran fotomicrografías representativas de las tres zonas de estudio: rural, urbana-industrial e industrial donde se resaltan estas diferencias y la presencia de los CMM positivos para melanina.

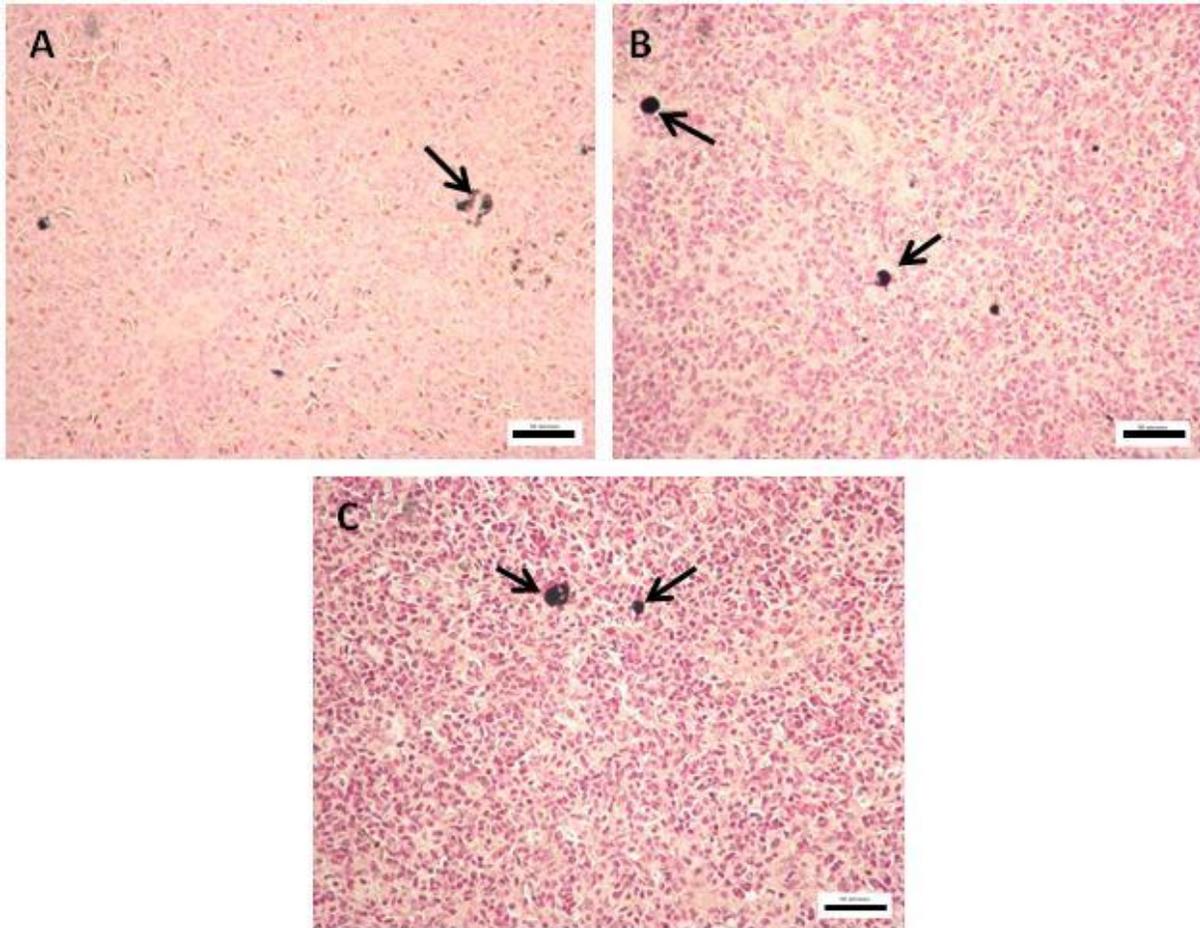


Figura 13. Bazo de sapo gigante de la zona urbana-industrial. Obsérvese el tamaño y la cantidad de CMM con melanina en diferentes muestras (flechas). A) Estero del Pantano. B) Nanchital. C) Mundo Nuevo. Tinción de Fontana-Masson. Escala de barras=50 µm.

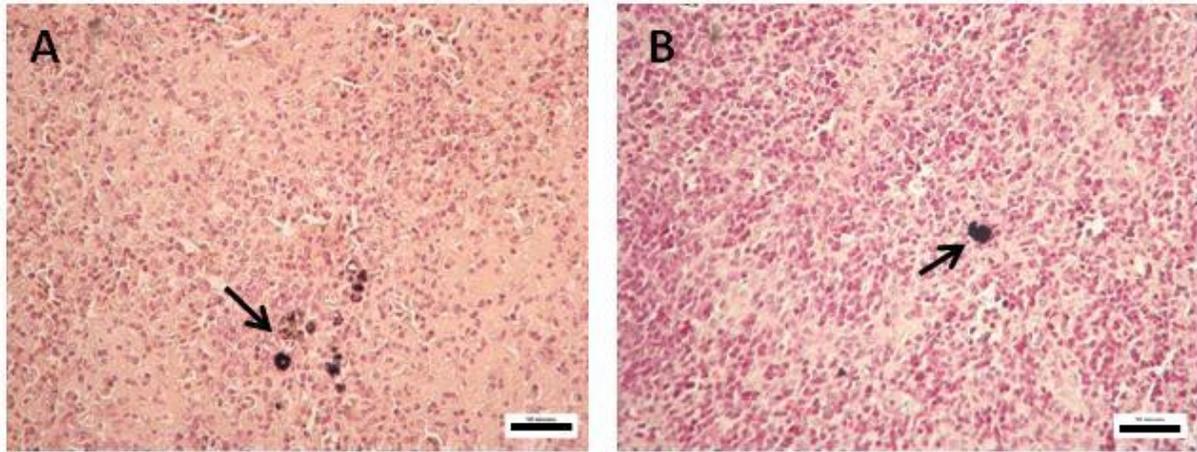


Figura 14. Bazo de sapo gigante de la zona industrial. Se muestra la variabilidad en la cantidad y tamaño de los CMM con melanina (flechas). A) Cangrejera. B) Minatitlán. Tinción de Fontana-Masson- Escala de barras=50  $\mu$ m.

#### **7.1.1.2 Hemosiderina.**

La Evaluación morfológica de los CMM con hemosiderina (Fig. 11, C) mostró una variabilidad muy grande en el número y tamaño de estas estructuras entre las tres zonas de estudio.

En la figura 15 se muestran dos fotomicrografías representativas de los sitios que conforman la zona rural (Palomas y Uxpanapa), donde puede apreciarse el contraste entre el tamaño de los CMM; ésta misma variabilidad se presentó en la cantidad de los centros.

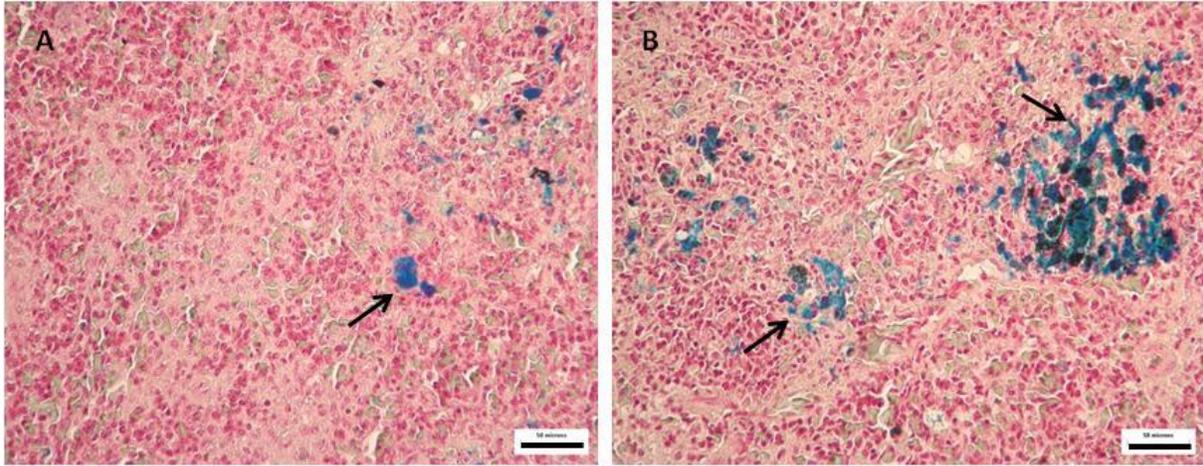


Figura 15. Fotomicrografías de bazo de sapo gigante de la zona rural. CMM con gránulos de hemosiderina (flechas). Nótese el contraste entre la distribución de tamaño de los CMM. A) Palomas. B) Uxpanapa. Tinción de Perls. Escala de barras=50 µm.

Los CMM positivos para hemosiderina de las 30 muestras que conformaron la zona urbana-industrial (Mundo Nuevo, Nanchital y Estero del Pantano) presentaron el patrón de variabilidad semejante a la zona rural (Fig. 16).

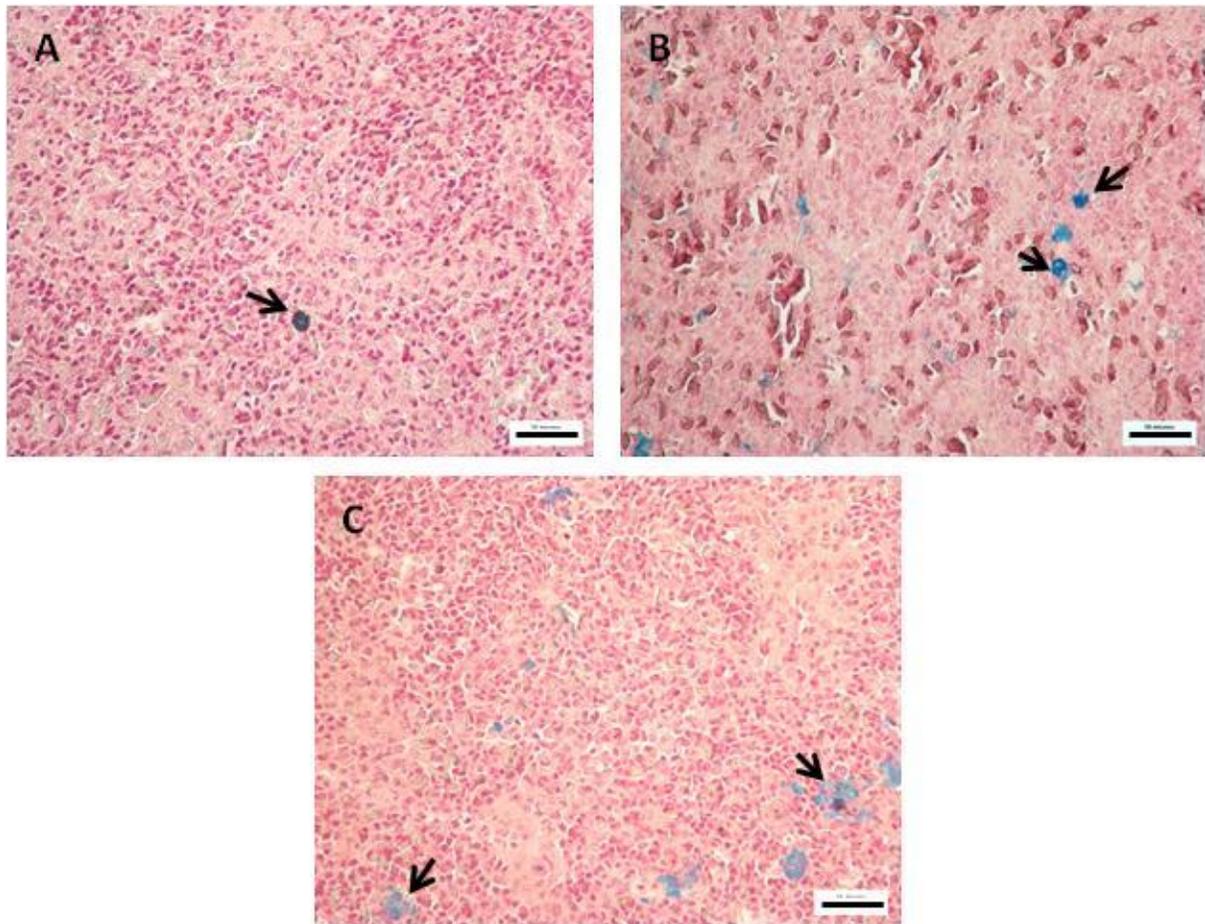


Figura 16. Bazo de sapo gigante de la zona urbana-industrial. Las flechas señalan los CMM con hemosiderina, los cuales se aprecian en diferentes cantidades y tamaños. A) Mundo Nuevo. B) Estero del Pantano. C) Nanchital. Tinción de Perls. Escala de barras=50 µm.

La zona industrial conformada por Cangrejera y Minatitlán, mostró la mayor desigualdad en número y tamaño de los CMM con hemosiderina, con respecto a las otras dos zonas estudiadas; sobre todo fue muy evidente en lo que respecta a la cantidad, ya que en una misma muestra, se observaron campos que presentaban desde unos cuantos CMM, en contraste con otros en los cuales se mostraban CMM incontables. Así mismo, es importante resaltar que los CMM positivos para hemosiderina de mayor tamaño se observaron en esta zona. Estas características se presentan en la figura 17.

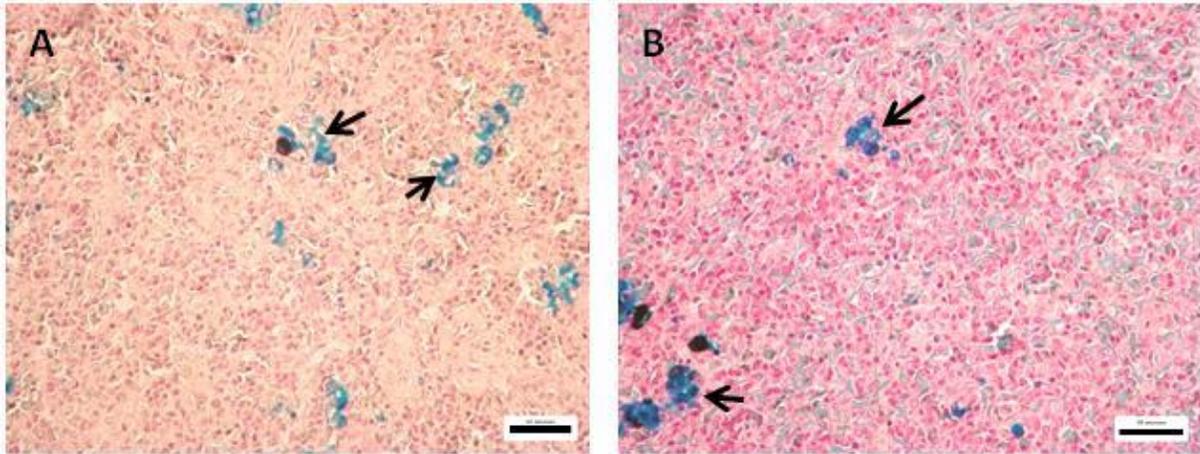


Figura 17. Bazo de sapo gigante de la zona industrial. Se muestran las diferencias en la cantidad y tamaño de los CMM con hemosiderina. A) Minatitlán. B) Cangrejera. Tinción de Perls. Escala de barras= 50  $\mu$ m.

### **7.1.1.3 Lipofuscina.**

En comparación con los resultados obtenidos en el análisis histológico de los CMM positivos para melanina y hemosiderina, los CMM con lipofuscina se presentaron en mayor cantidad, ocupando un mayor porcentaje de área. De forma general en las tres zonas de estudio se observó que éste pigmento se presentó en células individuales distribuidas por toda la superficie del corte, por ello no fue posible apreciar diferencias cualitativas evidentes entre la totalidad de las muestras experimentales; sin embargo es de interés mencionar que los CMM con lipofuscina de mayor tamaño, se encontraron en muestras de la zona industrial. (Fig. 18).

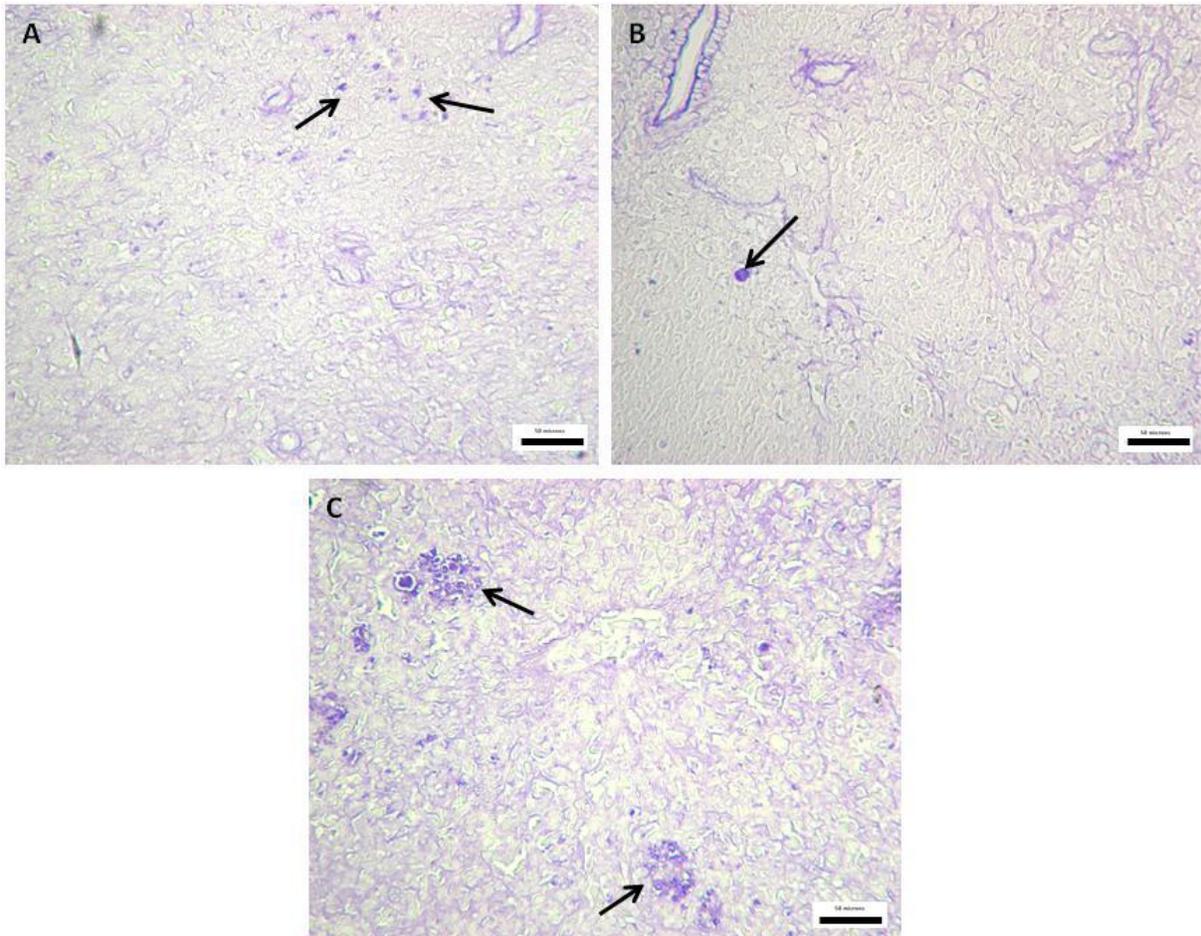


Figura 18. Bazo de sapo gigante. Obsérvese la cantidad y tamaño de los CMM con lipofuscina (flechas) en las distintas zonas de estudio: A) Rural, B) Urbana-industrial e C) Industrial. Tinción de Gomori. Escala de barras=50 µm.

### 7.1.2 Análisis morfométrico.

El análisis morfométrico es una herramienta que nos permite obtener valores cuantitativos de los objetos y estructuras de interés. Los indicadores evaluados fueron: número de CMM presentes en 2 mm<sup>2</sup> de tejido (NCMM), porcentaje de área ocupada por éstos (%ACMM) y tamaño promedio de los centros encontrados (TCMM). Se analizaron un total de 490 laminillas, por duplicado, a 20x, por microscopía de luz.

Tabla 2. Resultados obtenidos para cada indicador en cada sitio. Los datos que se presentan corresponden a la mediana (percentiles de 10 a 90). NCMM: número de CMM, %ACMM: porcentaje de área ocupada por CMM y TCMM: tamaño promedio de CMM.

INDICADOR	INDUSTRIAL	URB-IND	RURAL
<b>Melanina</b>			
NCMM	3.8 (1.8 - 11.5)	3.8 (1.0 - 14.1)	6.0 (1.9 – 11.0)
%ACMM	0.3 (0.1 - 0.7)	0.2 (0.05 - 0.9)	0.4 (0.1 - 0.5)
TCMM	112.4 (93.7 - 160.8)	107.9 (68.7 - 381.4)	96.4 (67.1 - 142.6)
<b>Hemosiderina</b>			
NCMM	1.8 (0.3 - 103.7)	4.5 (0.3 - 44.1)	8.0 (0.4 - 29.6)
%ACMM	0.2 (0.02 - 8.7)	0.5 (0.03 - 5.3)	1.0 (0.01 - 3.4)
TCMM	175.0 (99.9 - 526.5)	176.0 (79.9 - 337.3)	168.5 (88.4 - 276.8)
<b>Lipofuscina</b>			
NCMM	10.0 (0.3 - 36.1)	8.5 (1.7 - 21.5)	17.0 (7.3 – 23.0)
%ACMM	0.7 (0.01 - 2.3)	0.5 (0.07 - 2.3)	1.0 (0.4 - 1.9)
TCMM	96.3 (85.2 - 363.8)	95.3 (69.0 - 247.3)	92.0 (74.9 - 180.2)

Debido a que los resultados obtenidos son no paramétricos, la mediana y los percentiles 10 a 90 nos permiten apreciar la distribución de los datos. Dentro del percentil 10 al 90, podemos encontrar el 80% de los valores obtenidos para cada indicador (la mayoría), el 10% de los datos se encuentra por encima de este rango y el 10% restante, se encuentra por debajo. Una forma de determinar la desviación de los diferentes grupos de datos es por medio de la semi desviación inter percentiles, que es la diferencia entre el percentil 90 y el 10, por lo que representa la dispersión del 80% de los datos, cuanto mayor sea el valor obtenido, mayor será la heterogeneidad de los resultados.

### **7.1.2.1 Melanina.**

La melanina es el pigmento que presentó menor variación dentro de la misma zona de estudio, en comparación con los otros pigmentos evaluados, la dispersión de los datos entre los percentiles de 10 a 90, fue menor que los que se presentan para hemosiderina como para lipofuscina. (Tabla 2). Los resultados de la evaluación cuantitativa del NCMM con melanina se presentan en la figura 20, en la cual podemos observar que la zona urbana-industrial presenta el percentil de 90% más alto que en las otras dos zonas estudiadas (industrial y rural), éste

hallazgo se repitió en los tres indicadores evaluados: NCMM, %ACMM y TCMM, como se observa en las figuras 19, 20 y 21. Los resultados sugieren que la zona urbana-industrial presentó un grupo muy heterogéneo de datos, mientras que las zonas rural e industrial arrojaron un conjunto de datos más homogéneo.

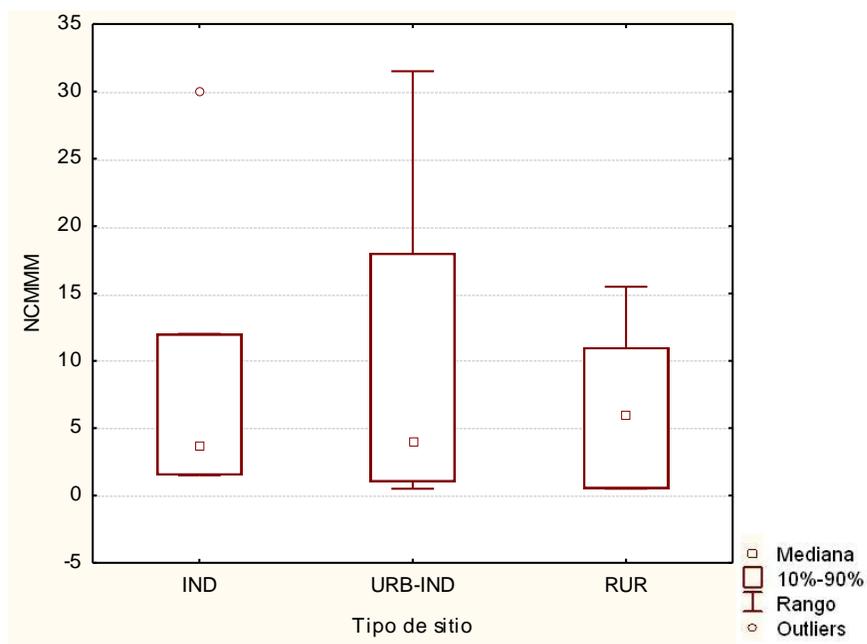


Figura 19. Gráfica de NCMMM: número de CMM con melanina por tipo de sitio.

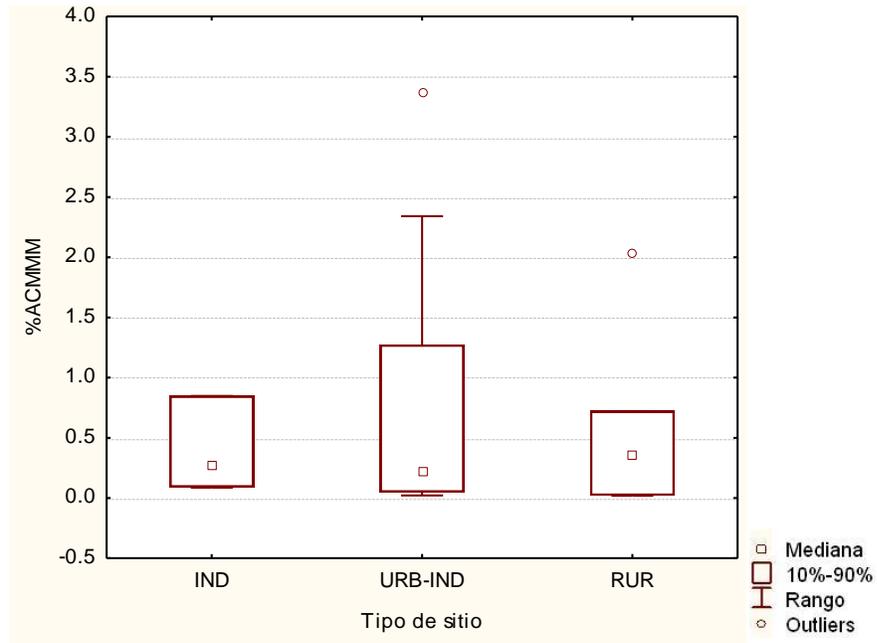


Figura 20. Gráfica de %ACMMM: porcentaje de área ocupada por CMM con melanina por tipo de sitio.

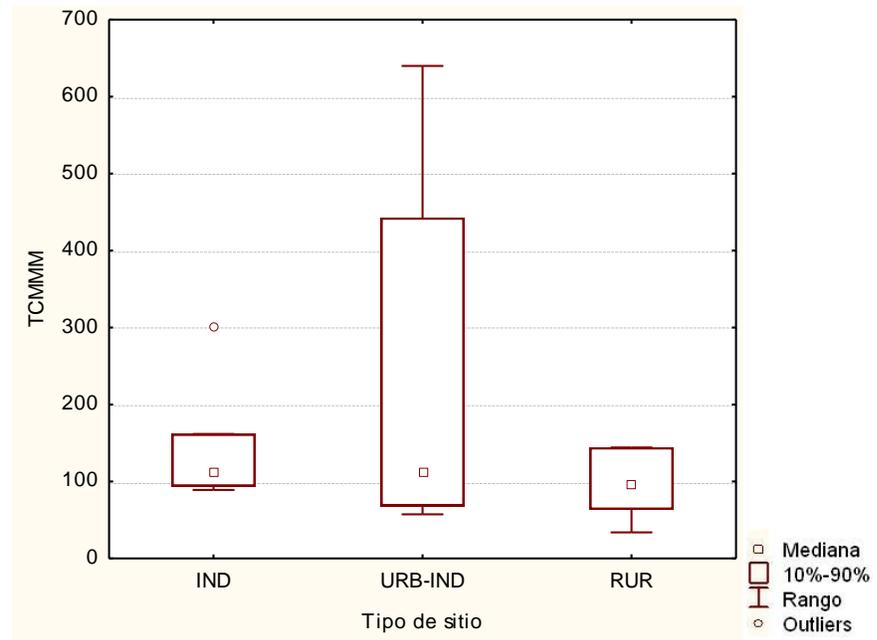


Figura 21. Gráfica de TCMMM: tamaño promedio de los CMM con melanina por tipo de sitio.

### 7.1.2.2 Hemosiderina.

La hemosiderina es el pigmento que presentó los valores más altos de semi desviación inter percentil, en todas las zonas de estudio en el número y porcentaje de área ocupada, cuando se compara con la distribución que siguen los otros pigmentos. (Tabla 2). Por ejemplo, el NCMM con hemosiderina en la zona industrial es de 1.8 (0.3-103.7) con una semi desviación de 103.4 entre el percentil 90 y el 10, mientras que para la misma zona, la diferencia en éste indicador con melanina es de 9.8 y en el caso de la lipofuscina es de 35.8, lo anterior se presentó de forma similar en las otras zonas de estudio.

La dispersión inter percentil de los valores que se presentaron en la zona industrial es mucho más amplia que en el caso del sitio urbano-industrial y el rural. (Tabla 2, Fig. 22). La misma tendencia mencionada se observó cuando se evaluó el porcentaje de área ocupada por los centros y el tamaño de éstos. (Fig. 23 y 24). En cuanto a la dispersión inter percentil de los datos, el valor más alto lo presenta la zona industrial, seguida de la urbana-industrial y finalmente la rural. Es importante señalar que en el análisis realizado para melanina, la zona urbana-industrial es la que presentó mayor variabilidad en los resultados (Fig. 19, 20 y 21). Como ya se mencionó anteriormente, la magnitud de la dispersión inter percentil implica una mayor o menor heterogeneidad en los resultados obtenidos.

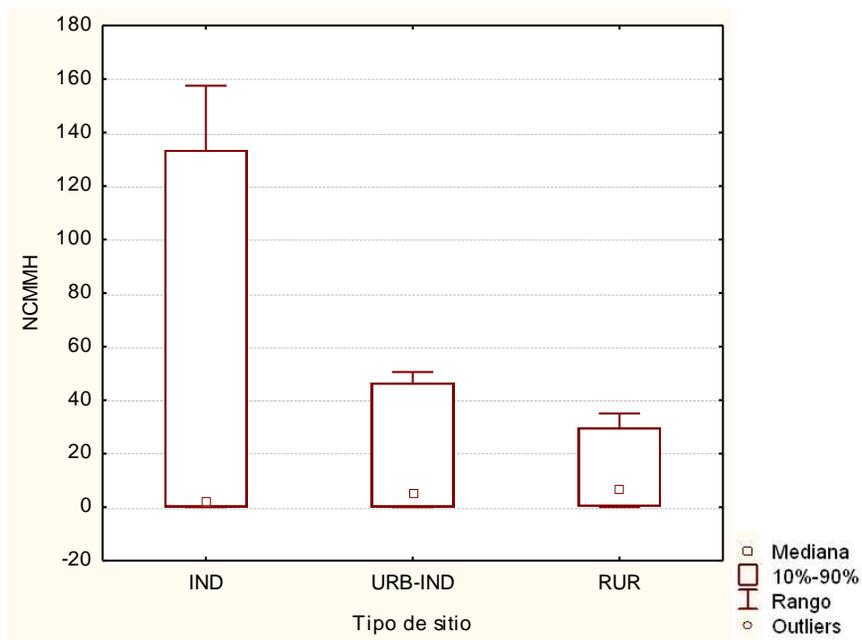


Figura 22. NCMMH: Número de CMM con hemosiderina por tipo de sitio.

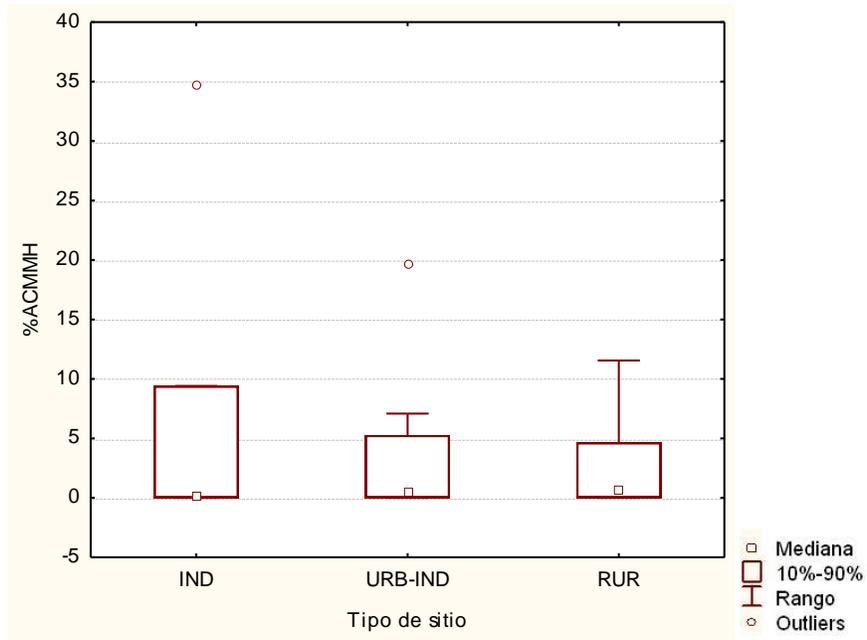


Figura 23. %ACMMH: Porcentaje de área ocupada por CMM con hemosiderina por tipo de sitio.

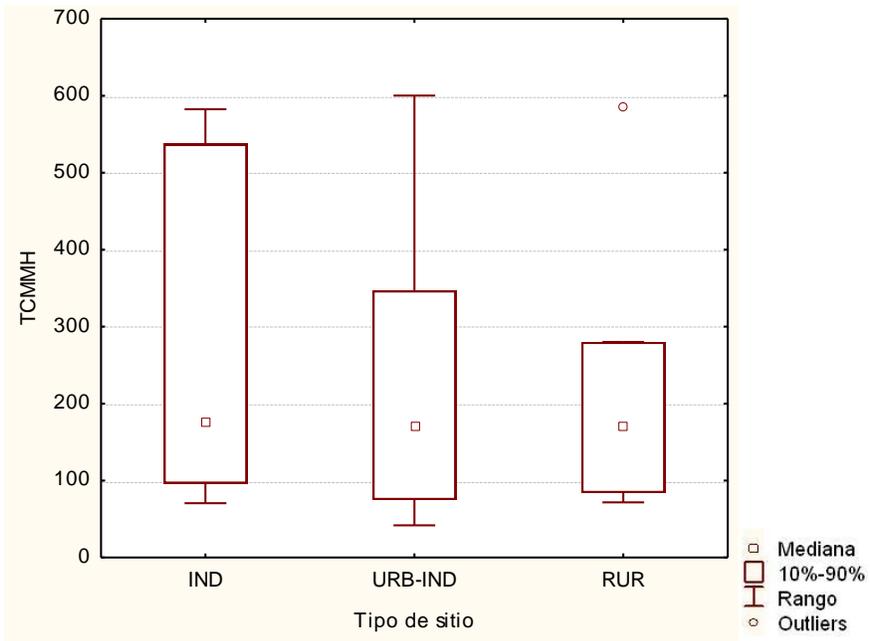


Figura 24. TCMMH: Tamaño de CMM con hemosiderina por tipo de sitio.

### 7.1.2.3 Lipofuscina.

Los resultados obtenidos para el NCMM así como el TCMM con lipofuscina mostraron el mismo comportamiento, en el que la zona industrial presentó los valores más heterogéneos ya que la semi desviación inter percentil es mayor que en las otras zonas, siguiendo en orden decreciente la zona urbana-industrial y finalmente la rural (más homogénea). (Figuras 25 y 27). También es importante señalar que los resultados obtenidos para el conteo y medición de los CMM de la zona industrial con hemosiderina y lipofuscina, presentaron una mayor variabilidad con respecto a las otras dos zonas de estudio (urbana-industrial y rural).

Otro dato de importancia es el porcentaje de área ocupada por CMM con lipofuscina, no demuestra evidentes diferencias en la dispersión de los datos de cada zona de estudio (Fig. 26), es decir que en todas las áreas de estudio, el área que ocupan los centros es prácticamente la misma.

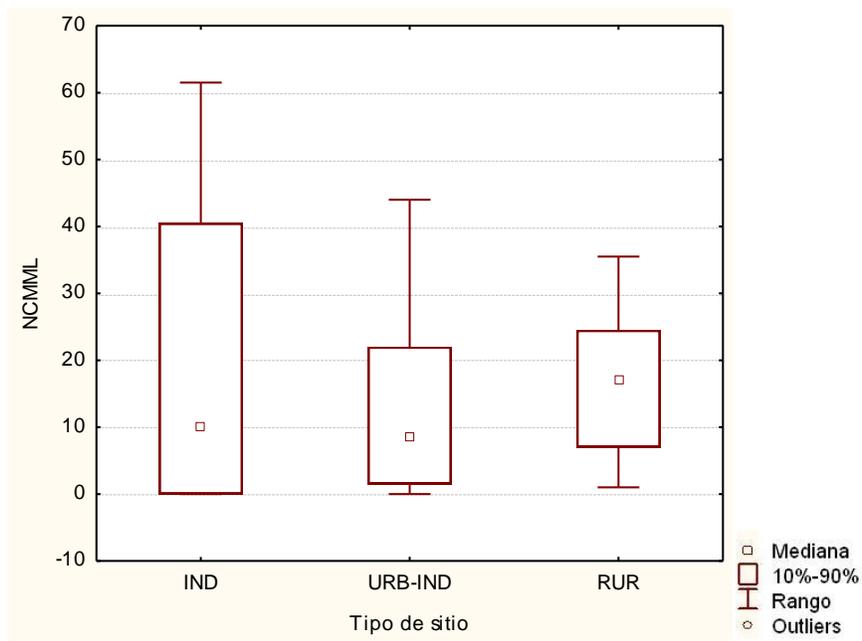


Figura 25. NCMML: Número de CMM con lipofuscina por tipo de sitio.

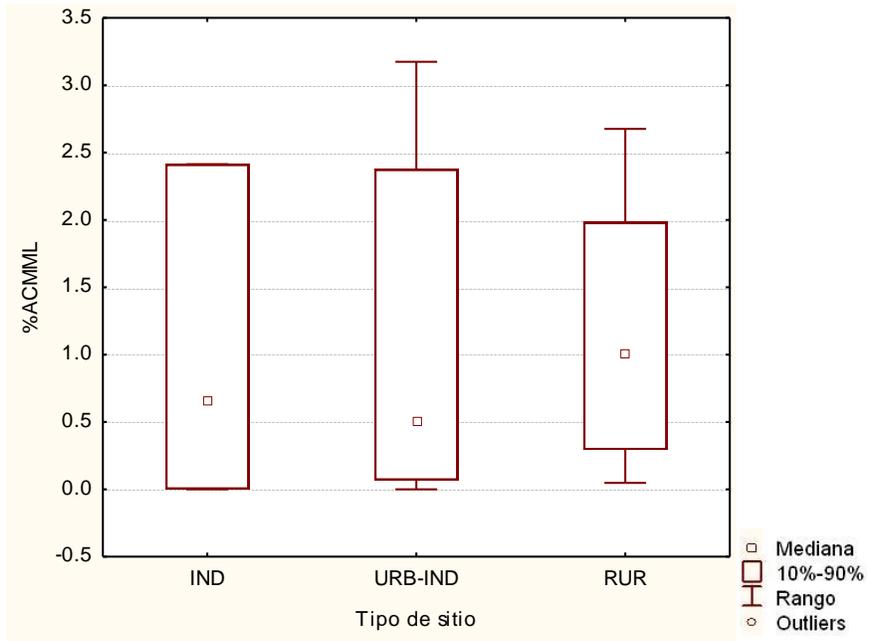


Figura 26. %ACMML: Porcentaje de área ocupada por CMM con lipofuscina por tipo de sitio.

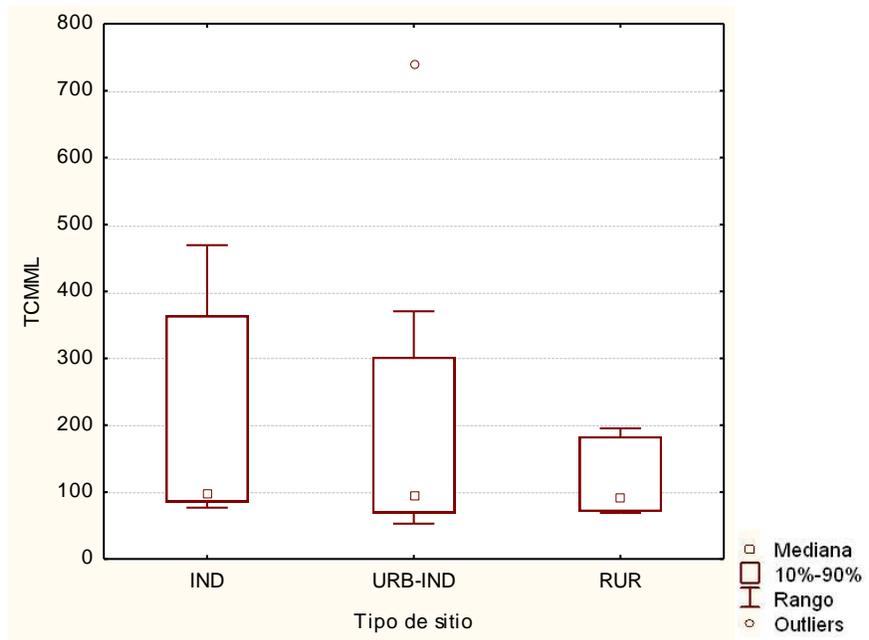


Figura 27. TCMML: Tamaño de CMM con lipofuscina por tipo de sitio.

## 7.2 Análisis estadístico.

Todos los procedimientos estadísticos de este trabajo fueron realizados en el paquete estadístico: StatSoft, STATISTICA. Por lo que, para conocer el comportamiento de los pigmentos entre sí, se aplicaron pruebas de correlación lineal simple y se encontró que existe correlación estadísticamente significativa entre los CMM con lipofuscina y los CMM con melanina ( $P < 0.05$ ). (Fig. 28 y 29). Lo cual nos indica que melanina y lipofuscina tienen un mismo patrón de comportamiento. Por otro lado, al no encontrar correlación de hemosiderina con ninguno de los otros dos pigmentos, se sugiere que éste pigmento sigue un comportamiento independiente.

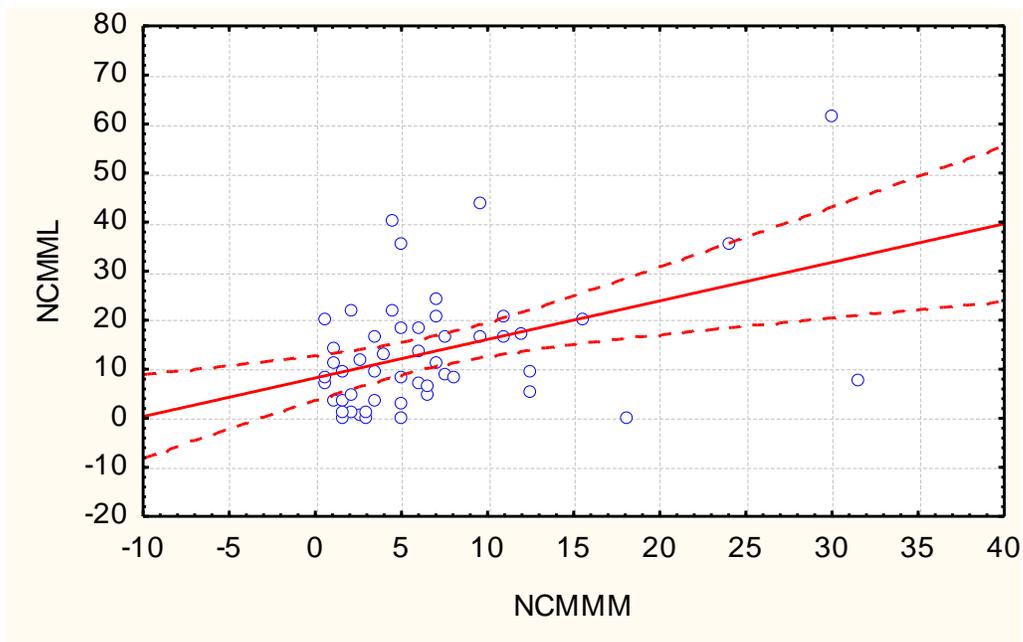
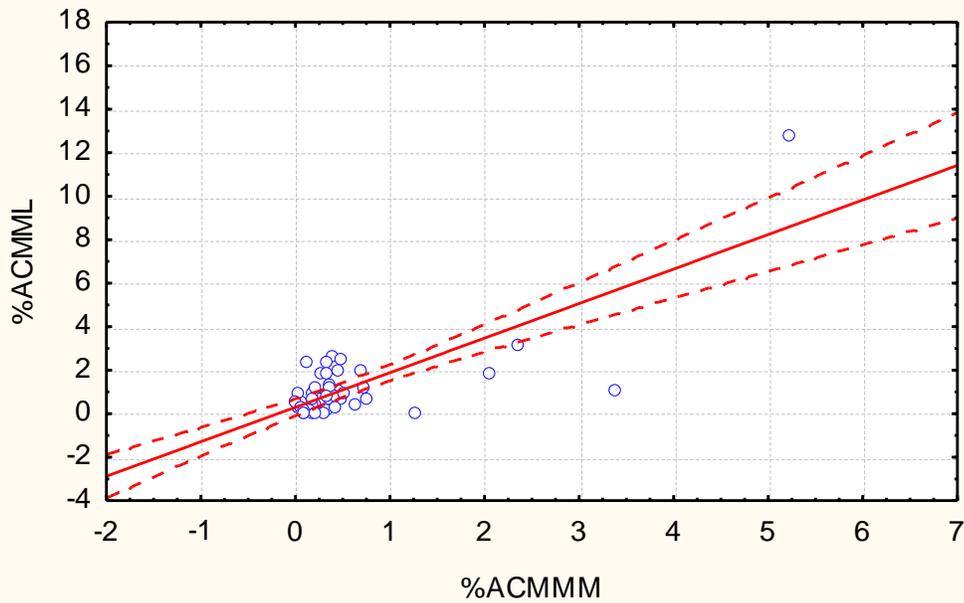


Figura 28. Gráfica de correlación entre pigmentos. NCMMM: número de CMM con melanina, NCMML: número de CMM con lipofuscina. Ecuación de la recta:  $NCMML = 8.22 + 0.78 * NCMMM$ .  $r = 0.4309$  ( $P < 0.05$ ).



Figura

29.

Gráficas de correlación entre pigmentos. %ACMMM: porcentaje de área ocupada por CMM con melanina, %ACMML: porcentaje de área de CMM con lipofuscina. Ecuación de la recta:  $\%ACMML = 0.29 + 1.58 * \%ACMMM$ .  $r = 0.7733$ . ( $P < 0.05$ ).

Los datos originales presentaban una distribución no normal (no paramétricos), por lo cual fueron transformados logarítmicamente y se obtuvo la distribución normal. Para cada indicador de cada pigmento, se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, es decir, se analizó el número, el área y el tamaño de los CMM con cada pigmento. Ésta prueba demostró en todos los casos, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las zonas de estudio ( $P > 0.05$ ).

La gran variabilidad de los resultados queda de manifiesto cuando se observan las gráficas obtenidas, por ejemplo, en la figura 22 podemos observar la diferencia existente entre la distribución de los resultados de acuerdo con la zona de estudio, apreciando que en la zona rural, la cantidad de CMM encontrada en los diferentes organismos de ese sitio, es más homogénea comparada con la de los sitios urbano industriales e industriales, siendo este último el sitio que presenta una mayor heterogeneidad en los valores obtenidos. Las figuras 22, 23, 24, 25 y 27 presentan el mismo patrón en general. Además, los resultados obtenidos para las zonas urbana-industrial e industrial, tienden a distribuirse hacia valores mayores comparado

con la distribución que sigue la zona rural, a pesar de que en la mayoría de los casos el valor de la mediana para cada sitio es muy similar o hasta mayor en la zona rural.

Debido a que éste proyecto forma parte de un estudio muy extenso denominado: “Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México: caso de estudio Coatzacoalcos, Ver.”, y como parte de éste, se analizaron químicamente algunos compuestos orgánicos y también el plomo. En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos del análisis químico de las muestras de tejido de sapo (hígado para compuestos orgánicos y sangre para plomo) de la zona de Coatzacoalcos.

Tabla 3. Concentración de contaminantes en hígado y sangre de sapo gigante. Media y rango.  $\Sigma$ PCBs = congéneres 52, 118, 138, 156, 170, 180 y 187,  $\Sigma$ DDT= DDT + DDE,  $\Sigma$ HCH=  $\alpha$ -HCH +  $\beta$ -HCH +  $\gamma$ -HCH.

TIPO DE SITIO	$\Sigma$ PCBs (ng/g)	$\Sigma$ DDT (ng/g)	$\Sigma$ HCH (ng/g)	Pb ( $\mu$ g/dL)
INDUSTRIAL	2.0 (0.6-3.4)	1.3 (0-2.6)	26.4 (15.2-37.7)	27.4 (5.2-77.4)
URB-IND	36.0 (9.3-83.0)	55.9 (32.5-77.2)	5.7 (1.5-8.0)	11.6(2.6-51.5)
RURAL	2.3 (0.2-4.3)	2.7 (1.2-4.2)	4.3 (1.7-7.0)	5.8 (1.6-15.7)

En el caso de los compuestos orgánicos se observa una distribución en la que la zona urbana-industrial, presenta las concentraciones más altas. Por otro lado, el comportamiento del plomo es distinto ya que se distribuye en un gradiente en el cual la zona industrial presenta las concentraciones más altas, seguida de la urbana-industrial y finalmente la rural, lo anterior concuerda con la localización de las zonas de estudio donde la industrial se encuentra en los alrededores de las fuentes de contaminación, mientras que la rural es la zona más alejada (de 30 a 50 km en línea recta aproximadamente).

## 8 DISCUSIÓN

Los CMM pueden encontrarse en organismos como los peces, anfibios y reptiles, en diferentes órganos como los riñones, el hígado, el bazo y las gónadas. (Agius y Roberts, 2003). Por lo que su presencia en el bazo de los sapos gigantes es normal. De acuerdo con Wolke y cols., (1985), los CMM pueden contener melanina, hemosiderina y lipofuscina, en éste trabajo

pudimos confirmar éste hallazgo por medio de tres técnicas histoquímicas: Fontana-Masson, Perls y Gomori, respectivamente, debido a eso, se analizó cada pigmento por separado.

Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con la hipótesis planteada, en la cual se proponía que la mayor exposición a contaminantes tóxicos se presenta en la zona industrial y urbana-industrial y que esto, sería causa de un aumento en la presencia de CMM en el bazo de los sapos. En este trabajo, se demostró que los CMM tienden a presentar valores mayores en las zonas más contaminadas, en relación con la zona rural, que presenta menores niveles de contaminación. (Fig. 19-27). Sin embargo, no se registró diferencia estadísticamente significativa entre los sitios de estudio, probablemente debido a la gran variabilidad de los datos. (Tabla 2). Katsumiti y cols., (2009) no encontraron diferencia significativa entre los CMM en hígado de peces de un sitio de referencia y los de un lugar contaminado, lo que concuerda con el hecho de que los centros son biomarcadores inespecíficos y que por tanto, pueden responder a diferentes tipos de cambios y estímulos, como son el estrés, deficiencias en la dieta, estado de salud, edad, época reproductiva, etc. (Montero y cols., 1999; Jordanova y cols., 2006; Rosseland y cols., 2007; Kranz, 1989). Lo anterior implica que al evaluar estos centros, se deben considerar diversos factores que pueden influir en los resultados finales.

Por otro lado, existen una gran variedad de contaminantes capaces de modificar la cantidad y tamaño de los CMM en hígado y bazo de peces entre los que se encuentran los compuestos orgánicos como los PAHs, PCBs, PBDEs, plaguicidas, el DDT y sus metabolitos, así como los elementos Cd, Zn y Hg orgánico. (Greenfield y cols., 2008; Hinck y cols., 2007; Suresh, 2009; Facey y cols., 2005; Fournie y cols., 2001; Linzey y cols., 2003; Schwindt y cols., 2008). En nuestra zona de estudio se han registrado la mayoría de los compuestos antes mencionados (ver tabla 3, Bozada y Bejarano, 2006; Stringer y cols., 2001; Ruelas-Inzunza y cols., 2007), éstos se encuentran formando una mezcla que puede cambiar en su composición y proporciones de acuerdo con el sitio específico. Estudios realizados en bazo e hígado de peces, han demostrado que el grupo control presenta una menor cantidad y menor tamaño de los CMM que el grupo de individuos expuestos a cloruro de cadmio y a un efluente de industria papelera, en condiciones controladas (Suresh, 2009; van den Heuvel, y cols., 2005), también se ha reportado ésta tendencia cuando se evalúan los CMM en condiciones de campo y se comparan peces de un sitio de referencia (menos contaminado) con los de sitios contaminados con compuestos clorados, metales pesados, etc. (Hinck y cols., 2007; Couillard y Hodson, 1996; Fournie y cols., 2001; Wolke y cols., 1985).

Un estudio realizado por Hinck y cols., (2008), en bazo de peces, reportó una correlación positiva entre la exposición a PCBs a una concentración en agua de 10 a 70 ng/mL, y el porcentaje de área ocupada por CMM. Los niveles de exposición de éstos organismos resultan aparentemente mayores que los valores observados en los individuos de éste estudio, donde el único sitio que presenta una exposición a éste nivel es el urbano-industrial donde la sumatoria de la concentración de estos contaminantes es de  $36.01 \pm 40.83$  ng/g de tejido. Sin embargo, cabe señalar que en ese estudio evaluaron la dosis de exposición (concentración del contaminante en una matriz ambiental) a diferencia del presente trabajo, en el que reportamos la dosis interna (concentración del contaminante en tejido del sapo), por lo que en ciertos casos, la concentración ambiental puede ser mayor cuando los contaminantes no han sido absorbidos por los organismos.

Linzey y cols., (2003), realizaron un estudio en el que registraron la existencia de que existe una correlación positiva entre la concentración de DDE (50 a 217 ng/g) en alimento de sapos gigantes y la cantidad y tamaño de los CMM. Como parte del proyecto del que forma parte éste estudio, el grupo de trabajo realizó la cuantificación del DDE y DDT en hígado de sapos, los resultados obtenidos demuestran que el sitio que presenta mayores dosis internas es el urbano-industrial con  $55.84 \pm 22.38$  ng/g de tejido. Un estudio realizado por Loumbourdis, (2007) demostró que la cantidad y el área ocupada de los CMM en hígado de ranas expuestas a metales pesados, son mayores que en las no expuestas. En general de las concentraciones y dosis de exposición reportadas en otros estudios, podemos observar que éstas tienden a ser mayores que las encontradas en los organismos de éste estudio. Como se puede observar en la tabla 3, la zona aparentemente más contaminada por compuestos orgánicos es la urbana-industrial, sin embargo, existen otras variables y otros contaminantes que no fueron analizados o que no fueron detectados, por lo que resulta muy arriesgado considerarla de ésta forma, ya que como se mencionó anteriormente los efectos que producen las mezclas en el ambiente y en los organismos vivos son distintos a los que causan los contaminantes que la conforman de forma individual. Por otro lado, la distribución del plomo sigue otra tendencia, encontrando que la zona industrial es la más impactada, seguida de la urbana-industrial y finalmente el sitio menos impactado es el rural, el cual se encuentra más alejado de la zona industrial. No fue posible apreciar un patrón de distribución de los contaminantes, lo que probablemente ocasiona que los CMM tampoco se presenten de forma diferenciada en los distintos sitios de estudio, ya que como se mencionó anteriormente, son biomarcadores inespecíficos.

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas estadísticamente, sí se apreciaron tendencias en cuanto a la distribución de los resultados en cada zona (Figuras 19-27), encontrando que la zona industrial donde se encuentran las concentraciones más altas de plomo (Tabla 3, Fig. 22-27), es donde se presenta la variación más amplia de datos para la hemosiderina y la lipofuscina. Mientras que en la zona urbana-industrial donde se presentan las concentraciones más altas de compuestos orgánicos (Tabla 3, Fig. 19-21), la dispersión de los valores de melanina es mayor. Por lo que nuestros resultados sugieren, un posible efecto de la composición de la mezcla química, sobre los pigmentos encontrados en los CMM.

El comportamiento de los pigmentos, se encuentra relacionado con su origen y su vía de formación. Kalashnikova, (2000), sugiere que el origen de la melanina en los CMM en hígado de ranas procede de la destrucción de eritrocitos, donde la tirosina es convertida a melanina por la tirosinasa. Éste pigmento, está conformado por un amplio grupo de moléculas de alto peso molecular, estables, amorfas y con carga negativa, que funcionan como antioxidantes y pueden proteger el hígado de los organismos poiquilotermos contra los radicales libres, realizando la misma función que la enzima superóxido dismutasa en los tejidos no pigmentados. Se ha registrado una relación recíproca entre la cantidad de melanina celular y la actividad de la enzima superóxido dismutasa en ranas. (Loumbourdis, 2007). Las moléculas de la melanina unen diversos metales de transición, debido a que poseen varios sitios carboxilados, que actúan como quelantes de cationes, disminuyendo así su concentración, lo que disminuye su toxicidad; por lo que un aumento en el contenido de ésta, proporciona un efecto protector contra la presencia de radicales libres en el organismo. (Loumbourdis, 2007; Urán y Cano, 2008). Éste proceso como mecanismo de defensa, activa la producción de melanina cuando el organismo se enfrenta a los radicales libres.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, no presentan diferencia estadísticamente significativa entre los CMM con melanina en los diferentes sitios de estudio, debido probablemente a que los niveles de exposición pueden ser similares entre sí y a que la respuesta inmunológica de cada organismo se lleva a cabo de forma distinta, ya que puede ser modificada por otros factores: tales como la desnutrición y la deficiencia de vitaminas. Ésta última puede provocar un aumento en la cantidad de melanina que se produce, debido a que aumenta la actividad de la tirosinasa; otros factores como las enfermedades hepáticas crónicas por aumento de estrógenos, la hemocromatosis (liberación de tirosina al unirse al hierro depositado con el grupo sulfhidrilo) y la ingestión de drogas o metales, también pueden ocasionar este efecto. (UCC, *Alteraciones de los pigmentos*, 2010).

La hemosiderina, es el pigmento que se forma como producto de la destrucción de eritrocitos viejos o dañados. Ésta se puede acumular en varios tipos celulares como los hepatocitos y los CMM, cuando se incrementa la absorción de hierro, lo que ocasiona la peroxidación de los lípidos celulares por medio de radicales libres y con esto, un aumento de la fragilidad de la membrana lisosomal, con la consecuente acumulación de la hemosiderina. Los depósitos de éste pigmento no son tóxicos, pero son un signo de alteración en la vida media de los eritrocitos y su metabolismo, su presencia indica hemólisis patológica. (UDA, *Trastornos del metabolismo mineral y de los pigmentos*, 2010; UCC, *Alteraciones de los pigmentos*, 2010). Algunas causas de hemólisis son la inanición, por un proceso metabólico que aún se desconoce y también la anemia hemolítica y/o hemorragias. (Wolke y cols., 1985).

La tendencia a aumentar la presencia de hemosiderina en los CMM, se explica por la ubicación de la zona de estudio respecto de las fuentes de contaminación. En general, un incremento en la cantidad de CMM indica un rápido reciclaje de los tejidos, que puede ser causado por los agentes tóxicos, ya que se producen radicales libres que provocan la muerte celular. (Kalashnikova, 2000). La presencia de los CMM con hemosiderina en nuestro estudio, concuerda con lo reportado en la literatura, ya que la zona industrial que se encuentra más impactada por el plomo, es donde los valores para los CMM tienden a ser mayores que en las otras zonas, por los posibles efectos que se mencionaron anteriormente. (Fig. 22-24).

La lipofuscina es un pigmento que puede presentarse de forma normal o patológica. Es considerado como el pigmento de desgaste o del envejecimiento. (UDA, *Trastornos del metabolismo mineral y de los pigmentos*, 2010). Generalmente, se produce cuando hay aceleración de los procesos de recambio celular, cuando hay destrucción de organelos y cuando se producen metabolitos que aumenten la peroxidación lipídica. Se puede presentar por otras causas: como intoxicaciones y el consumo de medicamentos o drogas. En estas condiciones se forma lipofuscina especialmente en el hígado. (UCC, *Alteraciones de los pigmentos*, 2010). Existen también, contaminantes ambientales que favorecen la peroxidación lipídica como son: los efluentes de la industria papelera, los plaguicidas organofosforados y algunos metales.

Nuestros resultados del TCMM con lipofuscina sugieren que éste pigmento se está presentando en mayor medida y de forma organizada (CMM más grandes), en la zona industrial, mientras que en la zona rural el tamaño tiende a ser menor, ya que probablemente la exposición a los agentes contaminantes capaces de generar radicales libres es menor. Es

importante no perder de vista que los factores externos influyen altamente en el desarrollo de los CMM, por ejemplo, la deficiencia de antioxidantes como la vitamina E puede ocasionar un aumento en la producción de lipofuscina y también ocasiona que los eritrocitos se vuelvan frágiles. (Kurtovic y cols., 2008).

Como se mostró en las figuras 28 y 29, la melanina y la lipofuscina presentaron un patrón de correlación, por lo que es importante resaltar, que estos pigmentos tienen como característica común el hecho de que su presencia se encuentra ligada al estrés oxidativo, ya que como se mencionó anteriormente, la melanina es un antioxidante capaz de neutralizar radicales libres y que por tanto su producción se lleva a cabo cuando éstas moléculas se encuentran presentes y por otro lado, la lipofuscina es un producto de la degradación de membranas celulares, proceso ocasionado por las agresiones de los radicales libres.

Es importante señalar, que no fue posible, contar con un grupo de individuos como control negativo en este estudio, el cual nos habría permitido obtener los valores basales de los parámetros evaluados en sapos de ésta especie, saludables y no expuestos. Aún cuando las condiciones de campo y las condiciones de crianza controlada son completamente distintas, podrían haber brindado un punto de partida hacia la evaluación de incremento o decremento en los CMM.

Por otro lado, el sitio de referencia (zona rural: Uxpanapa y Palomas) de éste estudio, es una zona ubicada en las cercanías del río Coatzacoalcos, pero que se encuentra alejada de la zona industrial entre 30 a 50 km en línea recta, por lo que se considera que las condiciones ambientales son similares a las de los otros sitios y que debido a la lejanía que tiene del centro industrial, la exposición a contaminantes es menor. Aún cuando se esperaba que en la zona rural la cantidad y el tamaño de los CMM fuera menor que en las otras zonas, no se encontraron diferencias significativas, probablemente debido al transporte de contaminantes, ya que ahí también se encontraron pero a diferente concentración. También hay que resaltar que existen otros muchos agentes tóxicos que no fueron analizados, y que por tanto se desconoce si se encuentran presentes, esto aunado a las condiciones ecológicas y a la perturbación del sitio, que como ya se mencionó anteriormente, también pueden tener un efecto sobre los CMM.

Los contaminantes pueden dispersarse en el ambiente, debido a factores como las propiedades físicas y químicas del compuesto, así como las condiciones climáticas y geográficas del sitio en el que se encuentren. (Walker, 2009). Ésta dispersión es la que ocasiona que a pesar de que la fuente de contaminación se encuentra en la zona industrial, la

zona rural y la urbana-industrial presenten ciertas cantidades de los contaminantes, donde no fue posible encontrar un gradiente de distribución de los mismos. En la zona de Coatzacoalcos, la primera refinería establecida fue en Minatitlán en 1908, y a partir de entonces, la perturbación en el medio ambiente se incrementó no solo por la industria, sino también por la formación de centros urbanos. (Bozada y Bejarano, 2006). Aunado a lo anterior, la zona de Coatzacoalcos es una zona donde se presentan inundaciones de forma común, por lo que el arrastre de suelo, sedimentos y aguas provoca la dispersión de los contaminantes, hacia sitios más alejados, por lo que las concentraciones de los compuestos tóxicos, no presentan niveles muy contrastantes entre cada zona, ocasionando probablemente que los CMM no se expresen de forma muy distinta en cada una.

Otro factor importante a considerar en los resultados obtenidos: es la variabilidad, la cual procede en gran medida de la susceptibilidad de los organismos. Por un lado, ésta susceptibilidad puede atribuirse a factores abióticos como la forma química del contaminante, la geografía del sitio, etc. y por otro, encontramos a la herencia genética y a los errores del método de estudio. (Evenden y Depledge, 1997; Forbes, 1998). Dentro de una población de organismos, la recombinación genética puede ejercer un efecto sobre la susceptibilidad a los efectos producidos por la exposición a los agentes tóxicos. En poblaciones de animales silvestres es posible encontrar una gran variabilidad genética y por tanto diferencias en la susceptibilidad individual, lo cual implica que la exposición a compuestos químicos o mezclas complejas de contaminantes, ocasionan efectos distintos entre los individuos de una misma población, que se encuentran en los mismos niveles de exposición. (Evenden y Depledge, 1997). Lo anterior sugiere, que la susceptibilidad individual, puede ser el factor que ocasiona la gran variabilidad en los resultados obtenidos en este trabajo.

## **9 CONCLUSIONES**

A pesar de que en el presente estudio, no se obtuvieron resultados o evidencias contundentes de que la exposición a contaminantes ambientales incrementa la expresión de los CMM, sin embargo la dispersión de los resultados, hace referencia a la variabilidad de exposición y a la susceptibilidad de los individuos en las zonas más impactadas. Debido a lo anterior, no se descarta la utilidad de los CMM como biomarcadores de efecto.

Este trabajo, contribuye a apoyar el uso de los CMM como biomarcadores, ya que al ser inespecíficos, pueden brindar información importante acerca de la exposición a contaminantes

y al estrés ambiental en su hábitat. Lo anterior también puede representar su principal limitación, ya que no permite discriminar adecuadamente cuáles son los elementos ambientales causantes de tales modificaciones, por lo que su uso, sería más bien restringido a un principio exploratorio. Los sapos, debido a su fisiología y características biológicas, representan diversas rutas y vías exposición, además de que por su importancia ecológica, la información que aportan en los procedimientos de evaluación de riesgo de sitios contaminados puede ser de gran relevancia.

Es importante señalar, que resulta indispensable estudiar la presencia de los CMM en el bazo de los sapos gigantes, en condiciones controladas y en condiciones de campo, para tratar de apreciar los efectos que los contaminantes tóxicos ocasionan, y finalmente establecer su utilidad como biomarcadores.

Como ya se discutió en la sección anterior, los estudios en peces han demostrado la importancia y utilidad de los CMM como biomarcadores de estrés ambiental, sin embargo como se reporta en éste trabajo, en los sapos no fue así, probablemente debido a las características fisiológicas propias de cada especie y las vías de exposición respectivas. Porque para los peces la única ruta de exposición es el agua, mientras que en el caso de los sapos, tanto el agua como el suelo son fundamentales, dependiendo de la etapa del ciclo de vida en el que se presentan.

Por otro lado es posible que otro de los factores que afectaron los resultados de este trabajo, sea el tamaño de la muestra de estudio, es decir, en estudios ecotoxicológicos como este la variabilidad en la respuesta de los individuos es grande, lo cual dificulta encontrar diferencias entre grupos pequeños como en éste caso, por lo cual resulta indispensable aumentar el tamaño de la muestra, para así disminuir la variabilidad y encontrar las posibles diferencias.

## 10 ANEXO I

### 10.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### 10.1.1 Fijador

##### 10.1.1.1 *Solución de Formalina neutra al 10%, estabilizada.*

Formaldehído, 37% - 40%	100 mL
Agua destilada	900 mL
Fosfato de sodio, monobásico	4 g
Fosfato de sodio, dibásico	6.5 g

Se pesan las sales de fosfatos y se disuelven en agua destilada, y se añade el formaldehído. Su almacenaje debe ser preferentemente, en frasco de vidrio color ámbar, rotulado como sustancia peligrosa. (Lillie y Fullmer, 1976; Thompson y Luna, 1978).

#### 10.1.2 Preparación de alcoholes.

##### 10.1.2.1 *Ejemplo: Etanol 70% a partir de etanol 100%.*

*Reactivos: Etanol absoluto y agua destilada.*

Etanol absoluto	70 mL
Agua destilada	30 mL

Se miden ambos volúmenes y se mezclan. Se pueden almacenar en frascos de vidrio o de plástico.

#### 10.1.3 Preparación de laminillas.

##### 10.1.3.1 *Silano al 2% en acetona.*

*Reactivos: Silano y acetona.*

Silano	2 mL
Acetona	98 mL

De preferencia, se mide el volumen indicado de acetona en una probeta, y posteriormente se mide añade el silano. Es importante señalar, que esta solución debe prepararse al momento de usarla, ya que se degrada.

#### **10.1.4 Técnica de Hematoxilina-Eosina.**

##### **10.1.4.1 Alcohol ácido.**

*Reactivos: etanol 96%, ácido clorhídrico concentrado y agua destilada.*

Etanol 96%	350 mL
Ácido clorhídrico	5 mL
Agua destilada	150 mL

Se mezclan los volúmenes indicados de agua destilada y etanol 96%, finalmente se añade el ácido clorhídrico.

##### **10.1.4.2 Agua amoniacal 1%.**

*Reactivos: hidróxido de amonio concentrado y agua destilada.*

Hidróxido de amonio	5 mL
Agua destilada	495 mL

Se miden los volúmenes de ambos reactivos y se mezclan.

##### **10.1.4.3 Hematoxilina de Harris.**

*Reactivos: hematoxilina, sulfato de aluminio y potasio, óxido rojo de mercurio, etanol 100% y agua destilada.*

Hematoxilina	15 g
Sulfato de aluminio y potasio	300 g
Óxido rojo de mercurio	7.5 g
Etanol 100%	150 mL
Agua destilada	3000 mL

Agite vigorosamente para disolver la hematoxilina en el alcohol, a temperatura ambiente. Se disuelve completamente el sulfato de aluminio y potasio en agua destilada con la ayuda de calor y de agitación. Retire del calor y mezcle lentamente con la primera solución. Vuelva a calentar la mezcla, hasta que llegue a ebullición lo más pronto posible. Remueva del calor y añada lentamente el óxido de mercurio. Devuelva al calor hasta que la solución se torne de color púrpura oscuro, remueva del calor, y enfríe en agua fría. Añada 20 mL de ácido acético glacial. Filtre cada vez antes de usarla.

### ***Eosina.***

*Reactivos: eosina amarillenta, etanol 96%, etanol 80% y ácido acético glacial concentrado.*

#### *Solución A:*

Eosina amarillenta	1 g
Etanol 96%	80 mL
Agua destilada	20 mL

Se mezclan las cantidades indicadas de etanol 96% y agua destilada. Se pesa la eosina y se disuelve en la mezcla previa.

#### *Solución B*

Solución A	100 mL
Etanol 80 %	300 mL
Ácido acético glacial	20 mL

Se toman 100 mL de la solución A y se añade el etanol al 80%, por último se agrega el ácido acético glacial

## **10.1.5 Técnica de Fontana-Masson.**

### **10.1.5.1 Solución de Nitrato de plata.**

*Reactivos: Nitrato de plata, hidróxido de amonio y agua destilada.*

Nitrato de plata	2 g
Agua destilada	40 mL

Hidróxido de amonio concentrado.

Se pesa el nitrato de plata y se disuelve en 20 mL de agua destilada. Posteriormente, se añade gota a gota la solución de hidróxido de amonio concentrado, hasta que el precipitado café desaparezca (dejando una ligera turbiedad, sin volverse totalmente transparente). Finalmente, se añaden otros 20 mL de agua destilada, se filtra y se almacena en frasco ámbar. Puede permanecer útil hasta por 30 días.

#### **10.1.5.2 Solución de Tiosulfato de sodio 5%.**

*Reactivos: tiosulfato de sodio y agua destilada.*

Tiosulfato de sodio	5 g
Agua destilada	95 mL

Se pesa el tiosulfato de sodio y se agrega al volumen indicado de agua destilada. Se agita la mezcla hasta disolver perfectamente.

#### **10.1.5.3 Rojo neutro acuoso 0.5%.**

*Reactivos: rojo neutro y agua destilada.*

Rojo neutro	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Se pesa la cantidad indicada de rojo neutro, se disuelve en agua destilada y se afora a 100 mL.

### **10.1.6 Técnica de Perls.**

#### **10.1.6.1 Ferrocianuro de potasio al 2%.**

*Reactivos: ferrocianuro de potasio y agua destilada.*

Ferrocianuro de potasio	2 g
Agua destilada	100 mL

Se pesa el ferrocianuro de potasio y se disuelve en agua destilada. Finalmente se afora a 100 mL.

#### **10.1.6.2                    Ácido clorhídrico al 2%.**

*Reactivos: ácido clorhídrico y agua destilada.*

Ácido clorhídrico	2 mL
Agua destilada	98 mL

Se miden 98 mL de agua destilada y posteriormente se le añaden 2 mL de ácido clorhídrico (nunca a la inversa).

#### **10.1.7                    Técnica de Gomori.**

##### **10.1.7.1                    Permanganato de potasio acidificado.**

*Reactivos. Permanganato de potasio (polvo), ácido sulfúrico concentrado y agua destilada.*

Permanganato de potasio	0.25 g
Ácido sulfúrico	0.1 mL
Agua destilada	100 mL

Se pesa la cantidad indicada de permanganato de potasio y se disuelve en agua destilada, se añade el ácido sulfúrico y se afora con agua destilada a 100 mL. Ésta solución debe almacenarse en frasco ámbar bien protegido de la luz, ya que es fotosensible.

##### **10.1.7.2                    Aldehído fuscina.**

*Reactivos. Pararosanilina, etanol 70%, ácido clorhídrico y acetaldehído.*

Pararosanilina	1 g
Etanol 70%	100 mL
Ácido clorhídrico	1 mL
Acetaldehído	2 mL

Se pesa a pararrosanilina y se disuelve en el volumen indicado de etanol 70%. Posteriormente se añade el ácido clorhídrico y al final el acetaldehído. La mezcla debe ser agitada fuertemente. Se almacena de 3 a 5 días a temperatura ambiente, exponiéndola a luz natural para que la solución se vuelva de color azul. Después debe ser almacenada a 4 °C, y puede permanecer estable por hasta 2 meses.

### **10.1.7.3                    Ácido oxálico 2%.**

*Reactivos: ácido oxálico (cristal) y agua destilada.*

Ácido oxálico	2 g
Agua destilada	100 mL

Se pesa la cantidad indicada de ácido oxálico y se disuelve en agua destilada, obteniendo un volumen final de 100 mL.

## 11 ANEXO II

### 11.1 Preparación de laminillas.

**Fundamento:** Usar la solución de silano como adherente para los cortes de tejido, disminuye la interferencia y la aparición de artefactos que se pueden presentar con el uso de gelatina.

**Materiales:** Silano y acetona.

**Método:**

1. Con una gasa seca y limpia, se quita el polvo de las laminillas nuevas a utilizar.
2. Se sumergen las laminillas en la solución al 2% de silano en acetona durante 2 min.
3. Posteriormente, se enjuagan las laminillas en dos cambios de agua destilada.
4. Las laminillas se sacan del agua y se colocan sobre un papel limpio para que se sequen al ambiente. De preferencia se utilizan hasta 24 h después, cuando están secas perfectamente.

NOTA: no se observa ningún cambio en las laminillas a simple vista.

## 12 ANEXO III

### 12.1 TINCIONES.

#### 12.1.1 Técnica de Hematoxilina – Eosina.

**Fundamento:** es la técnica de tinción más ampliamente utilizada en microscopía de luz para evaluar de manera general la histología de los tejidos. La hematoxilina es un colorante natural que tiene comportamiento básico, y por ello tiene afinidad por los componentes ácidos de la célula (núcleo) y los tiñe de azul; la eosina (colorante artificial) es de naturaleza ácida, por lo que tiene afinidad por los compuestos básicos de la célula y los tiñe de rojo.

**Reactivos:** etanol en diferentes grados, hematoxilina, ácido clorhídrico y eosina Y.

**Método:**

1. Desparafinar y rehidratar el tejido de forma habitual.
2. Teñir con hematoxilina de Harris por 5 min.
3. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.
4. Diferenciar por medio de alcohol ácido, con una inmersión rápida.
5. Lavar con agua destilada.
6. Virar el pH con una inmersión rápida en agua amoniacal.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Teñir en una solución de eosina por 10 segundos.
9. Lavar en agua corriente de 1 a 5 min.
10. Deshidratar por medio de los alcoholes, aclarar y montar.

**Resultados:** el núcleo se tiñe de azul, el citoplasma de la célula se observará de rosado a rojo, los glóbulos rojos se tiñen de naranja o rojo y las redes de fibrina, de rosa intenso.

(Bancroft y Gamble, 2008).

#### 12.1.2 Técnica de Fontana-Masson.

**Fundamento:** las quinonas de la melanina son capaces de reducir espontáneamente a la plata, dando lugar a plata metálica de color negro.

**Reactivos:** nitrato de Plata (cristal), hidróxido de amonio, rojo neutral acuoso, tiosulfato de sodio y medio de montaje.

**Método:**

1. Desparafinar y rehidratar el tejido de forma habitual.
2. Las muestras se sumergen en la solución de nitrato de plata al 10% durante 24 h de temperatura ambiente o por 45 minutos en el horno a 37°C.
3. Lavar bien con agua destilada.
4. Sumergir los cortes en una solución de tiosulfato de sodio al 5% por 5 minutos.
5. Lavar con agua de la llave.
6. Contrateñir con rojo neutro acuoso al 0.5% durante 4 minutos.
7. Lavar con agua de la llave y enjuagar brevemente con agua destilada.
8. Deshidratar, aclarar y montar en resina sintética.

**Resultados:** la melanina se tiñe de negro y los núcleos celulares de rojo. Como control para la técnica se pueden utilizar cortes de ojo o de piel.

(Romero-Díaz, 2008).

### **12.1.3 Técnica de Perls (1867).**

**Fundamento:** el tratamiento con la solución de ferrocianuro ácido permite la demostración del hierro, en la forma de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , por dilución con ácido clorhídrico. Después, el hierro reacciona con la solución diluida de ferrocianuro de potasio para producir un compuesto azul, insoluble, ferrocianuro férrico (azul Prusia).

**Reactivos:** ferrocianuro de potasio, ácido clorhídrico, rojo neutral acuoso y resina.

**Método:**

1. Desparafinar y rehidratar el tejido por de forma habitual.
2. Tratar la muestra y el control con la solución de ferrocianuro ácido recién preparada por un tiempo de 10 a 30 min.
3. lavar bien con agua destilada.
4. Resaltar el núcleo con una solución acuosa de rojo neutral al 0.5 %.
5. Lavar rápidamente en agua destilada.
6. Deshidratar, aclarar y montar en resina sintética.

**Resultados:** los residuos de hierro se tiñen de azul y el núcleo rojo. Para verificar los resultados de la técnica se puede emplear un corte de pulmón.

(Bancroft y Gamble, 2008).

#### **12.1.4 Técnica de Gomori (1950).**

**Reactivos:** permanganato de potasio, ácido sulfúrico, ácido oxálico, pararosanilina, etanol y resina.

**Método:**

1. Desparafinar y rehidratar el tejido de forma habitual.
2. Tratar la muestra con una solución de permanganato de potasio acidificado por 5 min.
3. Lavar bien con agua destilada y después colocarlo en la solución de ácido oxálico, para aclarar durante 2 min.
4. Lavar con agua destilada.
5. Aclarar en etanol al 70 %.
6. Teñir en aldehído fuscina por 5 minutos aproximadamente.
7. Aclarar con etanol al 70 %, seguido de tres lavados en agua destilada limpia.
8. Deshidratar, aclarar y montar en resina sintética.

**Resultados:** la lipofuscina se tiñe de color púrpura, al igual que las fibras elásticas. Como control para la técnica se pueden emplear cortes de páncreas.

(Bancroft y Gamble, 2008)

## 13 NOMENCLATURA

%	Porcentaje
%ACMM	Porcentaje de área ocupada por centros melano macrófagos
°C	Grados centígrados
μm	Micrómetros
Σ	Sumatoria
<	Menor que
>	Mayor que
≈	Aproximadamente
±	Más menos
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Al	Aluminio
As	Arsénico
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Be	Berilio
Cd	Cadmio
CMM	Centros de melano macrófagos
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
COPs	Compuestos Orgánicos Persistentes
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
EHC	Environmental Health Criteria
EPA	Environmental Protection Agency

Fe	Fierro
g	Gramos
h	Horas
Ha	Hectáreas
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexano
Hg	Mercurio
IARC	International Agency for Research on Cancer
INE	Instituto Nacional de Ecología
IPEN	International POPs Elimination Network
km	Kilómetros
Kow	Coeficiente de partición octanol-agua
m	Metros
m <sup>2</sup>	Metros cuadrados
Min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
Mn	Manganeso
N	Tamaño de muestra
NCMM	Número de centros de melano macrófagos
ng	Nanogramos
Ni	Níquel
NOM	Norma Oficial Mexicana
P	Probabilidad
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
Pb	Plomo
PCBs	Polychlorinated biphenyls

PEMEX	Petróleos Mexicanos
pH	Potencial de hidrógeno
POPs	Persistent Organic Pollutants
Se	Selenio
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
TCDD	Tetraclorodibenzodioxina
TCMM	Tamaño de los centros de melano macrófagos ( $\mu\text{m}^2$ )
Ti	Titanio
UCC	Universidad Católica de Chile
UA	Universidad de Antioquia
UNEP	United Nations Environmental Program
USGS	United States Geological Service
USNTP	United States National Toxicology Program
V	Vanadio
Zn	Zinc

## 14 REFERENCIAS

1. Adeyemo, O., (2008). "Histological alterations observed in the gills and ovaries of *Clarias gariepinus* exposed to environmentally relevant lead concentrations", *Journal of environmental health*, Vol. 70 (9), pp. 40-51.
2. Afshar, S., Farshid, A., Heidari, R., y Ilkhanipour, M., (2008). "Histopathological changes in the liver and kidney tissues of Wistar albino rat exposed to fenitrothion", *Toxicology and industrial health*, Vol. 24, pp. 581-586.
3. Agius, C., y Roberts, R., (2003). "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology", *Journal of fish diseases*, Vol. 26, pp. 499- 509.
4. Álvarez, V., (1999). "Compendio de apuntes de meteorología (teoría). Universidad Autónoma Chapingo", México, pp. 169.
5. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry ToxFAQs (2007). Benceno.
6. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry ToxFAQs (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

7. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry ToxFAQs (2001). Polychlorinated biphenyls, (PCBs).
8. Bancroft, J., y Gamble, M., (2008). "Theory and practice of histological techniques", Churchill Livingstone *Elsevier*, 6ª ed., pp. 126, 127, 235, 245, 247, 248.
9. Boyer, R., y Grue, C., (1995). "The Need for Water Quality Criteria for Frogs", *Environmental health perspectives*, Vol. 103 (4), pp. 352-357.
10. Bozada, L., y Bejarano, F., (2006). "Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano". Proyecto internacional de eliminación de COPs., pp. 7-51.
11. Bursian, S., Sharma, C., Aulerich, R., Yamini, B., Mitchell, R., Beckett, K., Orazio, C., Moore, D., Svirsky, S., Tillitt, D., (2006). "Dietary exposure of mink (*Mustela vison*) to fish from the Housatonic river, Berkshire County, Massachusetts, USA: effects on organ weights and histology and hepatic concentrations of polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxic equivalence", *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 25 (6), pp. 1541-1550.
12. Calow, P., y Forbes, V., (2003). "Does ecotoxicology inform ecological risk assessment?" *Environmental science and technology*, pp. 146A-151A.
13. Chambers, J., Boone, J., Carr, R., Chambers, H., y Straus, D., (2002). "Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment", *Human and ecological risk assessment*, Vol. 8, pp165-176.
14. Clements, W., y Rohr, J., (2009). "Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects", *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 28 (9), pp. 1789-1800.
15. Commoner, Barry, (1992). "Making peace with the planet", *The new press*, pp. 3-18.
16. CONABIO, Comisión Nacional para el uso y el conocimiento de la Biodiversidad, "Cuenca media y alta del río Coatzacoalcos". Consultado Abril 26, 2010, página web [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp\\_081.html](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_081.html).
17. Conant, R., y Collins, J., (1991). "Peterson field guide to reptiles and amphibians, eastern and central North America", 3a. edición, *Houghton Mifflin Company*, pp. 450.
18. Consejo de cuenca del Río Coatzacoalcos, consultado Abril 15, 2010, página web, <http://www.cuencacoatza.org/tucuenca.php>.
19. Couillard, C., y Hodson, P., (1996). "Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent?" *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 15, (10), pp. 1844-1854.
20. DelValls, T., y Conradi, M., (2000). "Avances en ecotoxicología marina: comparación entre tests de laboratorio y estudios in situ para la evaluación de la calidad ambiental de los sedimentos", *Ciencias marinas*, Vol. 26 (1), pp. 39-64.
21. Devlin, E., (2006). "Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos", *Ecotoxicology*, Vol. 15, pp. 97-110.

22. DiFiore, M., (1951). "Atlas de histología normal: con 99 láminas originales en colores que reproducen 156 campos microscópicos combinados", *El Ateneo*, 2ª. Edición, Buenos Aires, pp. 72.
23. Duellman, W., y Trueb, L., (1986). "Biology of amphibians", *The Johns Hopkins University press*, pp. 198-199.
24. Eggen, R., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B., y Schweigert, N., (2004). "Challenges in ecotoxicology", *Environmental science and technology*, pp. 58A-64A.
25. EHC (Environmental health criteria) 155, (1993). "Biomarkers and risk assessment: concepts and principles", IPCS (International programme on chemical safety), WHO (World health organization), pp. 11-16.
26. EPA, (Environmental Protection Agency (Agencia de protección al medio ambiente de los Estados Unidos de América), "(POPs) Persistent organic pollutants: a global issue a global response", Consultado mayo 18, 2010, página web: <http://www.epa.gov/oia/toxics/pop.htm>.
27. EPA, Environmental Protection Agency (Agencia de protección al medio ambiente de los Estados Unidos de América), "Ecological toxicity information: Toxicity profiles". Consultado Abril 29, 2010, página web: <http://www.epa.gov/reg5sfun/sfd/ecology/html/toxprofiles.htm>.
28. Evenden, A., y Depledge, M., (1997). "Genetic susceptibility in ecosystems: the challenge for ecotoxicology", *Environmental health perspectives*, Vol. 105 (4), pp. 849-854.
29. Facey, D., Blazer, V., Gasper, M., y Turcotte, C., (2005). "Using fish biomarkers to monitor improvements in environmental quality" *Journal of aquatic animal health*, Vol. 17, pp. 263 – 266.
30. Forbes, V., (1998). "Sources and implications of variability in sensitivity to chemicals for ecotoxicological risk assessment", *Archives of toxicology supplement*, Vol. 20, pp. 407-418.
31. Forbes, V., Palmqvist, A., y Bach, L., (2006). "The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology" *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 25 (1), pp. 272-280.
32. Fournie, J., Summers, J., Courtney, L., Engle, V., y Blazer, V., (2001). "Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments", *Journal of aquatic animal health*, Vol. 13(2), pp. 105-116.
33. Galloway, T., y Depledge, M., (2001). "Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance", *Ecotoxicology*, vol. 10, pp. 5- 23.
34. Geneser, F., (2007). "Histología", *Editorial panamericana*, 3ª. Edición, 7ª. Reimpresión, pp. 434-441.
35. Gil, F., Pla, A., (2001). "Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure", *Journal of applied toxicology*, Vol. 21, pp. 245-255.
36. Gozada, L., y Páez, M., (1986). "La fauna acuática del río Coatzacoalcos", Serie medio ambiente en Coatzacoalcos, Centro de ecodesarrollo, Universidad Veracruzana, pp. 25.
37. Greenfield, B., Teh, S., Ross, J., Hunt, J., Zhang, G., Davis, J., Ichikawa, G., Crane, D., Hung, S., Deng, D., The, F., y Green, P., (2008). "Contaminant concentrations and histopathological effects

- in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*)", *Archives of environmental contamination and toxicology*, Vol. 55, pp. 270-281.
38. Handy, R., y Depledge, M., (1999). "Physiological responses: their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology", *Ecotoxicology*, Vol. 8, pp. 329-349.
  39. Handy, R., Galloway, T., y Depledge, M., (2003). "A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology", *Ecotoxicology*, Vol. 12, pp. 331-343.
  40. Handy, R., Runnalls, T., y Russell, P., (2002). "Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the freshwater fisheries directive", *Ecotoxicology*, Vol. 11, pp. 467-479.
  41. Hayes, T., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V., Marjuoa, Y., Parker, J., y Tsui, M., (2006). "Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?" *Environmental health perspectives*, Vol. 114 (1), pp. 40-50.
  42. Hinck, J., Blazer, V., Denslow, N., Myers, M., Gross, T., y Tillitt, D., (2007). "Biomarkers of contaminant exposure in Northern Pike (*Esox lucius*) from the Yukon River Basin, Alaska", *Archives of environmental contamination and toxicology*, Vol. 52, pp. 549-562.
  43. Hur, J., Woo, S., Jo, J., y Park, I., (2006). "Effects of starvation on kidney melano – macrophage centre in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel)", *Aquaculture research*, Vol. 37, pp. 821-825.
  44. IARC (International Agency for Research on Cancer, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer), "IARC monographs, Polycyclic aromatic hydrocarbons", Vol. 92, consultado Mayo 18, 2010, pp.754-773.
  45. INE, Instituto Nacional de Ecología, "Fuentes de contaminación en México". Consultado Abril 28, 2010, página web <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>.
  46. INE, Instituto Nacional de Ecología. (2007). Informe técnico: "Diseño y aplicación de una metodología para la evaluación integrada de riesgos ambientales en sitios contaminados de México: caso de estudio Coatzacoalcos, Veracruz", Mejía Saavedra, J., y Díaz-Barriga, F., UASLP, INE, CETMAR, UNIVERSIDAD VERACRUZANA, pp. 21-24.
  47. INE, Instituto Nacional de Ecología. "Publicaciones Prólogo". Consultado Mayo 14, 2010, página web: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/131/prologo.html>.
  48. Informe Gobierno Municipal: Coatzacoalcos, información general, 2005-2007.
  49. IPEN, International POPs Elimination Network, Red de Acción sobre plaguicidas y alternativas en México (RAPAM), "Contamination of chicken eggs near the Pajaritos Petrochemical Complex in Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico by dioxins, PCB's and hexachlorobenzene".
  50. James, S., y Little, E., (2003). "The effects of chronic cadmium exposure on American toad (*Bufo americanus*) tadpoles", *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 22 (2), pp. 377-380.

51. Jordanova, M., Rebok, R., Miteva, N., y Rocha, E., (2006). "Evaluating pigmented macrophages as biomarkers for fish health and environmental pollution: evidence of natural seasonal fluctuations in Ohrid trout (*Salmo letnica* Kar.) [http://balwois.mpl.ird.fr/balwois/administration/full\\_paper/ffp-498.pdf](http://balwois.mpl.ird.fr/balwois/administration/full_paper/ffp-498.pdf) Junio 17, 2010.
52. Kalashnikova, M., (2000). "Ultrastructure of fish and amphibian liver during catabolism of degenerating erythrocytes", Bulletin of experimental biology and medicine, *Morphology and pathomorphology*, No. 1, pp. 101-104.
53. Katsumiti, A., Valdez, F., Azevedo, M., da Silva, M., Damian, R., Almeida, M., Silva de Assis, H., Cestari, M., Randi, M., Oliveira Ribeiro, C., y Freire, C., (2009). "An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbor estuarine area in Southern Brazil", *Environmental monitoring and assessment*, Vol. 152, pp. 209-222.
54. Kranz, H., (1989). "Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease", *Diseases of aquatic organisms*, Vol. 6, pp. 167-173.
55. Kranz, H., y Peters, N., (1984). "Melano – macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernua*) from the Elbe Estuary", *Helgoländer Meeresuntersuch*, Vol. 37, pp. 415-424.
56. Kurtovic, B., Teskeredzic, E., y Teskeredzic, Z., (2008). "Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)", *Acta adriatica*, Vol. 49(2), pp. 147-154.
57. Lang, T., y Secic, M., (1997). "How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers", *ACP series Medical writing and communication*, pp. 50, 52, 65-77, 93-100, 122-136.
58. LeBlanc, G., y Bain, L., (1997). "Chronic toxicity of environmental contaminants: sentinels and biomarkers", *Environmental health perspectives supplements*, Vol. 105 (S1).
59. Lillie, R., y Fullmer, H., (1976). "Histopathologic technic and practical histochemistry", *McGraw Hill*, pp. 31.
60. Linzey, D., Burroughs, J., Hudson, L., Marini, M., Robertson, J., Bacon, J., Nagarkatti, M., y Nagarkatti, P., (2003). "Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda", *International journal of environmental health research*, Vol. 13, pp. 125-148.
61. LiquidGhoul, (2006). *Bufo marinus* distribution (mapa). Página web [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bufo\\_marinus\\_distribution.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bufo_marinus_distribution.png).
62. Loumbourdis, N., (2007). "Liver histopathologic alterations in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece", *Archives of environmental contamination and toxicology*, Vol. 53, pp. 418-425.

63. McCoy, K., Bortnick, L., Campbell, C., Hamlin, H., Guillette, J., St. Mary, C., (2008). "Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*", *Environmental health perspectives*, Vol. 116 (11), pp. 1526-1532.
64. Meinelt, T., Krüger, R., Pietrock, M., Osten, R., y Steinberg, C., (1997). "Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues" *Environmental science and pollution research*, Vol.4 (1), pp. 32-36.
65. Montero, D., Blazer, V., Socorro, J., Izquierdo, M., y Tort, L., (1999). "Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles" *Aquaculture*, Vol. 179, pp. 523-534.
66. Nebel, B., y Wright, R., (2000). "Environmental science, the way the world works" *Prentice Hall*, 7th edition, pp. 389.
67. PEMEX, Petróleos Mexicanos, "Complejos petroquímicos: Cangrejera y Pajaritos". Consultado Marzo 19, 2010, página web <http://www.pemex.com/index.cfm?action=content&sectionid=73&catid=11961&contentid=18254>.
68. Pestizid Aktions Netzwerk, (2007). "Why risk assessment is necessary for substance mixtures", Position paper of PAN Germany on the combination effects of pesticides.
69. Poleksic, V., Lenhardt, M., Jaric, I., Djordjevic, D., Gacic, Z., Cvijanovic, G., y Raskovic, B., (2010). "Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube starlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758)", *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 29 (3), pp. 515-521.
70. Ravaglia, M., y Maggese, M., (1995). "Melano – macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (*Pises*, *Synbranchidae*): histological and histochemical characterization", *Journal of fish diseases*, Vol. 18, pp. 117-125.
71. Romero-Díaz, Víktor, (2008). "Cuaderno de prácticas, curso de histotecnología", Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL, pp. 48, 100.
72. Ross, Kaye, Pawlina, (2002). "Histología texto atlas color con biología celular y molecular", *Editorial Panamericana*, 4ª. Edición, pp. 3.
73. Rosseland, B., Rognerud, S., Collen, P., Grimalt, J., Vives, I., Massabuau, J., Lackner, R., Hofer, F., Raddum, G., Fjellheim, A., Harriman, R., Piña, B., (2007). "Brown trout in Lochnagar: population and contamination by metals and organic micropollutants", Lochnagar: the natural history of mountain lake", *Developments in paleoenvironmental research*, pp. 253-285.
74. Rowe, C., Hopkins, W., y Bridges, C., (2003). "Diversity and distribution of amphibians in relation to susceptibility to natural and anthropogenic factors". Amphibian decline: an integrated analysis of multiple stressor effects, pp. 9-57. Linder, G., Krest, S., y Sparling, D., *SETAC Press*.
75. Ruelas-Inzunza, J., Gárate-Viera, Y., y Páez-Osuna, F., (2007). "Lead in clams and fish of dietary importance from Coatzacoalcos estuary (Gulf of Mexico), and industrialized tropical region", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, Vol. 79, pp. 508-513.

76. Sandoval, M., Pérez-Coll, C., y Herkovits, J., (2004). "Teratogénesis y alteración del desarrollo de embriones de *Bufo arenarum* por exposición a plomo", Comunicaciones científicas y tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
77. Schwindt, A., Fournie, J., Landers, D., Schereck, C., y Kent, M., (2008). "Mercury concentrations in salmonids from western U.S. National Parks and relationships with age and macrophage aggregates", *Environmental science and technology*, Vol. 42 (4), pp. 1365-1370.
78. SEMARNAT, (2009). "Informe de la situación del medio ambiente en México, compendio de estadísticas ambientales" Edición 2008, pp. 338-357. [http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_2008/pdf/cap\\_7\\_residuos.pdf](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/pdf/cap_7_residuos.pdf).
79. Shenoy, K., Cunningham, T., Renfroe, J., y Crowley, P., (2009). "Growth and survival of northern leopard frog (*Rana pipens*) tadpoles exposed to two common pesticides", *Environmental toxicology and chemistry*, Vol. 28 (7), pp. 1469-1474.
80. Sindermann, C., (2006). "Coastal pollution: effects on living resources and humans", *CRC Taylor and Francis*, pp.178.
81. Spazier, E., Storch, V., y Braunbeck, T., (1992). "Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine River", *Diseases of aquatic organisms*, Vol. 14, pp. 1-22.
82. Stehr, C., Myers, M., Douglas, B., Krahn, M., Meador, J., McCain, B., y Varanasi, U., (1997). "Chemical contamination and associated liver diseases in two species of fish from San Francisco Bay and Bodega Bay" *Ecotoxicology*, Vol. 6, pp. 35-65.
83. Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs), "The 9 new POPs under Stockholm convention", consultado Mayo 18, 2010, página web: <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/The9newPOPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>.
84. Stringer, R., Labunska, I., y Brigden, K., (2001). Nota Técnica: 05/2000. "Organochlorine and heavy metal contaminants in the environment around the Complejo Petroquímico Pajaritos, Coatzacoalcos, Mexico", Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter, UK.
85. Suresh, N., (2009). "Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*", *Journal of environmental biology*, Vol. 30 (4), pp. 505-508.
86. Texto basado en el video: *Río Coatzacoalcos*, ILCE-Online Communications, México, 2000 (serie *Ríos de México*).
87. Thompson, S., y Luna, L., (1978). "An atlas of artifacts", Springfield, Ill; *Charles C. Thomas*, pp. 58-60.
88. Thornton, J., (2000). "Beyond the risk: an ecological paradigm to prevent global chemical pollution", *International journal of occupational and environmental health*, Vol. 6 (3), pp. 318-330.
89. Tizard, Ian., (2009). "Inmunología veterinaria", La evolución del sistema inmune, *Elsevier*, 8ª. Edición, pp.499.

90. Tortora, G., y Grabowski, S., (2002). "Principios de anatomía y fisiología", *Oxford University Press*, 9ª. Edición, pp. 751-753.
91. UCC, Universidad Católica de Chile, "Alteraciones de los pigmentos", Manual de patología general, Capítulo 2, patología celular, consultado Junio 25, 2010, página web: [http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol\\_026.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_026.html).
92. UDA, Universidad de Antioquia, "Aprende en línea: Trastornos del metabolismo mineral y de los pigmentos", consultado: Junio 29, 2010, página web: [http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/410/Modulo\\_3/Trastornos\\_de\\_minerales\\_y\\_pigmentos.doc](http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/410/Modulo_3/Trastornos_de_minerales_y_pigmentos.doc).
93. UNEP (United Nations Environment Programme, Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente), "Persistent organic pollutants", consultado Mayo 18, 2010, página web: <http://www.chem.unep.ch/pops/>.
94. Urán, M., y Cano, L., (2008). "Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir respuesta inmune del hospedero", *Asociación colombiana de infectología*, Vol. 2 (2), pp. 357-377.
95. USGS, (United States Geological Survey, Servicio Geológico de los Estados Unidos), Bioaccumulation. Consultado Abril 29, 2010, página web <http://toxics.usgs.gov/definitions/bioaccumulation.html>.
96. USGS, (United States Geological Survey, Servicio Geológico de los Estados Unidos), Biomagnification. Consultado Abril 29, 2010, página web <http://toxics.usgs.gov/definitions/biomagnification.html>.
97. van den Heuvel, M., O'Halloran, K., Ellis, R., Ling, N., y Harris, M., (2005). "Measures of resting immune function and related physiology in juvenile rainbow trout exposed to a pulp mill effluent" *Archives of environmental contamination and toxicology*, Vol. 48, pp. 520-529.
98. Walker, C., (2009). "Organic pollutants, an ecotoxicological perspective", *CRC Press*, 2a. edición, pp. 14.
99. Wolke, R., Murchelano, R., Dickstein, C., y George, C., (1985). "Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, Vol. 35, pp. 222-227.
100. Zug, G., y Zug, P., (1979). "The marine toad, *Bufo marinus*: a natural history resumé of native populations", *Smithsonian contributions to zoology*, pp. 284.