

00366



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**Determinación de la actividad Citotóxica, Mutagénica y Genotóxica
de compuestos orgánicos presentes en agua y sedimento
de la laguna Pom-Atasta, Campeche.**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias
(Biología Marina)**

P r e s e n t a

Angélica Graciela Martínez Hernández

Director de Tesis: **Dra. Sara Fries Vázquez**

Comité Tutorial: **Dr. J. Miguel Betancourt R.
Dra. Ma. Esther de la Rosa D.**

México D.F., 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

INDICE

| | Página |
|-------------------------------------|--------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | |
| Contaminación en agua y sedimento | 3 |
| Contaminación en especies acuáticas | 5 |
| Ensayos de genotoxicidad | 7 |
| Antecedentes | 10 |
| Objetivo | 14 |
| Hipótesis | 14 |
| Material y Métodos | |
| Área de estudio | 15 |
| Muestras de agua y sedimento | 17 |
| Ensayo de mutagenicidad | 18 |
| Ensayo de citotoxicidad | 19 |
| Ensayo de genotoxicidad | 20 |
| Resultados | 25 |
| Discusión y Conclusiones | 39 |
| Bibliografía | 47 |

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcionado.

NOMBRE: Angelica G. Martinez
Lernandez

FECHA: 27-Junio-2003

FIRMA: [Firma]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

A todas aquellas personas que con su confianza y comprensión ayudaron en mi formación personal y académica.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

©

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Citogenética Humana del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría en colaboración con el laboratorio de Físicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y del Lab. Central de Calidad del agua de la D. G.C.O.H.D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En el sistema Pom-Atasta en Campeche, se ha detectado una disminución considerable de la población de bivalvos locales, sin que se conozca la causa precisa. Dentro de las posibles explicaciones se ha propuesto la existencia de contaminantes genotóxicos en el sistema lagunar debido a la presencia de un gaseoducto. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad citotóxica, mutagénica y genotóxica de 15 muestras de agua y sedimento de diferentes zonas de la laguna Pom-Atasta, por medio de las técnicas de tinción dual, AMES (Salmonella microsome assay) y electroforesis unicelular alcalina (EU) y asociarlos con la posible presencia de hidrocarburos y/o plaguicidas. Para conocer el efecto citotóxico y genotóxico se utilizaron como sistema de prueba a linfocitos humanos normales, que fueron expuestos durante 6 hs a diferentes diluciones de las muestras de agua y sedimento, y se determinó: a) la viabilidad celular por medio de la técnica de tinción dual de bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína; b) el efecto mutagénico por medio del ensayo de AMES y c) daño al ADN a través de EU. Se incluyeron 3 testigos negativos: linfocitos sin tratamiento, linfocitos tratados con agua destilada (agua sin contaminación) y linfocitos con DMSO (vehículo en el cual están disueltas las muestras de agua y sedimento) y un testigo positivo: linfocitos tratados con luz UVC. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los análisis fueron hechos a ciegas.

Para el análisis estadístico se utilizó una prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov y una t-student para muestras independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto a los resultados de citotoxicidad se encontró una relación dosis-dependiente en todas las muestras, es decir, a mayor dilución mayor número de células vivas; lo que indica, que en el sistema existen compuestos que inducen un daño citotóxico en linfocitos humanos. En cuanto a los análisis de genotoxicidad, con la prueba de AMES se encontró que 1 de las 15 muestras estudiadas fue mutagénica, por lo que concluimos que en general en la laguna no existe mutagenicidad a excepción de la zona donde se recolectó la muestra A3 que se encuentra cerca del poblado de Atasta en donde sí observamos agentes que están causando mutaciones del tipo de corrimiento del marco de lectura. Mediante la prueba de EU se observó un aumento significativo en el número de células con daño en 10 de las 15 muestras de agua y sedimento ($p < 0.05$) en comparación con los testigos negativos, esto indica que existen compuestos en la laguna que causan daño al ADN. Esta actividad genotóxica no está relacionada con la presencia de hidrocarburos y plaguicidas del tipo aldrín y dieldrín ya que el análisis químico de las muestras no reveló la presencia de estos compuestos.

Por lo anterior se concluye que en el sistema Pom-Atasta existen contaminantes genotóxicos que pueden estar causando efectos letales o subletales en las especies acuáticas. Con este estudio no podemos determinar el agente inductor del daño al ADN, sin embargo el encontrar actividad citotóxica y genotóxica, obliga a estudiar otras posibles causas como son: las actividades antropogénicas o causas naturales que contribuyan al aumento de contaminantes en la laguna. Consideramos importante realizar estudios *in vivo* e *in vitro* en las especies acuáticas, ya que a pesar de que los sistemas de prueba utilizados en este trabajo son ampliamente reconocidos por su potencial para detectar compuestos mutagénicos y genotóxicos *in vitro*, éstos sólo nos indican si existe o no actividad mutagénica y genotóxica, pero no es posible extrapolar el daño observado a lo que ocurre en los organismos acuáticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Contaminación en agua y sedimento:

La introducción de sustancias ajenas en el ambiente y en los organismos, puede reducir la calidad del agua, suelo y aire y alterar las actividades de pesca y/o agricultura. Estas sustancias ajenas a los sistemas son llamadas xenobióticas o contaminantes.

Los contaminantes pueden provenir de fuentes naturales o artificiales; las fuentes naturales tienen un origen biológico, como ejemplos están las aflatoxinas, la materia orgánica, los ácidos húmicos y fúlvicos, que por efecto de los procesos de descomposición se convierten en compuestos mutagénicos y/o carcinogénicos. Las fuentes artificiales son compuestos químicos provenientes de diversas actividades humanas, por ejemplo: la industria ganadera, agrícola, de petróleo, etc. (Nava,1994).

Diversos estudios han demostrado que la contaminación de aguas y sedimentos por metales es muy frecuente. Meyer y Gersberg en 1997, evaluaron el aumento en la concentración de metales en muestras de sedimento de un estuario al sur de San Diego, CA y encontraron un aumento en las concentraciones de cadmio, cobre, níquel, plomo y zinc en comparación a un estudio similar realizado en 1987, incremento que se correlacionó directamente con el aumento de las industrias maquiladoras, en la zona (Meyer y Gersberg, 1997). Otro estudio realizado en el río Ebro (España) demostró contaminación por plomo ($1.67 \pm 1.54 \mu\text{g/L}$), cadmio ($0.50 \pm 0.48 \mu\text{g/L}$), cobre ($2.46 \pm 1.56 \mu\text{g/L}$) y zinc ($71.52 \pm 73.87 \mu\text{g/L}$) en las muestras de agua, mientras que en los sedimentos, se observó que algunas zonas presentaron elevadas cantidades de mercurio, plomo, cadmio y zinc debido a las actividades industriales, sin embargo la concentración de metales en los sedimentos del río Ebro son más bajas que las encontradas en áreas industrializadas de USA, Bélgica y Honduras y presentan valores muy similares a los reportados en zonas industriales de México, Turquía y España (Ramos y cols.1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los plaguicidas juegan un papel muy importante en la contaminación de las aguas, ya que la dispersión aérea y la lluvia acarrearán estos compuestos a las lagunas, los ríos y los mares. Plaguicidas tales como la atrazina y la dietilatrizona son los más utilizados en los cultivos agrícolas y se ha observado la presencia de estos compuestos a 300 km de la fuente de origen, lo que demuestra que el viento puede transportar estos compuestos a grandes distancias (Dinelli y cols.1996). En 1999 Medina y cols. realizaron un estudio con el fin de evaluar la persistencia de plaguicidas organofosforados (OP) en muestras de agua del río Limón, Venezuela. Ellos encontraron que la persistencia de estos compuestos en las muestras de agua está en función de la luz solar, de su adsorción a partículas y a su capacidad de la volatilización; se observó una vida media menor de los plaguicidas en las muestras de agua abiertas y expuestas a la luz solar en comparación con las muestras filtradas y guardadas cerradas en un recipiente de color ámbar (Medina y cols. 1999).

No sólo los metales y los plaguicidas son contaminantes de los ambientes acuáticos, también se ha encontrado contaminación por compuestos tales como: los bifenilos policlorinados (PCBs) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs). Los primeros estudios al respecto fueron realizados por Heuper y Ruchoft en 1954, quienes demostraron que la contaminación en diferentes canales de agua era ocasionada por descargas de las refinerías de petróleo aledañas a la zona. A partir de estos estudios diversos autores han encontrado que estos contaminantes son frecuentes en el ambiente acuático. Por ejemplo, en un estudio realizado en sedimentos del río Yangtse se detectó la presencia de compuestos orgánicos policlorinados (PCOCs), sin embargo estos niveles de contaminación son muy bajos en comparación con los encontrados en otros ríos europeos. Con respecto a los PHAs existe una correlación en el incremento de la concentración con la presencia de actividad antropogénica, ya que en los lugares donde hay poca urbanización e industrialización las concentraciones de PHAs fueron muy bajas (Dong y cols. 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Contaminación en especies acuáticas:

La contaminación puede tener efectos adversos en las especies acuáticas, actualmente esta bien establecido que muchos afluentes provenientes de las industrias transportan compuestos que pueden provocar una gran variedad de efectos adversos sobre la biota acuática. Cuando estos compuestos son desechados directamente a los cuerpos de agua, representan una amenaza para la salud pública, debido a la posibilidad de contaminación de los mantos freáticos y/o embalses superficiales utilizados en el abastecimiento de agua potable y al efecto sobre las especies acuáticas comestibles.

Las descargas industriales y urbanas son responsables de elevadas concentraciones de sustancias tóxicas en el ambiente acuático, lo cual puede generar daño al material genético. Los efectos genotóxicos de los contaminantes y sus consecuencias en los organismos expuestos son poco entendidos y se ha encontrado que la contaminación de los sedimentos y las elevadas concentraciones de hidrocarburos, se asocian con la prevalencia de tumores en peces. Las investigaciones de los efectos genotóxicos de diferentes contaminantes han ayudado a determinar su efecto carcinogénico, ya que la actividad genotóxica y/o mutagénica de los contaminantes conlleva a un riesgo de enfermedades genéticas, que si se originan en células somáticas, pueden generar cánceres y si se originan en células germinales, pueden dar lugar a descendencia anormal. (Patrick, 1973; Rodríguez-Ariza y cols. 1992).

Los efectos causados por estos agentes ya se han estudiado en diversas especies acuáticas, por ejemplo: en los cangrejos se ha observado una respuesta de tolerancia a los plaguicidas organofosforados (OP), ya que cuando habitan en áreas no contaminadas son más sensibles a los OP que aquellos que están constantemente expuestos, sin embargo es necesario investigar la naturaleza y el mecanismo de tolerancia (Olima y cols.1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Otro ejemplo está dado por los bivalvos, los cuales han sido muy utilizados en programas de monitoreo de contaminación acuática debido a su capacidad de concentrar los contaminantes del agua; los niveles de contaminación encontrados en sus tejidos se utilizan como indicador de contaminación química en el ambiente. En un estudio realizado en el golfo de Arabia se utilizó como modelo animal al bivalvo *Pinctada radiata* y se cuantificó la presencia de metales en la zona. Los resultados demostraron una acumulación de plomo, cadmio, vanadio y níquel en sus tejidos; en algunas zonas se observó una mayor acumulación de cadmio y se demostró que este aumento fue ocasionado por las actividades de navegación del canal del puerto (Al-Madfa y cols.1998).

A pesar de todos estos estudios, es difícil correlacionar el daño que causan los contaminantes ambientales sobre las variaciones poblacionales de las especies acuáticas, ya que generalmente la contaminación no es causada por un solo agente y además las variaciones en la dieta y las condiciones ambientales pueden influir en los resultados. Desde hace algunos años se ha detectado que la exposición a contaminantes carcinogénicos y/o mutagénicos puede inducir la pérdida de la integridad del ADN, por lo tanto es necesario utilizar metodologías que nos permitan evaluar el daño que ocasionan estos contaminantes en el ADN de los organismos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ensayos de genotoxicidad:

En virtud de lo anterior, las pruebas para detectar mutágenos y/o carcinógenos se consideran una alternativa en el monitoreo de agentes contaminantes ambientales, ya que proporcionan información del daño ocasionado al material genético. Los ensayos más importantes para determinar mutagenicidad son dos: *Salmonella* microsome assay (AMES) y SOS chromotest; ambas son pruebas rápidas, sencillas y de bajo costo, utilizadas en muchos laboratorios para evaluar el efecto del contaminante.

El ensayo de AMES utiliza dos cepas mutantes de la bacteria *Salmonella typhimurium* (TA100 y TA98) que han sufrido alteración genética y no son capaces de producir histidina, por lo que no pueden crecer en un medio mínimo mineral a menos que se adicione una cantidad suficiente de histidina o que mediante una reversión recuperen la capacidad de sintetizar este aminoácido (Van der Hoeven y cols.1990). Estas dos cepas indican dos tipos de mutación; la TA100 indica una mutación del tipo de sustitución de bases en el par G-C y la TA98 de desplazamiento o corrimiento del marco de lectura por pérdida o adición de algunos nucleótidos. La prueba consiste en adicionar sustancias genotóxicas al medio de cultivo, de tal manera que solo aquellas bacterias que sufrieron una mutación por el efecto del compuesto podrán crecer en el medio formando colonias visibles. El medio utilizado contiene trazas de histidina y en una primera etapa, la población se incrementa hasta agotar toda la histidina presente; en la segunda etapa, solo aquellas bacterias que pudieron mutar por efecto del compuesto forman colonias visibles. Las cepas utilizadas en esta prueba, tienen un porcentaje "normal y constante" de reversión espontánea; si el número de colonias revertantes inducidas se incrementa dos o más veces con respecto al número de colonias con reversión espontánea, nos estará indicando que una sustancia posee actividad mutagénica. En la prueba se incluye un homogenado de hígado de roedores (S9) con el fin de simular el metabolismo de cualquier sustancia como ocurre con el sistema del citocromo P450; bajo estas condiciones el sistema puede identificar contaminantes cuyos mecanismos de acción son directos, es decir, que no requieren activación metabólica (sin S9) o indirectos, los cuales requieren activación metabólica (con S9) (Maron y Ames, 1983).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la prueba de SOS se utiliza la bacteria *Escherichia coli* (PQ37), con una lesión extensa en el ADN que provoca la inducción de la expresión de genes implicados en la reparación del ADN y en la mutagénesis. Las bases moleculares de esta prueba son: que el represor LexA inhibe la transcripción de todos los genes SOS y por lo tanto la inducción de estos genes requiere la eliminación de LexA. La proteína RecA proporciona la conexión funcional entre la señal biológica (lesión al ADN) y la inducción de los genes SOS; una gran lesión produce numerosas zonas de ADN monohebra y RecA facilita la separación del represor LexA sólo cuando RecA está unido al ADN monohebra, induciendo la respuesta SOS (Nelson y Cox, 2000).

Existen otros ensayos que reflejan cambios dañinos a nivel celular o subcelular, causados por una exposición de los organismos al agente, específicamente reflejan modificaciones al ADN, tales como aductos y rupturas en las hebras del ADN. Los aductos son poco frecuentes y difíciles de detectar, mientras que las rupturas en las hebras del ADN, generadas por una gran variedad de agentes, son más comunes y se consideran muy buenos marcadores genéticos de exposición. Diversos autores, han empleado estas técnicas para detectar alteraciones en varias especies acuáticas, Nacci y Nelson realizaron un estudio para detectar la relación entre los contaminantes ambientales y el incremento de rupturas al ADN en tejidos de bivalvos marinos, estos autores encontraron que los bifenilos policlorinados, los metales y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, producen un aumento significativo de las rupturas en el ADN y demostraron que la desnaturalización del ADN con solución alcalina puede ser usada para evaluar el daño causado por agentes ambientales (Nacci y Nelson, 1992).

En 1984 Ostling y Johanson introdujeron la técnica de electroforesis unicelular con pH neutro para detectar rupturas de doble cadena del ADN. Esta técnica permite identificar el daño inducido por diversas sustancias en células individuales. Posteriormente Singh y cols en 1988 modificaron la técnica para realizarla en condiciones alcalinas, con lo que lograron detectar además rupturas en cadena sencilla del ADN y sitios lábiles a álcali (Singh y cols. 1988).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La EU consiste en embeber a las células en un minigel de agarosa, el cual es colocado en una solución de lisis (detergentes y pH alcalino), con el fin de liberar a los núcleos, desnaturalizar y desenrollar el ADN. Posteriormente estos minigeles son colocados en un campo electroforético en el cual se produce una migración del ADN fragmentado o con daño hacia el ánodo. Cuando las laminillas son observadas al microscopio de fluorescencia, la imagen que se obtiene como resultado, es semejante a la de un cometa en el que el centro es el ADN no dañado y la cola es el ADN fragmentado, la longitud e intensidad de fluorescencia de la cola del cometa están directamente relacionados con el número de rupturas en la cadena del ADN inducidas por el agente probado (Vijayalaxmi y cols. 1992), a excepción de los agentes inductores de enlaces cruzados.

Esta técnica también ha sido utilizada para evaluar el daño al ADN causado por peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y N-nitrosodimethylamina (NDMA) en moluscos; los resultados han demostrado un aumento en los niveles de daño al ADN después de la exposición a H_2O_2 y se evidenció que a mayor dosis de NDMA mayor daño al ADN (Wilson y cols. 1998).

En 1997, Clements y cols. utilizaron la EU alcalina para observar el daño genotóxico *in vitro* en eritrocitos de renacuajo causado por dos herbicidas; encontraron que el AAtrex 9-0 produjo un aumento significativo de daño al ADN con respecto al testigo y además observaron un efecto dosis dependiente en el número de células dañadas. El Dual-960E, compuesto utilizado en aproximadamente el 31% de los cultivos de frutas y vegetales inhibe la germinación y la síntesis de proteínas, se tiene evidencia que es carcinogénico en animales y también se ha demostrado que causa daño en los eritrocitos de los renacuajos; estos resultados indican que los herbicidas frecuentemente utilizados en los cultivos agrícolas, pueden dañar al ADN. (Clements y cols, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por sus grandes ventajas, diversos autores han utilizado la EU con el fin de detectar daño genotóxico, en especial en lo que se refiere a la detección de contaminantes acuáticos. Pandrangi y cols. utilizaron la EU, para evaluar el daño al ADN causado en peces por PHA y por bifenilos policlorinados (PCB). Los resultados indican que la EU es extremadamente sensible y puede ser utilizada para detectar daño al ADN causado por contaminantes ambientales presentes en medios acuáticos (Pandrangi y cols. 1995).

ANTECEDENTES

En México se ha observado que la contaminación de las lagunas del golfo de México, se debe principalmente a actividades humanas, como la explotación petroquímica, el refinamiento de azúcar, el procesamiento de alimentos, la descarga de desechos humanos y la utilización de plaguicidas en los cultivos agrícolas cercanos a las lagunas. Rosales y Álvarez en 1979, realizaron un estudio en el que se determinó la concentración de insecticidas organoclorados y bifenilos policlorados (BPC) de las lagunas del golfo de México y encontraron una gran cantidad de BPC en muestras de tejido de ostión en las zonas con influencia antropogénica. Entre los plaguicidas, el DDT y el dieldrín estuvieron presentes en todas las muestras asociadas a zonas con actividades agrícolas (Rosales y Álvarez, 1979).

Las grandes cantidades de sustancias peligrosas, para los organismos, vertidas al ambiente acuático pueden depositarse en el sedimento o permanecer en la columna de agua, donde pueden estar inertes y posteriormente ser activadas tomando una forma química biodisponible (Guerrero, 1996). Botello y cols. evaluaron el impacto que tuvo el derrame del pozo Iztoc-1 en la sonda de Campeche y encontraron un aumento considerable de hidrocarburos totales en el sedimento del área lagunar atribuido al aporte de material orgánico y/o detritus de plantas terrestres y no al derrame del pozo, ya que las mayores concentraciones de hidrocarburos fueron localizadas en las desembocaduras de los ríos y en el área de manglar (Botello y Villanueva, 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En otro estudio se evaluó la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) en sedimentos de diferentes lagunas del golfo de México. Los resultados demostraron que en la laguna de Pueblo Viejo, la mayor concentración de PAH's se presentó cerca del río Pánuco en la zona industrial de Tampico. En la laguna de Tamiahua, Ver. se observó que la acumulación de compuestos orgánicos fue mayor donde hay grandes cantidades de sedimentos de arena y arcilla, lo que demuestra la adsorción de estos compuestos dependiendo del tamaño y la carga eléctrica de las partículas de sedimento. En la laguna de Tampamachoco, Ver. se reportaron niveles elevados de PAH's en una estación cercana a una termoelectrónica (Botello y Calva, 1998).

En los últimos años en el estado de Tabasco, se ha observado un aumento considerable de la industria petrolera y se ha asociado con una disminución en la población de ostras (*Crassostrea virginica*). Con el fin de determinar si la contaminación de la industria petrolera influye directamente sobre la población de la especie, Gold-Bouch y cols. evaluaron la concentración de hidrocarburos y metales traza en los tejidos de estos bivalvos, estos autores no encontraron evidencias de que los hidrocarburos estén afectando la población de ostras. Con respecto a los metales, observaron que el cadmio puede estar relacionado con lesiones histopatológicas en los tejidos de estos organismos. (Gold-Boucht y cols. 1997).

Debido a la contaminación por metales que existe en las costas del golfo de México, se han realizado diversos estudios con el fin de determinar el efecto de estos contaminantes en los organismos y observar los posibles cambios a través del tiempo. Vázquez y cols. en 1993, determinaron la concentración de metales traza en *Crassostrea virginica* de la Laguna de Términos, Cam. y encontraron una gran acumulación de hierro, zinc y cobre, los resultados fueron comparados con estudios realizados en 1970 y se observó que las concentraciones de zinc permanecen constantes a través del tiempo, el cadmio presentó una disminución y las concentraciones de plomo se incrementaron considerablemente (Vázquez y cols. 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dos años más tarde, se determinaron las concentraciones de metales en la columna de agua de la laguna de Términos, Cam. y encontraron que las concentraciones de cobre, hierro y manganeso están por arriba de los límites permisibles por SEDUE (Vázquez y cols. 1995). Otros estudios realizados en el ostión *Crassostrea virginica* han demostrado que la contaminación por metales en las zonas costeras está aumentando; las concentraciones de mercurio, plomo y cadmio presente en los tejidos de este organismo se encuentran por arriba del límite establecido para el consumo humano (Villanueva y Botello, 1988).

La laguna de Términos, una de las lagunas costeras más grandes en extensión del país, ha sido ampliamente estudiada; sin embargo se conoce muy poco de los cuatro sistemas asociados a ella; estos sistemas son: Pom-Atasta, Palizada Del-Este, Chumpam-Balchacah y Candelaria-Panlau; los cuales son parte integral de la planicie costera de Campeche y se caracterizan por mantener un equilibrio dinámico entre procesos de marea y descarga fluvial. Estos sistemas aledaños a la laguna de Términos presentan características ambientales que favorecen la formación de hábitat para la crianza, protección, alimentación y reproducción de moluscos, crustáceos y peces (Ayala-Pérez y cols. 1993; Benítez y Barcenat, 1996).

En especial el sistema Pom-Atasta tiene gran importancia ocupacional y económica, ya que la pesca de camarón, almeja, ostión y jaiba es considerada la principal actividad en la península de Atasta, seguida de la industria petrolera, la ganadera y la agricultura. En este lugar, existen actividades asociadas a un gran desarrollo petrolero como son: dragados de la laguna de Pom para el tendido de tubería de transporte de gas y crudo, disminución de áreas de bosque de manglar por tala immoderada, asentamientos humanos y construcción de una planta de nitrógeno que se conectará con el sistema de plataformas petroleras de la Sonda de Campeche.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estos cambios en el ecosistema y su consecuente contaminación por desechos industriales y humanos demanda estudios de impacto ambiental que tomen en cuenta mediciones a largo, mediano y corto plazo, con el fin de establecer los cambios en el ambiente y los posibles efectos que se generen por la actividad petrolera, tanto directa por contaminación de hidrocarburos y derivados, como, por el consecuente aumento en la población que podría ocasionar un incremento considerable en la contaminación del agua de la laguna Pom-Atasta por desechos humanos.

En este sistema lagunar se han observado algunos cambios en el ecosistema, como una disminución considerable de la población de almejas *R. cuneata* en el área de Pom, sin que se conozca la causa precisa; dentro de las posibles explicaciones se ha propuesto la existencia de contaminantes genotóxicos en el sistema lagunar producto del gran desarrollo petrolero en la zona.

Por todo lo anterior, en este trabajo se estudió la actividad citotóxica, mutagénica y genotóxica de los compuestos orgánicos presentes en el agua y sedimento del sistema Pom-Atasta, así como detección química de hidrocarburos y plaguicidas, cuya presencia podría ser nociva tanto para los organismos acuáticos como para los terrestres incluyendo el hombre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO

Determinar si existe actividad citotóxica, mutagénica y genotóxica por exposición al agua y sedimento de diferentes zonas de la laguna Pom-Atasta, Campeche, por medio de las técnicas de tinción dual, AMES y electroforesis unicelular alcalina (EU) en linfocitos humanos.

HIPÓTESIS

La exposición directa de linfocitos humanos al agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta, permitirá detectar la actividad citotóxica, mutagénica y genotóxica de los contaminantes que producen daño en el ADN detectable con las técnicas de tinción dual, AMES y EU. Este daño será significativamente más elevado que el que se encuentra en muestras de agua sin contaminación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y METODOS

Área de estudio (mapa 1):

La zona de trabajo de este estudio fue el sistema Pom-Atasta en Campeche, el cual se encuentra sumamente influido por descargas fluviales de los ríos Grijalva y Usumacinta y por la entrada de agua provenientes de la Sonda de Campeche. Este sistema es un conjunto de lagunas que se encuentra al occidente de la Isla Del Carmen, Campeche en el Golfo de México; entre los 18°30' y 18°35' norte (N) y 91°50' y 92°20' Oeste (W). Es un sistema alargado paralelo a la costa, con una superficie aproximada de 300 km² . está formado por 10 lagunas interiores con una profundidad promedio de 2.7 m; estas lagunas son de este a oeste: Lodazal, Loros, Puerto rico, Palmas, San Carlos, Del Corte, Palancares, Atasta, Pom y Colorada.

La vegetación sumergida es escasa, localizándose manchones de *Vallisneria americana*, *Ruppia maritima* y *Halodule wrightii* . Alrededor del sistema existen diferentes especies de manglar como son: *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* *Conocarpus erectus* y *Laguncularia racemosa*. Con respecto a la fauna acuática destacan las especies de peces, *Cathorops melanopus* (bagre), *Sphaeroides testudineus* (botete), *Eugerres plumieri* (mojarra), *Diapterus rhombeus* (mojarra), *Anchoa mitchilli* (anchoa) y *Micropogonias undulatus* (corvina); también se presentan jaibas, camarones y calamares (Ayala-Pérez y cols.,1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El sistema hidrográfico más relevante en la región es el de los ríos Grijalva y Usumancinta, cuya descarga fluvial es la más importante de América del Norte, después del Mississippi, seguido por la de los ríos Tonalá, Chumpán, Candelaria y Champotón. En Pom-Atasta desembocan diversos afluentes del sistema fluvial Grijalva-Usumacinta; estas descargas aportan sedimentos terrígenos de granulometría variada procedentes de la llanura costera que son impactados por las explotaciones petroleras terrestres de Tabasco y Chiapas. Presenta un gradiente de salinidad entre 3-26‰ que varía dependiendo de la época del año, la temperatura del agua oscila de 25.6 a 32.6 °C y la transparencia es del 20 al 83.3%.

El banco de Campeche fue descrito por Ordóñez en 1936, como una amplia plataforma carbonatada con topografía casi llana. El banco calcáreo puede considerarse limitado hacia el Oeste por la Cuenca Tabasco-Campeche y al Este por el estrecho de Yucatán. El sistema está dominado por sedimentos limo-arcillosos con una gran cantidad de conchas y bajo contenido de carbonato de calcio (<25%). (Ayala-Castañares y Gutiérrez-Estrada, 1990).

La laguna Pom-Atasta se localiza en una zona tropical, el clima es de tipo cálido subhúmedo, isotermal con lluvias en verano. El promedio anual de temperatura es superior a los 26°C y la precipitación anual promedio es de 1,378 mm. La velocidad máxima del viento es de 50-60 Km/hr con vientos dominantes con una dirección noroeste-suroeste; en el invierno se presentan fuertes tormentas tropicales y huracanes (Mancilla y Vargas, 1980). Los vientos del noreste y del sureste controlan el oleaje; el oleaje originado durante el invierno es similar al generado por los fuertes vientos del este y se caracterizan por ser de corta duración y gran magnitud. Los vientos huracanados al ocasionar fuerte oleaje dan lugar a cambios en el nivel del mar y causan intensas lluvias, modificando los procesos sedimentarios en la zona costera (Ayala-Castañares y Gutiérrez-Estrada, 1990).

Muestras de agua y sedimento:

Se tomaron muestras de 2 litros de agua de fondo y 1 litro de sedimento con una draga tipo Van Veen en 15 zonas de la laguna Pom-Atasta, seleccionadas por la posible presencia de un gradiente de contaminación por hidrocarburos y/o plaguicidas. Las muestras fueron divididas por zonas de la siguiente manera (mapa 2).

- 2 muestras en la zona de desembocadura de las lagunas (D1 y D2)
- 5 muestras en la laguna de Atasta (A1, A2, A3, A4 y A5)
- 5 muestras en la laguna de Pom (P1, P2, P3, P4 y P5)
- 3 muestras en la zona de Narvéez (N1, N2 y N3)

La recolección de todas las muestras se realizó en frascos de polietileno que fueron transportadas al laboratorio protegidas de la luz y a 4°C para evitar la alteración de los componentes.

En el laboratorio Central de Calidad del Agua D.G.C.O.H.D.F. se realizó:

- a) La adsorción de los compuestos orgánicos,
- b) La cuantificación de hidrocarburos y plaguicidas.
- c) La prueba de AMES.

Para la extracción de los compuestos orgánicos, los dos litros de agua y sedimento de cada muestra se pasaron a través de un tubo de cobre que contenía una mezcla de resinas tipo XAD2/XAD4 a fin de que se adsorbieran a la resina. Se adicionaron 100 ml de una solución de hexano/ acetona (85:15 v/v), controlando el flujo mediante una manguera de látex y una pinza Hoffman a una tasa de 15ml/min para eluir los compuestos adsorbidos y el eluido fue recolectado en un vaso de precipitado y se evaporó al vacío hasta sequedad. Este eluido se resuspendió en 5 ml de dimetil sulfoxido (DMSO) grado cromatográfico y se almacenó en un vial de vidrio boro-silicato a una temperatura de 0°C, hasta su utilización (Nava, 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La cuantificación de los hidrocarburos aromáticos disueltos, alifáticos disueltos, alquenos disueltos y los plaguicidas se realizó por cromatografía de gases/espectrofotometría de masas.

Ensayo de Mutagenicidad: prueba de AMES

Para esta prueba, se utilizaron dos cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium*: la TA100 y la TA98; las cuales son capaces de detectar mutaciones por sustitución de bases y mutaciones por corrimiento del marco de lectura, respectivamente (Maron, D. y Ames, 1983). Para este ensayo se añadió a una placa de agar mínimo, una mezcla que contenía 2ml de agar de superficie, 100µl del eluido final de cada una de las 15 muestras (dilución 1:10), 100µl de la suspensión bacteriana (cepa TA100 o TA98) y 500µl del activador metabólico (S-9 de hígado de rata) y fueron incubadas durante 48 hs a 37°C.

Los tratamientos realizados para cada muestra fueron: a) Cultivo de cepa bacteriana TA98 o TA100, con el fin de cuantificar el número de colonias con reversión espontánea, b) Cultivo de cepas TA98 o TA100 con el eluido final de la muestra de agua y sedimento y c) Cultivo de cepas TA98 o TA100 con el eluido final de la muestra de agua y sedimento y el activador metabólico S-9. También se realizó un cultivo testigo con DMSO, que es el vehículo en el cual están disueltos los compuestos orgánicos de las muestras, y dos testigos positivos los cuales contenían los compuestos premutágenos, Benzo (a) pireno y Ácido picrotóxico, que generan una respuesta positiva en esta prueba.

Cada tratamiento se realizó por duplicado y se cuantificó el número de colonias con reversión espontánea y el número de colonias revertantes inducidas. En todos los casos se consideró una muestra positiva cuando el número de colonias revertantes inducidas fue el doble o más con respecto al número de colonias con reversión espontánea.

En el laboratorio de Citogenética Humana del instituto Nacional de Pediatría SSA, se realizaron los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad.

Ensayo de Citotoxicidad: Técnica de tinción dual

Para el ensayo de citotoxicidad, se expusieron 400,000 linfocitos/ml durante 6 horas a diferentes diluciones del eluido final de las muestras de agua y sedimento. Las diluciones se realizaron con medio RPMI 1640 y fueron 1:1, 1:10, 1:100, 1:150, 1:200. Después de 6 hs cada muestra se centrifugó a 2500 rpm por 2 min., se desechó el sobrenadante y el botón celular se lavó dos veces con solución salina de Hank's.

Con el fin de conocer la proporción de células vivas en cada dilución, se cuantificó la viabilidad celular por medio de la técnica de tinción dual (Strauss, 1991). Para esta prueba se utilizó una mezcla de bromuro de etidio (0.025µg/µl) y diacetato de fluoresceína (0.125µg/µl), que se aplicó volumen a volumen a la alícuota celular. Después de 3 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 2 minutos y se tomaron 10µl del botón celular, los cuales fueron colocados en un portaobjetos limpio para su análisis en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-40 con filtro de triple banda.

Para cada muestra, se analizaron 100 células por triplicado, se cuantificaron como vivas a las células de color verde y las rojas como muertas (fig.1). Para cada ensayo se utilizaron tres testigos: sin tratamiento, con agua destilada y células con DMSO ya que es el vehículo en el cual están disueltos los compuestos orgánicos de las muestras.

Se realizó una curva de citotoxicidad; aquella dilución en la que se observó una viabilidad promedio mayor al 80% fue la seleccionada para realizar la prueba de genotoxicidad con la técnica EU.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ensayo de Genotoxicidad: Electroforesis unicelular alcalina (EU)

Para el ensayo de genotoxicidad, se expusieron 400,000 linfocitos/ml durante 6 horas a la dilución en la cual se observó una viabilidad mayor al 80% de cada muestra. Pasado este tiempo, las alícuotas se centrifugaron a 2500 rpm por 2 min, se desechó el sobrenadante y el botón celular fue lavado dos veces con solución salina de Hank's.

Preparación de las laminillas para la EU: A un portaobjetos esmerilado se le agregaron 110µl de agarosa regular (0.9%) y se colocó un cubreobjetos. Después de 3-5 minutos se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. A este minigel se le adicionaron 80µl de una mezcla que contenía 75µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) y 5µl de linfocitos y se colocó en una cama de hielo por 3 minutos con el fin de solidificar la agarosa. Posteriormente se añadieron 75µl de agarosa de bajo punto de fusión y se cubrieron con un cubreobjetos. Después de 5 min. se retiró el cubreobjetos y los minigeles se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1% y DMSO 10%) por lo menos durante 24 horas.

Electroforesis y tinción : Los minigeles se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal la cuál contenía buffer pH>13.0 (NaOH 300mM/ EDTA 1mM); después de 20 min, se corrieron a 25V y 300mA durante 20min. Terminado este tiempo se sacaron del buffer alcalino, se lavaron tres veces con buffer de neutralización pH 7.5 (Tris 0.4M) (Vijayalaxmi y cols. 1992) y se colocaron durante 5 minutos en gradientes de metanol (70%, 85% y 100%), se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente para la tinción se adicionaron 50µl de Bromuro de etidio (2µg/ml) .

Análisis de los geles: Los minigeles se codificaron por una persona ajena al estudio con el fin de realizar el análisis a ciegas. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX 40 y se midió el núcleo y el largo de la cola del cometa en micrometros (fig. 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

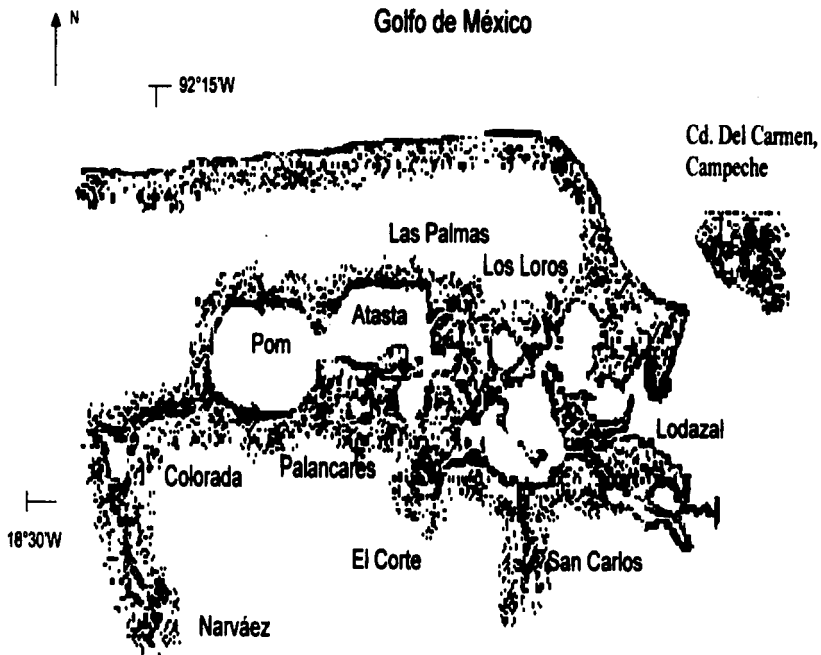
Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, se analizaron 100 núcleos por repetición y se utilizaron 4 testigos: a) Linfocitos sin tratamiento, b) Linfocitos + DMSO, c) Linfocitos + eluido de agua destilada, la cual fue procesada de la misma manera que las muestras de agua y sedimento con el fin de ser utilizado como testigo de agua no contaminada y d) Linfocitos + UVC 2.53j/m/seg, como testigo técnico.

Para el análisis de los cometas, las células fueron divididas en niveles de daño, de acuerdo a la metodología de Anderson y cols. 1994 modificada. Las células sin daño fueron las que presentaron el largo de la cola del cometa menor a 5µm; se consideraron con daño "bajo" a las células que tuvieron entre 6-20µm, con daño "medio" entre 21-40µm, daño "alto" entre 41-95µm y se consideraron linfocitos con daño total, aquellos que presentaron más de 95µm de migración. También se obtuvo el promedio de la migración de la cola del cometa de las células con daño en cada uno de los triplicados y se obtuvo el promedio y desviación estándar total de la migración por repetición y por muestra.

Análisis estadístico

Se utilizó una prueba estadística no paramétrica de Kolmogorov- Smirnov, con el fin de comparar las diferencias entre los niveles de daño. Para las comparaciones entre el promedio de migración de cada muestra con respecto al testigo (DMSO) se utilizó una t-student para muestras independientes.

En todos los casos, se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.



Mapa 1. Sistema Lagunar Pom-Atasta, Campeche.



Fig. 1 Linfocitos teñidos con la técnica de tinción dual (bromuro de etidio/diacetato de fluoresceína). El color verde indica las células vivas y el color rojo las células muertas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

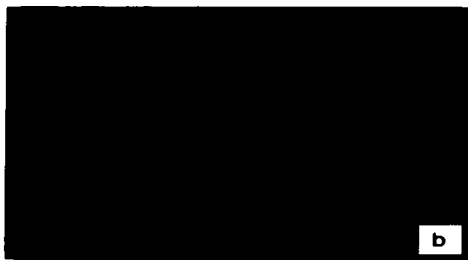


Fig. 2 Electroforesis unicelular alcalina. a) Linfocitos sin daño.
b) Linfocitos con daño, en donde se observa la imagen típica de un cometa.

RESULTADOS

1.- Cuantificación de Hidrocarburos y Plaguicidas.

En los 15 eluidos finales de las muestras de agua y sedimento no se encontraron hidrocarburos aromáticos disueltos, alifáticos disueltos, alquenos disueltos y plaguicidas del tipo aldrin y dieldrin.

2- Mutagenicidad

El promedio de las colonias revertantes para las cepas TA98 y TA100 [Tabla 1], mostraron que 14/15 eluidos de las muestras de agua y sedimento no tienen compuestos capaces de inducir mutaciones en el ADN del tipo de sustitución de bases o por corrimiento del marco de lectura. La muestra A3 fue la única en la que se observó un aumento en el número de colonias revertantes para la cepa TA98, por lo que es posible que esta muestra contenga compuestos que inducen mutaciones del tipo de corrimiento del marco de lectura.

3.- Citotoxicidad

Los resultados de este ensayo [Tabla 2 y Fig. 3] mostraron una relación dosis-respuesta en todos los eluidos finales de las 15 muestras de agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta, a medida que disminuyó la concentración de las muestras, disminuyó la citotoxicidad, que se expresó como un aumento en el número de células vivas.

Las diluciones que se seleccionaron para realizar la prueba de genotoxicidad fueron: 1:100 para 14 muestras y 1:200 únicamente para la muestra P3. Estas diluciones fueron elegidas porque en ellas se observó más del 80% de células vivas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto a los testigos, las células con: DMSO y agua destilada (H₂O) presentaron una viabilidad mayor al 90% en la dilución 1:100. Las células sin tratamiento (S/T) siempre presentaron una viabilidad mayor al 90%.

4.- Genotoxicidad

Testigos negativos:

En las células sin tratamiento (S/T), con DMSO y con H₂O destilada se observó un comportamiento muy similar en los diferentes niveles de daño, se encontró un gran número de células sin daño al ADN y no se observaron células con una migración de la cola del cometa mayor a 95µm. El promedio de la migración de las células con daño fue de 16.8±9.7µm, 12.8±4.0µm y 9.3±2.0µm respectivamente [Tabla 3, Fig. 4].

Debido a que el DMSO es el vehículo en el cual fueron disueltos los componentes de las muestras de agua y sedimento, se utilizó para realizar todas las comparaciones estadísticas

Testigo positivo:

Para este testigo se utilizaron células irradiadas con luz ultravioleta (UVC 2.53j/m/seg) con el fin de monitorear la eficiencia de la técnica de EU. Estas células presentaron un promedio de migración de la cola del cometa de 43.0±4.9µm, observándose diferencias significativas con respecto al DMSO (p=0.0007) [Tabla 3, Fig. 4], así como una disminución en el número de células sin daño y un aumento significativo en los niveles de daño medio, alto y total (p<0.05) con respecto a los testigos negativos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Muestras de agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta (mapa 2):

a) Zona de desembocadura (D1 y D2) [Tabla 3, Fig. 5]: Las dos muestras presentaron una disminución significativa en el número de células sin daño y un aumento en el nivel de daño bajo ($p<0.05$). En la muestra D2, también se observó un aumento significativo en los niveles medio y alto.

El promedio de migración de las células con daño fue: para D1 $16.6\pm 4.9\mu\text{m}$ y para D2 $33.2\pm 4.8\mu\text{m}$, esta muestra presentó diferencias significativas con respecto al testigo con DMSO ($p=0.002$).

b) Laguna de Atasta (A1, A2, A3, A4 y A5): Se observó que las muestras A3($25.2\pm 1.1\mu\text{m}$), A4($30.7\pm 5.5\mu\text{m}$) y A5($40.6\pm 3.3\mu\text{m}$) fueron genotóxicas; ya que se encontró un aumento significativo en el número de células con daño bajo, medio y alto; y una disminución en el número de células sin daño; también se observó un promedio de migración de la cola del cometa mayor al observado en las células con DMSO ($p<0.05$) [tabla 3, Fig. 6]. En las muestras A1 y A2, se observó un comportamiento similar al testigo en los diferentes niveles de daño y en el promedio de migración de la cola del cometa .

c) Laguna de Pom (P1, P2, P3, P4 y P5): En esta zona 4 muestras presentaron actividad genotóxica (P2 a P5) [Tabla 3, Fig. 7]. La muestra P3 fue la más genotóxica de todo el sistema Pom-Atasta, ya que además de presentar diferencias significativas en casi todos los niveles de daño, se debe de considerar que fue la única en la cual se trabajó con una dilución 1:200, debido a que en la dilución 1:100 presentó el 77% de células vivas. Los promedios de migración de la cola del cometa en estas muestras fueron significativamente diferentes al testigo con DMSO y son $29.3\pm 3.6\mu\text{m}$, $37.6\pm 2.3\mu\text{m}$, $37.7\pm 6.2\mu\text{m}$ y $43.4\pm 3.1\mu\text{m}$ ($p<0.05$) respectivamente.

d) Zona de Narváz (N1, N2 y N3): Se observó que N1 presentó actividad genotóxica con una disminución considerable en el número de células sin daño y con daño bajo y un aumento en los niveles de daño medio, alto y total ($p < 0.05$). N2 presentó diferencias significativas con respecto al testigo en el nivel sin daño ($p < 0.05$) y N3 mostró diferencias en el nivel de daño bajo ($p < 0.05$). Los promedios de migración del ADN fueron $73.7 \pm 1.4 \mu\text{m}$, $16.5 \pm 2.4 \mu\text{m}$ y $33.1 \pm 7.4 \mu\text{m}$ respectivamente y mostraron diferencias significativas con respecto al testigo, N1 ($p = 0.0001$) y N3 ($p = 0.006$) [Tabla 3, Fig. 8].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Promedio de colonias revertantes en la prueba de AMES de las 15 muestras del eluido final de agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta.

| Muestras | Colonias Revertantes | |
|-------------------|----------------------|------------|
| | TA98 | TA100 |
| D1 | 44 | 279 |
| D1 + S-9 | 53 | 261 |
| D2 | 68 | 321 |
| D2 + S-9 | 80 | 339 |
| A1 | 48 | 285 |
| A1 + S-9 | 61 | 279 |
| A2 | 47 | 311 |
| A2 + S-9 | 50 | 253 |
| A3 | 41 | 339 |
| A3 + S-9* | 904 | 295 |
| A4 | 71 | 330 |
| A4 + S-9 | 73 | 255 |
| A5 | 69 | 343 |
| A5 + S-9 | 100 | 298 |
| P1 | 55 | 238 |
| P1 + S-9 | 60 | 233 |
| P2 | 41 | 225 |
| P2 + S-9 | 43 | 206 |
| P3 | 54 | 246 |
| P3 + S-9 | 65 | 227 |
| P4 | 60 | 236 |
| P4 + S-9 | 62 | 203 |
| P5 | 52 | 255 |
| P5 + S-9 | 59 | 261 |
| N1 | 71 | 343 |
| N1 + S-9 | 79 | 273 |
| N2 | 47 | 224 |
| N2 + S-9 | 57 | 215 |
| N3 | 66 | 337 |
| N3 + S-9 | 73 | 283 |
| DMSO | 57 | 214 |
| DMSO + S-9 | 53 | 173 |
| Ácido picrolónico | 1459 | 1077** |
| Benzo (a) pireno | 225 | 401** |

* Muestra positiva que indica la existencia de compuestos pre-mutágenos con mutaciones del tipo de corrimiento del marco de lectura.

** Controles positivos

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad en linfocitos humanos expuestos a diferentes diluciones de los 15 euidos finales de las muestras de agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta, Cam.

| Dilución | 1:1 | 1:10 | 1:100 | 1:150 | 1:200 |
|-------------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Muestras | | | | | |
| D1 | 0 | 0 | 86±2 | 91±1 | 96±1 |
| D2 | 0 | 0 | 89±4 | 88±5 | 93±2 |
| A1 | 0 | 0 | 81±6 | 92±2 | 93±1 |
| A2 | 0 | 0 | 90±4 | 95±2 | 95±2 |
| A3 | 0 | 0 | 86±4 | 94±2 | 92 ±8 |
| A4 | 0 | 0 | 91±3 | 88 ±5 | 90±4 |
| A5 | 0 | 0 | 81±1 | 90±2 | 90±4 |
| P1 | 0 | 0 | 87±1 | 91±5 | 97±3 |
| P2 | 0 | 0 | 83±3 | 91±4 | 93±1 |
| P3 | 0 | 0 | 77±2 | 78±2 | 82±3 |
| P4 | 0 | 0 | 81±1 | 90±5 | 93±1 |
| P5 | 0 | 0 | 80±2 | 94± 3 | 97±2 |
| N1 | 0 | 0 | 80±3 | 82±2 | 87±7 |
| N2 | 0 | 0 | 88±3 | 88±7 | 97±3 |
| N3 | 0 | 0 | 83±3 | 89±6 | 93±1 |
| Testigos | | | | | |
| *H ₂ O | — | 12±3 | 98±1 | 90±1 | 90±1 |
| DMSO | — | 37±2 | 94±1 | 95±0 | 96±1 |
| ** S/T | — | 93±2 | 93±2 | 97±2 | 96±2 |

Los números sombreados indican el porcentaje de viabilidad mayor al 80% y la dilución con la cual se trabajó el ensayo de genotoxicidad.

* Muestra de agua destilada tratada de la misma manera que las muestras de agua y sedimento.

** Células sin tratamiento

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Número de células en los diferentes niveles de daño de los 15 eluidos finales de las muestras de agua y sedimento de la laguna Pom-Atata.

| Muestra | Sin daño/ Con daño | Bajo | Medio | Alto | Total | Migración del ADN (μm)** |
|------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--|
| | | 6-20 μm | 21-40 μm | 41-95 μm | >95 μm | |
| D1 | 198 / 102 | 77 | 19 | 6 | 0 | 16.6 \pm 4.9 |
| D2 | 142 / 158 | 78 | 48 | 26 | 6 | 33.2 \pm 4.8 ^a |
| A1 | 267 / 33 | 26 | 5 | 2 | 0 | 13.8 \pm 0.9 |
| A2 | 233 / 67 | 50 | 15 | 2 | 0 | 17.8 \pm 3.8 |
| A3 | 134 / 166 | 76 | 52 | 38 | 0 | 25.2 \pm 1.1 ^a |
| A4 | 105 / 195 | 78 | 64 | 52 | 1 | 30.7 \pm 5.5 ^a |
| A5 | 69 / 231 | 57 | 81 | 93 | 0 | 40.6 \pm 3.3 ^a |
| P1 | 221 / 79 | 69 | 7 | 2 | 1 | 15.0 \pm 2.2 |
| P2 | 162 / 138 | 50 | 57 | 31 | 0 | 29.3 \pm 3.6 ^a |
| P3* | 93 / 207 | 54 | 71 | 78 | 4 | 37.6 \pm 2.3 ^a |
| P4 | 119 / 181 | 37 | 58 | 83 | 3 | 37.7 \pm 6.2 ^a |
| P5 | 21 / 279 | 47 | 88 | 129 | 15 | 43.4 \pm 3.1 ^a |
| N1 | 0 / 300 | 2 | 19 | 217 | 62 | 73.7 \pm 1.4 ^a |
| N2 | 187 / 113 | 87 | 22 | 4 | 0 | 16.5 \pm 2.4 |
| N3 | 210 / 90 | 45 | 19 | 21 | 5 | 33.1 \pm 7.4 ^a |
| Testigos | | | | | | |
| *DMSO | 277 / 73 | 62 | 10 | 1 | 0 | 12.8 \pm 4.0 |
| ^b ST | 328 / 72 | 59 | 8 | 5 | 0 | 16.8 \pm 9.7 |
| H ₂ O dest. | 227 / 73 | 68 | 5 | 0 | 0 | 9.3 \pm 2.0 |
| UVC | 68 / 232 | 71 | 68 | 63 | 30 | 43.0 \pm 4.9 ^a |

- * Dilución utilizada 1:200
- ^a Se analizaron 350 células
- ^b se analizaron 400 células
- * Testigo positivo

** Los valores de esta columna se compararon con el promedio de la migración del ADN del testigo con DMSO. ^a muestra diferencias significativas con una t-Student para muestras independientes p<0.05.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

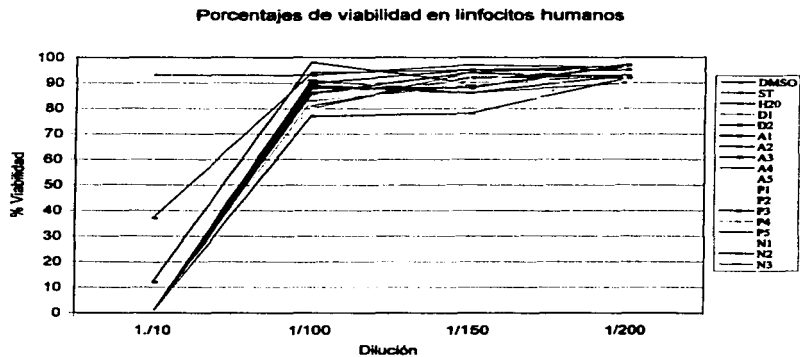


Fig. 3 Porcentaje de viabilidad de linfocitos tratados con los controles negativos y los 15 eluidos finales de las muestras de agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

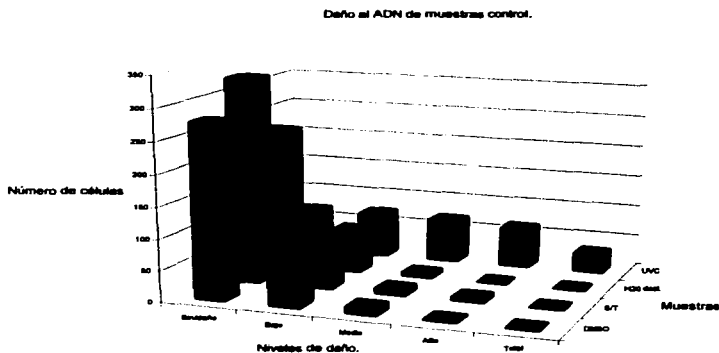


Fig. 4. Número de células en los diferentes niveles de daño de las 4 muestras control. Las muestras DMSO, S/T y H₂O no presentaron diferencias significativas. En el control tratado con UVC se se encontraron diferencias significativas en los niveles: sin/daño, medio, alto y total ($p < 0.05$) Prueba no paramétrica kolmogorov-Smirnov.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Daño al ADN del estudio final de la zona de desembocadura

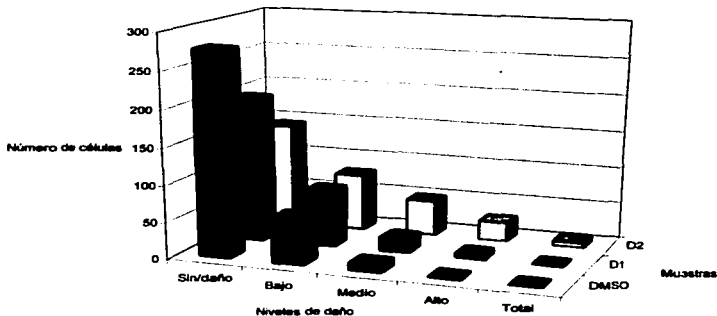


Fig. 5. Número de células en los diferentes niveles de daño de las 2 muestras de la zona de desembocadura. D1 presentó diferencias significativas en los niveles de daño sin daño y bajo. D2 mostró diferencias significativas en todos los niveles de daño excepto en el nivel total ($p < 0.05$). Prueba no paramétrica kolmogorov-Smirnov.

Daño al ADN del estudio final de las muestras de agua y sedimento de la laguna de Atasta

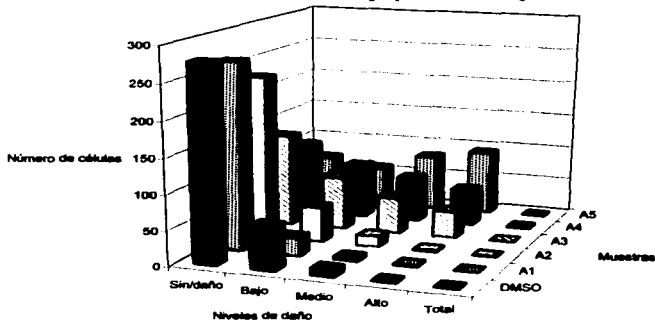


Fig. 6. Número de células en los diferentes niveles de daño de las 5 muestras de la laguna de Atasta. A1 solo presentó diferencias significativas en el nivel de daño bajo ($p < 0.05$). Las muestras A3-A5 presentaron diferencias significativas en todos los niveles de daño ($p < 0.05$) excepto el nivel total. Prueba no paramétrica kolmogorov-Smirnov.

Daño al ADN del eluido final de las muestras de agua y sedimento de la laguna de Pom.

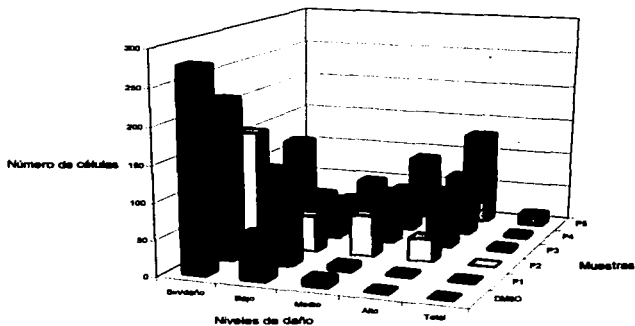


Fig. 7. Número de células en los diferentes niveles de daño de las 5 muestras de la laguna de Pom. Las muestras P2-P5 presentaron diferencias significativas en los niveles de daño sin daño bajo, medio y alto con respecto al control ($p < 0.05$), Kolmogorov-Smirnov.

Daño al ADN del euido final de las muestras de agua y sedimento de la zona de Nervéz:

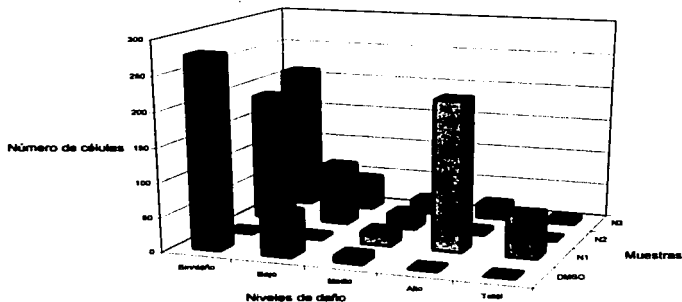
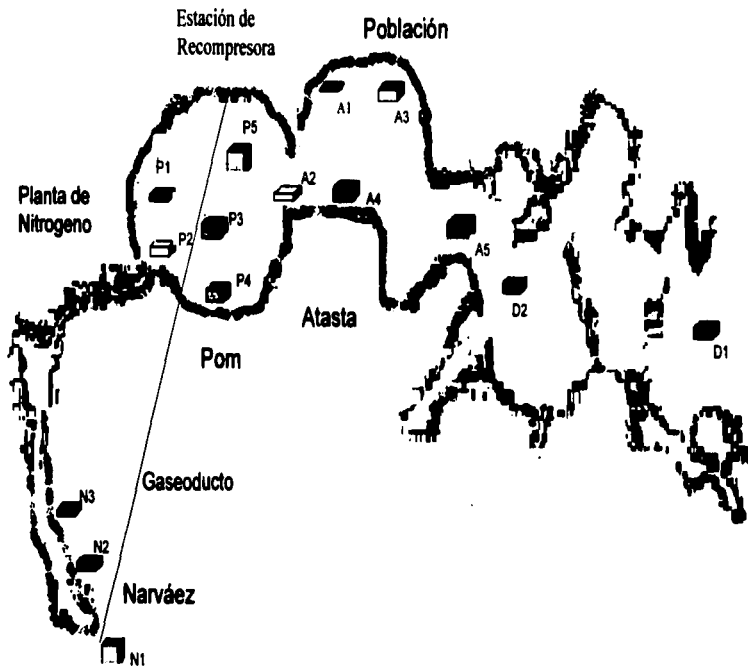


Fig. 8. Número de células en los diferentes niveles de daño de las muestras de la zona de Nervéz.
 La muestra N1 presentó diferencias significativas en todos los niveles de daño ($p < 0.05$)
 N2 solo mostró diferencias significativas en el nivel sin daño y N3 en el nivel con daño bajo ($p < 0.05$). Prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov

Golfo de México



38

Mapa 2. Distribución del daño genotóxico en la laguna Pom-Atasta.

Las barras representan el promedio de la migración del ADN.

38

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La contaminación ambiental produce cambios en los ecosistemas perjudicando en forma directa o indirecta la salud del hombre, en especial la actividad industrial ha dado como resultado la aparición en el ambiente de numerosos compuestos tóxicos, muchos de los cuales se han asociado a daño cromosómico o a la aparición de cáncer (Moretton y cols. 1990). Los estudios realizados para evaluar el daño de estos agentes tóxicos en los sistemas biológicos son muy variados. En 1984, Ostling y Johanson introdujeron la técnica de electroforesis unicelular para detectar rupturas de doble cadena del ADN en células individuales. Posteriormente Singh y cols. modificaron la técnica para condiciones alcalinas, con lo que lograron detectar rupturas en cadena sencilla del ADN (Vijayalaxmi y cols. 1992). A partir de estas modificaciones diversos autores han utilizado la EU para evaluar el efecto de los contaminantes acuáticos (Mitchelmore y Chipman, 1998).

Citotoxicidad:

En el caso de los testigos negativos, los linfocitos tratados con DMSO y agua destilada mostraron respuesta citotóxica a una dilución 1/10 con un porcentaje de viabilidad de 37 y 12% respectivamente; estos resultados mostraron que el DMSO es tóxico para las células a elevadas concentraciones como 1/10. El comportamiento del agua destilada es similar ya que fue tratada de la misma manera que las muestras de agua y sedimento de la laguna y el eluido final contiene DMSO.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las muestras de agua y sedimento también se observó actividad citotóxica a una dilución de 1/10, a diferencia de los testigos negativos, en esta dilución no se observaron células vivas, lo cual indica una toxicidad adicional atribuible a las muestras de agua y sedimento; en 14 muestras el 80% de viabilidad se encontró en la dilución 1:100 y en una muestra (P3) se alcanzó esta viabilidad en 1:200. Con estos resultados podemos considerar que el DMSO a concentraciones elevadas es tóxico para las células y a concentraciones bajas (1/100) el promedio de viabilidad es de 90% o más; por lo que la citotoxicidad observada en las 15 muestras de agua y sedimento no es inducida por el DMSO, si no por los compuestos orgánicos presentes en el agua de la laguna Pom-Atasta.

Mutagenicidad:

En el ensayo de AMES sin activación metabólica (sin S-9), no se observó una respuesta positiva en ninguna de las 15 muestras de agua y sedimento. Sin embargo, cuando al cultivo bacteriano se le adicionó la fracción S-9 se encontró una respuesta positiva en la muestra A3, localizada cerca del poblado de Atasta, por lo que se infiere que en la zona se encuentran contaminantes que inducen mutaciones del tipo de corrimiento del marco de lectura previa activación por microsomas hepáticos, este daño puede ser inducido por un contaminante diferente derivado de los desechos humanos de la población de Atasta o de los cultivos aledaños a la zona, diversos autores sugieren que algunos químicos utilizados en los cultivos agrícolas son excelentes candidatos para inducir daño clastogénico en linfocitos humanos (Torres de Lemos y Erdtmann, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque este es el primer estudio en la laguna de Pom-Atasta en el que se detectó actividad mutagénica, existe un reporte previo en el cual se demostró mutagenicidad en el ostión *Crassostrea virginica* de la laguna de Términos (Guerrero, 1996). Estos autores, encontraron un efecto positivo en la prueba de AMES sin activación metabólica para la cepa TA98 en la época de Nortes y con activación metabólica (TA98) en la temporada de secas, lluvias y nortes; lo que muestra que a pesar de que los sistemas de prueba son diferentes, sí existen en la zona agentes pre-mutagénicos que si son ingeridos por los organismos acuáticos y terrestres, incluyendo a los humanos, su sistema P450 procesará los compuestos pre-mutágenos para generar dentro de estos organismos los compuestos mutágenos que dañaran al ADN. (Snyder, 2000; Ioannides, 1996).

Genotoxicidad:

Se encontró actividad genotóxica en 10 de las 15 muestras del sistema lagunar Pom-Atasta (mapa 2). El mayor daño se observó en la laguna de Pom, seguido por la zona de Narváez, las muestras P3, P4, P5 y N1 se encuentran muy cercanas al gasoducto y presentaron los niveles más elevados de genotoxicidad, lo que sugiere que posiblemente del gasoducto se estén desprendiendo compuestos que causan daño al ADN. Estos compuestos que se están desprendiendo no generan un gradiente de contaminación, ya que se esperaría, si existiera este gradiente, que las muestras que se localizan a mayor distancia del gasoducto presenten el menor daño, sin embargo este comportamiento no lo observamos ya que por ejemplo D2 presentó niveles de daño muy similares a N3 y esta última se encuentra muy cerca del gasoducto, otro ejemplo se observó en D1 que presentó un daño muy similar a N2 y también se localizan a diferentes distancias del gasoducto, por lo que concluimos que no existe un gradiente de contaminación a partir del gasoducto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es importante considerar que la distribución de los contaminantes depende de las características geográficas y corrientes de agua. Se ha reportado que existe una corriente que va desde la laguna de Pom, hacia la laguna de Atasta y desemboca en la laguna de Términos, de tal manera que esta agua se mezcla con el agua de la laguna de Términos y posteriormente la corriente se dirige hacia el mar por el lado Oeste de Cd. Carmen (Lizarraga-Partida y cols.1987). Aunada a esta corriente existen diversos aportes de agua estacionales como los realizados por los ríos San Pedro y San Pablo localizados en el límite entre Tabasco y Campeche, que influyen directamente sobre la concentración de los contaminantes cuando es temporada de lluvias (Ayala-Pérez y cols., 1993; Mancilla y Vargas, 1980); por tal motivo es necesario realizar estudios del comportamiento de los contaminantes en temporada de lluvias, nuestro estudio fue realizado en abril (secas) y es probable que el agente inductor del daño observado tenga efectos diferentes en la época de lluvias, ya que si la fuente de emisión del contaminante es terrestre, la lluvia arrastrará el contaminante permitiendo su acumulación en ciertas zonas de la laguna o bien si se origina por dentro de la laguna como sería el caso del desprendimiento de compuestos del gaseoducto, entonces la lluvia lo diluiría por un aumento en la cantidad de agua.

Otro factor importante a considerar son las características propias de la zona. En algunos lugares existen zonas que promueven la acumulación de los contaminantes, ya sea por escasa circulación del agua o por la existencia de recodos; estas características pueden provocar que en muestras cercanas, los niveles de daño al ADN sean muy diferentes, como es el caso de las muestras A1 y A3 o P1 y P2; en las que se observó que a pesar de ser muy cercanas los niveles de daño al ADN fueron diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es muy probable que el daño citotóxico, genotóxico y mutagénico observado en este estudio, este inducido por diferentes contaminantes, los hidrocarburos y los plaguicidas del tipo aldrín y dieldrín, no son responsables de este daño ya que el análisis químico no mostró la presencia de estos compuestos en las muestras de agua y sedimento, sin embargo el encontrar diferentes tipos de daño con los sistemas de prueba *Salmonella typhimurium* y linfocitos humanos nos hace pensar en la posibilidad de la existencia de diversos contaminantes del sistema lagunar Pom-Atasta. De acuerdo a la información que se tiene de la laguna de Términos y de los datos del sistema Pom-Atasta, se ha demostrado que existen tres posibles fuentes de contaminación en el sistema: hidrocarburos fósiles residuales (HFR), plaguicidas y metales.

Los HFR dañan al material genético provocando mutaciones por sustitución de bases o por corrimiento en el marco de lectura. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son los más dañinos, sin embargo su efecto mutagénico en *S. typhimurium* requiere de previa activación por los microsomas hepáticos (Guerrero, 1996). Este tipo de contaminante se puede descartar como posible inductor del daño observado, ya que en las muestras de agua y sedimento no se encontraron hidrocarburos, lo cual indica que no hay escape del contenido del gaseoducto.

Con respecto los plaguicidas, podemos decir que el aldrín y dieldrín no son los inductores del daño observado en los linfocitos humanos; sin embargo, es necesario realizar la búsqueda específica de otros plaguicidas que puedan encontrarse en el sistema y causar daño al ADN. Estudios realizados en sedimentos y tejidos de oatión de las lagunas del Carmen-Machona, Tabasco y Alvarado, Veracruz demostraron la presencia de herbicidas organoclorados del tipo heptacloro, aldrín, dieldrín y endrina y a pesar de que las concentraciones encontradas fueron bajas, los autores proponen que pueden causar efectos subletales en las poblaciones de organismos acuáticos (Díaz-González y Rueda, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha observado también que algunos plaguicidas pueden causar daño genotóxico, Clements y cols, demostraron que herbicidas tales como la atrizina y el metalocloro inducen un aumento significativo del daño al ADN en *Rana catesbeiana* evaluado por medio de la técnica de EU alcalina (Clements y cols., 1997). Otros autores, utilizando la misma técnica pero en células CHOK1 no observaron un aumento significativo en la migración del ADN inducido por diferentes concentraciones del herbicida isoproturon (Vigneux y cols., 1998). Estudios recientes demostraron que el herbicida terbutrin a dosis de 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$ induce un aumento en la migración del ADN en linfocitos humanos sin la activación por microsomas hepáticos (S9); en presencia de S9 no se observó un aumento en la migración del ADN; por lo que los autores concluyen que este compuesto puede ser considerado como genotóxico in vitro (Moretti y cols. 2002). Debido a los datos anteriores es posible que existan en el sistema lagunar otros plaguicidas utilizados en los cultivos aledaños a la zona los cuales pueden ser responsables del daño observado.

Por último, los metales constituyen un gran problema en el ambiente acuático por la capacidad que tienen para formar complejos con la materia orgánica y por la tendencia que tienen a fijarse en los tejidos de los organismos expuestos. Vázquez y cols, realizaron un estudio en los tejidos del ostión *Crassostrea virginica* en la laguna de Términos en Campeche en diferentes épocas del año. Estos autores no encontraron metales en los tejidos de estos organismos en el mes de abril; en otros meses del año si observaron estos compuestos y el más abundante fue el Hierro ($725+317\text{mg Kg}^{-1}$), seguido por el Zinc ($586+312\text{ mg Kg}^{-1}$) y el Cobre ($284+118\text{ mg Kg}^{-1}$) (Vázquez y cols. 1993). En la columna de agua de la laguna de Términos también se han encontrado concentraciones de Hierro ($61.9\mu\text{g Kg}^{-1}$), Cobre ($1.76\mu\text{g Kg}^{-1}$) y Magnesio ($0.39\mu\text{g Kg}^{-1}$), las cuales se encuentran por arriba de los límites permitidos por la SEDUE (1986), ya que ninguno de los tres metales deben de estar presentes en las aguas costeras (Vázquez y cols. 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la laguna de Atasta se ha detectado en el agua contaminación por Plomo (38.0 $\mu\text{g/l}$), Cromo (7.0 $\mu\text{g/l}$) y Cadmio (3.0 $\mu\text{g/l}$) que están por arriba de los límites permisibles por la SEDUE (1990), los valores permitidos son 6.0, 1.0 y 0.9 $\mu\text{g/l}$ respectivamente (Villanueva y Páez-Osuna, 1996). Estos antecedentes nos llevan a proponer que los metales, en especial el hierro, zinc y cobre pueden contribuir a la generación del daño al ADN observado en el agua y sedimento de la laguna Pom-Atasta, por lo que es necesario hacer el estudio específico de estos metales.

A pesar de que los metales y algunos plaguicidas son buenos candidatos para inducir el daño al ADN, debemos considerar que en el ambiente acuático no existe un solo contaminante, sino una mezcla de agentes que son vertidos al ecosistema. Por ejemplo, en la región de Atasta se ha observado que existe salinización de tierras y que la ruptura del canal del gaseoducto en 1985 provocó un aumento en la salinización natural de la zona; también se ha observado que existe contaminación de dióxido de azufre que se manifiesta como deposición seca del contaminante emitida por los quemadores de la estación recompresora de PEMEX. El dióxido de azufre en combinación con la humedad del ambiente y las sales de cloro de los aerosoles marinos magnifican los procesos de corrosión, que podrían ocasionar desprendimiento de metales del gaseoducto. Las actividades antropogénicas también juegan un papel importante en la contaminación de la zona; ya que la construcción de canales de gaseoductos, terrapienes de carreteras, actividades agropecuarias, aumento de la población humana y disminución de las zonas de manglar, provocan cambios en el ambiente que pueden generar contaminación ya sea por metales, plaguicidas o desechos humanos (Velázquez y Meza, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente, es probable que el daño observado al ADN en este trabajo, pueda no estar relacionado con un solo contaminante, sino por una mezcla de diferentes contaminantes, por lo que consideramos necesario realizar estudios complementarios a corto, mediano y largo plazo encaminados a determinar de manera específica los contaminantes existentes ya sea por desechos humanos, plaguicidas, metales, etc. con el fin de documentar los cambios que se están generando en el ambiente acuático. Consideramos importante realizar estudios *in vivo* e *in vitro* en las especies acuáticas en las cuales se ha detectado disminución de la población y que se sospecha que es por efecto de sustancias genotóxicas, ya que a pesar de que los sistemas de prueba utilizados en este trabajo son ampliamente reconocidos por su potencial para detectar compuestos genotóxicos *in vitro*, sólo nos indican si existe o no actividad genotóxica y proporcionan información cualitativa sobre la existencia del contaminante y su toxicidad pero no es posible extrapolar el daño observado a lo que ocurre en los organismos completos, debido a que en un sistema *in vivo* existen factores extrínsecos tales como dosis internalizada, farmacocinética del compuesto, dieta, luz solar etc. y factores intrínsecos como el metabolismo del organismo (en el que intervienen de manera diferente los genes de cada especie) para detoxificación, la respuesta del sistema de reparación al ADN, las hormonas, etc. (Michelmores y Chipman, 1998; Coteille, S. y Féraud, J. 1999) que influyen en los resultados de una exposición determinada, por lo que los estudios *in vivo* en diferentes tejidos de las especies son los que proporcionan información precisa del efecto y del mecanismo de acción de los contaminantes (Devoret, 1979; Curtis, 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- * Al-Madfa, H., Abdel-Moati, R. Y Al-Gimaly, F.H. 1998 *Pinctada radiata* (Pearl Oyster): A bioindicator for Metal Pollution Monitoring in the Qatari Waters (Arabian Gulf). *Bull Environ Contam Toxicol* 60: 245-251.
- * Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. 1994 The effect of various antioxidantes and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1;307:261-71.
- * Ayala-Pérez, L.A., Aguirre-León, O.A., Avilés-Alatriste, M.T., Barreiro-Gómes, J.L., Rojas-Galaviz, J.L. 1993 *Peces de sistemas fluvio-lagunares, laguna de Términos, Campeche*. Pp 596-698 In *Biodiversidad Marina y Costera de México*. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds) *Com. Nat. Biodiversidad y CIGRO, México, 865pp.*
- * Ayala-Castañares, A. y Gutiérrez-Estrada M. 1990 *Morfología y sedimentos superficiales de la plataforma continental frente a Tabasco y Campeche, México*. *An Inst Cienc del Mar y Limnol, UNAM, México* 17:163-190.
- * Benítez, J. Y Barcenas, C. 1996. *Sistemas fluvio-lagunares de la laguna de Términos. Hábitats críticos susceptibles a los efectos adversos de los plaguicidas*, p.187-201. In: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez y D. Zárate-Lomeli (eds). *Golfo de México, Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México, 666 p.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Botello, A. y Villanueva S. 1987 Vigilancia de los hidrocarburos fósiles en sistemas costeros del Golfo de México y áreas adyacentes. I. Sonda de Campeche. An Inst Cienc del Mar y Limnol. Univ. Natl. Auton. México. 14:45-52.

* Botello, A. y Calva, L.G. 1998 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua, and Tampamachoco Lagoons in the Southern Gulf of Mexico. Bull Environ Contam Toxicol 60:96-103.

* Clements, CH., Ralph S. y Petras M. 1997 Genotoxicity of Select Herbicides in Rana catesbeiana Tadpoles Using the Alkaline Single-Cell gel DNA Electrophoresis (comet) assay. Environ Mol Mutagen 29:277-288.

* Cotelle, S. y Féraud, J.F. 1999 Comet assay in genetic ecotoxicology: A review Environ and Mol Mutagen 34:246-255.

* Curtis, Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons. 2001 McGraw-Hill, N. York, 1236 pp.

* Díaz-González, G. y Rueda, L. 1996 Niveles de concentración de plaguicidas organoclorados en las lagunas del Carmen, Machona y Alvarado, p.177-185. In: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez, y D. Zárate-Lomeli (eds). Golfo de México, Contaminación e impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666p.

* Devoret, R. 1979 Bacterial tests for potencial carcinogens. Scientific American 241 : 28-37.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Dinelli, G., Vicari, A. y Catizone P. 1996 Monitoring of herbicide pollution in water by capillary electrophoresis. *J Chromatogr.* 733:337-347.

* Dong, Y., Sun, C., Xu, S., Dai, J., Fen, J., Jiang, X. y Wang, L. 2000. Polychlorinated organic compounds (PCOCs) in the Yangtse river water samples using SPE and GC/ECD. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:383-389.

* Gold-Boucht, G., Zavala-Coral, M., Zapata-Pérez, O. y Ceja-Moreno, V. 1997 Hydrocarbon Concentrations in Oysters (*Crassostrea virginica*) and recent Sediments from three Coastal Lagoons in Tabasco, México. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:430-437.

* Guerrero, Y. 1996 Determinación de la genotoxicidad de ostiones contaminados de la laguna de la Mancha, Ver y de Términos, Camp. en *Drosophila melanogaster* y *Salmonella typhimurium*. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias, UNAM.

* Ioannides, C. Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological aspects. Eds. CRC Pres, New York. 1996. 411 pp.

* Lizárraga-Partida, M.L., Carballo, C.R., Izquierdo-Vicuña, F., Colwell, R. y Chang, W. 1987 Bacteriología de la laguna de Términos, Campeche, México. *An Inst Cienc del Mar y Limnol, UNAM.* 14:97-108.

* Mancilla, M., y Vargas, M. 1980 Los primeros estudios sobre circulación y el flujo neto de agua a través de la laguna de Términos, Campeche. *An Centro Cienc del Mar y Limnol, UNAM.* 7:1-12.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SE
DE LA BIBLIOTECA

* Maron, D.M y Ames B.N. 1983 Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215.

* Medina D., Prieto, G., Ettiene, I., Buscema, A. y Abreu de V. 1999 Persistence of Organophosphorus Pesticide Residues in Limón River Esters. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:39-44.

* Meyer, S.F. y Gersberg, R.M. 1997 Heavy metals and Acid-Volatile Sulfides in sedimenmts of the Tijuana Estuary. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:113-119.

* Mitchelmore, C.L. y Chipman, J.K. 1998 DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399:135-147.

* Moretton J., Baron, P., Zelazny, A., Nuccetelli, M. y D'Aquino. 1990 Estudio de genotoxicidad de las muestras de lodo de un río contaminado por efluentes industriales. *Rev Int Contam Ambient* 6:55-68.

* Moretti, M., Marcarelli, M., Villarini, M. y Fatigoni, C. 2002 In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn:cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol in Vitro* 16:81-88.

* Nava, L.A. 1994 Selección de una metodología para concentración de contaminantes orgánicos a partir de agua potable, residual y renovada, determinación mediante bioensayos de la actividad mutagenica de las muestras obtenidas. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 147pp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

* Nacci, D. y Nelson, S. 1992 Application of the DNA Alkaline Unwinding Assay to Detect DNA Strand Breaks in Marine Bivalves. *Mar Environ Res* 33:83-100.

*Nelson, D. Y Cox, M. Lehninger principios de bioquímica. Ed. Omega, Barcelona 2000, 1152 pp.

* Olima, C., Pablo. y Lim. R. 1997 Comparative Tolerance of Three Populations of the Freshwater Shrimp (*Paratya australiensis*) to the Organophosphate Pesticide, Chlorpyrifos. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:321-328.

* Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S. y Vrzoc, M. 1995 Alkaline Single Cell Gel (comet) Assay and Genotoxicity Monitoring Using Bullheads and Carp. *Environ Mol Mutagen* 26:345-346.

* Patrick, R. 1973 Use of algae specially diatoms in the assessment of water quality. In *Biological methods for assessment of water quality* ASTM. Philadelphia. STP-528.

* Plappert, U., Stocker, B., Fender, H. y Fliedner, T. 1997 Changes in the Repair Capacity of Blood cells as a Biomarker for Chronic Low-Dose Exposure to Ionizing Radiation *Environ Mol Mutagen* 30:153-160.

* Ramos, L., Fernández, M., González, M. Y Hernández, L. 1999 Heavy Metal Pollution in Water, Sediments, and Earthworms from the Ebro River, Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:305-311.

* Rodriguez-Ariza, A., Abril, J.I., Navas, G., Dorado, J., López Barea y Pueyo, C. 1992 . Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coast. *Environ Mol Mutagen* 19:112-124.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Rosales, M.T.L. y Alvarez, R.L. 1979. Niveles actuales de hidrocarburos organoclorados en sedimentos de lagunas costeras del Golfo de México. *An Centro Cienc del Mar y Limno Univ Nal Auton México* 6:1-6.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. y Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Snyder, M. 2000 Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic toxicol* 48:529-547.
- Strauss, G.H.S. 1991 Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res* 252:1-15.
- Torres de Lemos, C y Erdtmann, B. 2000 Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutat Res* 467:1-9.
- Van Der Hoeven, N., Salm, K y Raat. W.K. 1990 Salmonella test: Relation between mutagenicity and number of revertant colonies. *Mutat Res* 234:289-302.
- Vázquez, G.F., Sánchez, G.M. y Sharman, V. 1993 Trace Metals in the Oyster *Crassostrea virginica* of the Terminos Lagoon, Campeche, México. *Mar Pollut Bull* 26:398-399.
- Vázquez F., Sharman, V., Alexander, V y Frausto C. 1995 Metals in some Lagoons of México. *Environ Health Perspect* 103(suppl 1): 33-34.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

* Velázquez, E y Meza, L. 2002 Notas al diagnóstico integral de la problemática ambiental en la región de Atasta, Campeche. www.laneta.apc.org/oilwatch/epocom.html

* Vigreux, C., Poul, J.M., Deslandes, E., Lebailly, P., Godard, T., Sichel, F., Henry-Amar, M. y Gauduchon, P. 1998 DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOKI cells. *Mutat Res* 419:79-90.

* Vijayalaxmi, Tice, R. y Strauss, G. 1992 Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 271:243-252.

* Villanueva, F, y Botello, A. 1988 Evaluación de algunos metales pesados en organismos del Río Coatzacoalcos y de la Laguna del Ostión, Ver., México. *Rev Contam Ambient* 4:19-31.

* Villanueva, S. y Páez-Osuna, F. 1996 Niveles de Metales en el Golfo de México: Agua, Sedimentos y Organismos, p.309-347. In:A.V.Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.L. Benitez, D. Zárate-Lomeli (eds). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 666pp.

* Wilson, J.T., Pascoe, P.L., Parry, J.M., y Dixon, D.R. 1998 Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca:Pelecypoda). *Mutat Res* 399:87-95.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN