



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal.

Efecto del Bisfenol A en el desarrollo gonadal de embriones de la tortuga marina  
*Lepidochelys olivacea*.

TESIS

Para obtener el grado de maestro en ciencias

PRESENTA

MVZ Mónica Yadeun de Antuñano

Tutor: Dr. Horacio Merchant Larios

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Comité Tutor: Dr. René Rosiles Martínez

Dr. Gerardo Suzán Azpiri

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



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.

A mi mamá y a mi abuela.

AGRADECIMIENTOS:

PAPIIT-DGAPA No. IN205213; CONACYT 166012. Permisos SEMARNAT SGPA/DGVS/01945 y 02133; Dr. Horacio Merchant Larios; Dr. René Rosiles; Dr. Gerardo Suzán; M en C. Patricia Padilla; M. en C. Alejandro Marmolejo; M. en C. Martha Harfush; Biól. Yolanda Hornelas; Dra. Verónica Díaz Hernández.

## Contenido

RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
ANTECEDENTES .....	9
IMPORTANCIA DEL MAR .....	9
TORTUGAS MARINAS .....	12
TORTUGA GOLFINA .....	14
MIGRACIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA .....	16
EL PLÁSTICO EN EL MAR .....	21
EI BISFENOL A .....	23
TRANSMISIÓN MATERNA DE CONTAMINANTES .....	27
DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA .....	29
REPRODUCCIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA .....	31
OBJETIVO .....	33
HIPÓTESIS .....	33
JUSTIFICACIÓN .....	33
MATERIAL Y MÉTODOS .....	35
SITIO DE ESTUDIO .....	35
OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	35
Análisis cuantitativo de contenido de BPA en huevos de la playa la Escobilla .....	36
Estandarización de la técnica .....	36
Análisis de contenido de BPA en huevos de la playa .....	38
Experimentación del Efecto del BPA en el Desarrollo Gonadal de tortuga golfina con dosis conocidas .....	39
Microscopía de Barrido .....	41
Inclusión en EPON para análisis histológico .....	41
Inmunofluorescencias .....	42
RESULTADOS .....	43
Análisis cuantitativo de contenido de BPA en huevos de la playa la Escobilla .....	44
MEDICIÓN DE BPA EN LOS HUEVOS DE LA PLAYA .....	44

Experimentación del Efecto del BPA en el Desarrollo Gonadal de tortuga golfina con dosis conocidas .....	45
MORTALIDAD.....	45
MICROSCOPIA DE BARRIDO: .....	49
HISTOLOGÍA.....	53
INMUNOFLUORESCENCIAS .....	65
DISCUSIÓN .....	67
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA MEDIR BPA EN VITELLO DE TORTUGA MARINA GOLFINA .....	67
PRESENCIA DE BPA EN LOS HUEVOS DE LA PLAYA .....	67
MORTALIDAD.....	68
MICROSCOPIA DE BARRIDO .....	68
HISTOLOGÍA.....	69
INMUNOFLUORESCENCIA .....	70
CONSIDERACIONES FINALES.....	70
CONCLUSIONES .....	72
LITERATURA CITADA. ....	73
ANEXOS .....	86

## RESUMEN

El residuo más común en los océanos son los plásticos. Éstos tienen la capacidad de liberar tóxicos que interfieren con el sistema endocrino o con cualquier otro órgano o sistema que responda a hormonas. Dentro de este grupo, los más comunes son los que se comportan como estrógenos y reciben el nombre de xenoestrógenos, y el de mayor producción anual es el Bisfenol A, utilizado para endurecer algunos tipos de plástico. La tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, que es una especie vulnerable, cuya migración pasa por la zona de acumulación de desechos más grande del Pacífico Norte. Esta tortuga presenta una determinación sexual por temperatura (DST). Se ha demostrado que el desarrollo gonadal de especies con DST puede ser susceptible a factores exógenos como las hormonas esteroides. Particularmente en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, los embriones incubados a 26°C se diferencian como machos, mientras que los embriones incubados a 33°C se diferencian como hembras. En esta especie el 17 $\beta$ -estradiol tiene un papel teratogénico al inducir la regresión de los cordones sexuales precursores de la medula ovárica e inducir la proliferación de la corteza ovárica independientemente de la temperatura de incubación. En su hábitat, esta especie marina no se encuentra expuesta al estradiol. Sin embargo, uno de los principales contaminantes de cuerpos de agua salada es el bisfenol A (BPA). En el estudio comprobamos la transferencia de este químico de las tortugas hembras adultas al vitelo de los huevos de la playa, mediante la estandarización de la técnica de cromatografía líquida de alta densidad. Paralelamente, se realizó un estudio de laboratorio con dosis preestablecidas para conocer el efecto del BPA en el desarrollo gonadal de embriones de esta especie, y se analizaron las muestras por microscopía de barrido, Histología de cortes incluidos en EPON e inmunofluorescencia. Se registró una mortalidad elevada y un cambio estructural de la gónada masculina, que presentó una regresión de los cordones medulares y la proliferación del epitelio simple en estratificado. No se presentaron cambios en la gónada a nivel genético.

## INTRODUCCIÓN

Los océanos juegan un papel fundamental para la manutención de los ecosistemas terrestres y marinos en el planeta Tierra, por la gran cantidad de servicios ambientales que proveen. Dentro de ellos destacan la generación de oxígeno, la regulación de la temperatura global y el inicio del ciclo hidrológico. También juegan un papel económico importante, al proveer al ser humano de materia prima, servir como ruta de transporte, y permitir actividades de esparcimiento (Walser 2008).

El residuo más común en estos océanos son los plásticos, y el lugar del globo terráqueo en donde se concentra la mayor cantidad de plásticos es en el Giro del Pacífico Norte, que es un área formada por el vórtice de corrientes marinas en el Océano Pacífico, entre las costas de California y Japón. Estos plásticos, tienen la capacidad de liberar tóxicos que tienen la capacidad de interferir con el sistema endocrino o con cualquier otro órgano de los seres vivos que responda a hormonas, y reciben el nombre de disruptores endócrinos (Barnes *et al.* 2009).

Dentro de este grupo, los más comunes son los que se comportan como estrógenos y reciben el nombre de xenoestrógenos, y contrario a los estrógenos naturales, éstos son difíciles de degradar. El xenoestrógeno registrado para uso por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos que ha generado una mayor controversia es el monómero Bisfenol A (BPA), un tóxico presente en plásticos de uso diario como juguetes, discos compactos, tupperware y biberones, lo que hace que cada año se sinteticen más de 1.7 billones de libras de BPA en Estados Unidos. Se estima que más del 25% de los plásticos presentes en el océano tienen la capacidad de liberar BPA (Derraick 2002).

La mayoría de los estudios de los efectos del BPA se han llevado a cabo en animales de laboratorio, y muy pocos se han centrado en especies silvestres marinas. Los únicos estudios de detección del compuesto llevados a cabo en vertebrados marinos en vida libre se han realizado en peces (Crain *et al.* 2007).

La realización de estudios de este tóxico en animales centinela resulta fundamental para poder comprender el impacto del BPA en el ecosistema marino. Es por eso que el presente estudio fue llevado a cabo en una especie de tortuga marina, por sus cualidades como especie biomonitora.

La tortuga marina elegida para el estudio fue la *Lepidochelys olivacea*, que es una especie vulnerable, cuya migración pasa por la sopa de plástico del Giro del Pacífico Norte, que es la fuente más importante de contaminación marina por BPA (Beavers *et al.* 1996). En el estudio comprobamos la transferencia de este químico de las tortugas hembras adultas al vitelo de los huevos de la playa, mediante una técnica de cromatografía líquida de alta densidad.

Paralelamente, se realizó un estudio de laboratorio con dosis preestablecidas para conocer el efecto del BPA en el desarrollo gonadal de embriones de esta tortuga marina. Esta especie presenta una determinación sexual por temperatura, por lo que este evento es sensible a dosis exógenas de estrógenos.

La presencia de BPA en la tortuga golfinia también puede ser una fuente de contaminación del tóxico para los seres humanos, puesto que los pescadores de las costas de Oaxaca tienen permitida la captura de una tortuga adulta al año por familia, además de que es común la ingesta de sus huevos, aunque esté penado por la ley.

# ANTECEDENTES

## IMPORTANCIA DEL MAR

Los océanos juegan un papel fundamental para la vida en el planeta. No sólo fue el medio marino primitivo en donde se originó la vida hace 3600 millones de años; la supervivencia de las especies que habitan la Tierra así como el equilibrio de los ecosistemas dependen de la salud del océano. De igual manera, desempeña un papel fundamental para el bienestar social y económico de la población humana. Simplemente el 50% de ésta vive en zonas costeras y su supervivencia depende directamente de los recursos marinos (Walser 2008). Desde la aparición de la primera célula, el océano ha evolucionado constantemente. Esta serie de cambios experimentados a través de miles de millones de años han hecho capaz la vida en la tierra. Estas masas de agua que ocupan más del 70% de la superficie del planeta son el sustento de todas las formas de vida que conocemos actualmente (National Oceanic and Atmospheric Administration NOAA 2007).

Los océanos juegan un papel complementario y de similar importancia al de la atmósfera en la determinación del clima del planeta. Éstos almacenan energía térmica, liberándola cuando las temperaturas bajan o transportándola a zonas menos cálidas. Por el contrario, cuando se enfría, genera movimientos que reaprovisionan de calor a la superficie (Walser 2008).

Contrariamente a lo que se creyó durante años, son los océanos y no los bosques los pulmones del mundo. El 80% del oxígeno es producido por el fitoplancton, las algas, las plantas marinas y los arrecifes de coral presentes en el mar. Estos cumplen además con un papel activo en la creación de la capa de ozono, vital para la vida en la tierra (Walser 2008).

El ciclo hidrológico, indispensable para mantener la vida en la Tierra, comienza en los océanos. Sin el agua procedente de los océanos, las condiciones de humedad requeridas por los ecosistemas no podrían ser satisfechas, y por lo tanto la vida no podría mantenerse (Walser 2008).

Los ecosistemas marinos y costeros albergan los hábitats más productivos y valiosos del planeta. Más del 80% de la vida en la tierra se encuentra en el océano, en donde habitan más de 180 000 especies de animales y más de 10 000 especies de plantas.

Esta alta diversidad además de poseer un alto valor biológico *per se*, constituye la mayor fuente de servicios ambientales del planeta (Walser 2008).

Como hemos visto, la vida en el planeta está dada en gran parte por las condiciones del océano, por lo que la degradación de éste último trae consecuencias catastróficas, muchas veces irreversibles, que ponen en riesgo la vida en la Tierra como la conocemos hoy en día. No obstante, la vastedad del océano hizo que por un lado se pensara que sus recursos eran prácticamente infinitos y por otro, que se utilizara durante años como el gran basurero del mundo, depositando desechos y contaminantes industriales y urbanos. Esto conllevó a una explotación no sustentable y destructiva que pasó por alto la fragilidad de sus ecosistemas. El resultado es el cambio ambiental tan acelerado que experimentan los océanos actualmente (Daoji 2004).

La excesiva explotación de los recursos marinos, la alteración o destrucción de los hábitats marinos, y la contaminación procedente de actividades terrestres han tenido una serie de consecuencias: el 70% de las reservas pesqueras del mundo se han agotado o han sido objeto de pesca excesiva. El 75% de las especies que el hombre consume están sobreexplotadas o siendo explotadas al límite de su capacidad. La población de los grandes peces ha disminuido hasta un 90% desde el surgimiento de la pesca industrial. Aproximadamente se ha perdido cerca del 25% de la superficie de los arrecifes de coral. Una enorme cantidad de especies marinas se encuentran en una situación de alerta roja. La gran cantidad de contaminantes arrojados al mar ha duplicado el número de zonas muertas desde 1990. La creciente emisión de CO<sub>2</sub> ha causado que el pH promedio de las aguas marino disminuya en un 30% y la que la concentración de iones de carbonato disminuya en un 16% desde la revolución industrial. La gran cantidad de plásticos industriales vertidos al mar causa la muerte de más de un millón de vertebrados anualmente, además de ocasionar (igual que otros residuos tóxicos) problemas endocrinos, mutaciones y cáncer a vertebrados e invertebrados (Derraik 2002).

De continuar así el futuro de los ecosistemas marinos, así como del resto de los ecosistemas que dependen de éstos, será incierto. Es por esto que la realización de acciones encaminadas a la protección de los océanos resulta impostergable.

De acuerdo con el Fondo para el Medio Ambiente Mundial de Naciones Unidas, la amenaza más grave para los océanos del mundo es la contaminación proveniente de las actividades humanas tanto terrestres como marinas. Fertilizantes, plaguicidas,

desechos industriales, desechos nucleares, basura, drenaje, componentes químicos emitidos a la atmósfera que se trasladan a través de los vientos y recaen en los océanos (como cobre, níquel, mercurio, plomo, cadmio y zinc), combustibles fósiles y sustancias tóxicas usadas en la pesca son solo algunos de los contaminantes que encontramos en los océanos (Singh 2009). Muchos de estos contaminantes son de fabricación reciente (no tienen más de 50 años) por lo que aún se desconoce su toxicidad, así como las repercusiones que tiene en la fauna silvestre marina, así como en los ecosistemas, y finalmente en el hombre, que se alimenta de recursos pesqueros. Es por esto que es urgente tener una mejor idea acerca de las consecuencias a la salud que suponen estar en contacto con estos contaminantes, especialmente si consideramos que su producción va en aumento (Colborn 1993).

Para tener conocimiento del panorama al que nos enfrentamos, es importante conocer qué sustancias tóxicas están presentes en el océano, en qué concentración, qué efecto están teniendo en los organismos acuáticos, así como su distribución.

La enorme superficie de litoral con el que cuenta México hace que este sea un país adecuado para llevar a cabo este tipo de estudios. México cuenta con de 1 964 375km, una plataforma continental de 388 000 km<sup>2</sup>, 15 670 km<sup>2</sup> hectáreas de estuarios y una superficie insular de 5 083 km<sup>2</sup>. El mar territorial abarca alrededor de 231 000 km<sup>2</sup> y la zona económica exclusiva tiene un área de 3 149 920 km<sup>2</sup>; y está rodeado por cuatro mares principales: el Pacífico, el Golfo de California, el Golfo de México y el Caribe (CONABIO 2009).

## TORTUGAS MARINAS

Una forma de aproximarnos a la problemática mencionada en la sección anterior, es utilizando a las tortugas marinas como biomonitores del estado de contaminación del océano. Su amplia distribución geográfica hace que habiten prácticamente todas las cuencas marinas alrededor del mundo (Meylan y Meylan 2011), su complejo ciclo de vida implica la utilización de hábitats tan variados como tierra firme al momento de la ovoposición, de arrecifes de coral durante el apareamiento y mar abierto durante el forrajeo (Frazier 2002). Sumado a lo anterior, su determinación sexual por temperatura, sus migraciones de miles de kilómetros, la gran expectativa de vida que tienen, su posición dentro de la cadena trófica, su fidelidad a los sitios de anidación, su sensibilidad similar a concentraciones de contaminantes iguales o mayores a las reportadas para aves y mamíferos (Hall 1980) las convierten en un excelente modelo de estudio.

Las aguas costeras y pelágicas de México hacen que 6 de las 7 especies de tortugas marinas existentes en el mundo usen playas mexicanas como sitio de anidación. Estos animales pertenecen al orden *Testudines* y dentro del suborden *Cryptodira*. Éste último se divide en dos familias: la *Dermochelyidae*, cuyo único representante es la *Dermochelys coriacea* o laúd, y la familia *Cheloniidae*, que agrupa a las 5 especies restantes de tortugas que visitan nuestras costas: *Lepidochelys olivacea* o golfinia, *Lepidochelys kempii* o lora, *Eretmochelys imbricata* o aplanada, *Natator depressus* o caguama, *Caretta caretta* o verde, y *Chelonia mydas* o prieta. (Witzell 1987, Alvarado et al. 1991, Pritchard 2002, Meylan y Meylan 2011, Mortimer y Plotkin 2000, Márquez 2002).

Además de su papel como especie bioindicadora, este grupo de animales cumple con diversos roles ecológicos necesarios para mantener la salud del océano. Al pertenecer al grupo más antiguo de reptiles, y llevar aproximadamente 200 millones de años en la Tierra, desde el período Jurásico (Márquez 2002), estos animales desempeñan un sin número de funciones para mantener en equilibrio a las poblaciones de medusas, constituir un hábitat para pequeños organismos marinos, mantener en buen estado los arrecifes de coral, ofrecer alimentos proteicos en temporada de anidación, aumentar el reciclaje de nutrientes y mantener en buen estado los lechos de plantas

marinas. Conforme declinan sus poblaciones, declina también su habilidad de llevar a cabo funciones vitales para los ecosistemas marinos.

Esto hace sumamente importante realizar estudios sobre el efecto de la contaminación en estos organismos. Por un lado la salud y tamaño de sus poblaciones se puede extrapolar a la salud del mar y por otro, el conocer los tóxicos a los que están expuestos así como su efecto, permite realizar una proyección del futuro de la especie, que es vital para el mantenimiento de la salud del océano.

Lamentablemente, hoy en día las poblaciones de estas especies, alguna vez abundantes, están declinando a tasas alarmantes de manera global (Pritchard 2002).

Aunque los resultados de las actividades humanas, como la sobreexplotación y la captura incidental, han sido citadas como la principal amenaza en su supervivencia (Hutchinson y Simmonds 1991) sin duda también la contaminación química juega un papel importante en su supervivencia. Existe poca información sobre concentraciones de contaminantes y sus efectos en las poblaciones de especies acuáticas (Ehrhart 1981, Herbst 1994, Herbst y Klein 1995) debido a que la mortalidad resultante de la contaminación marina es una de las más difíciles de estimar de todas las fuentes de mortalidad inducidas por el ser humano (Storelli *et al.* 2007). Este panorama ha hecho que actualmente absolutamente todas las especies de tortugas marinas se encuentren en peligro de extinción o amenazadas (Ekert *et al.* 2000), y por lo tanto se encuentren incluidas en el Apéndice I de la Convención Internacional para el Comercio de Especies de Flora y Fauna Silvestre Amenazada (CITES) y la Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010.

## TORTUGA GOLFINA

La Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es sin duda, la tortuga marina más abundante en el globo. Se distribuye globalmente en regiones tropicales de los océanos Pacífico, Índico y Atlántico. En el Océano Pacífico oriental se observa desde el noroeste de la Península de Baja California y el Golfo de California hasta Chile, teniendo las áreas más importantes de anidación del continente Americano en México y Costa Rica. (Herbst 1994, Márquez 2002).

De acuerdo con datos provenientes de su zona de anidación, se estima que la población de esta especie ha sufrido un decremento de hasta un 37%. (Abreu-Grobois y Plotkin, 2008). Su gran abundancia en las playas de anidación favoreció su explotación por parte de la población costera. Esta pesca comercial creció de forma exponencial de 1940 a 1970, por lo que el gobierno mexicano tuvo que implementar una serie de medidas para su recuperación, como vedas temporales y sanciones (Cliffton *et al.* 1982). Sin embargo, no fue sino hasta que el gobierno declaró una veda permanente en 1990, después de encontrarse con poblaciones locales extintas, junto con actividades encaminadas a su investigación y a su conservación, que la población de las tortugas golfinas empezó a recuperarse (Peñaflores-Salazar *et al.* 2001).

El Santuario "La Escobilla", que es la principal playa de anidación de *Lepidochelys olivacea* de México y del mundo, registró un aumento de 55,000 nidos en 1988 a más de 700,000 nidos para 1994 (Márquez *et al.* 1996) y a más de 1 000 000 de nidos para el año 2000 (Márquez *et al.* 2005). Incluso las tortugas de esta especie comenzaron a anidar en una playa del estado de Michoacán en donde anteriormente no se tenía registro de anidaciones previas por parte de *L. olivacea* (Sánchez y Reyes 1998).

De todas las tortugas marinas es la única catalogada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), como vulnerable, y no como en peligro de extinción. Sin embargo, esta tortuga aún afronta día con día diversas amenazas como la captura incidental en pesca de arrastre, la captura clandestina tanto de ejemplares adultos como de sus huevos, el cambio climático global, y la contaminación química del océano. Esto último es importante, ya que al ser una tortuga netamente carnívora, su pico agudo y fuerte, es una herramienta que le permite aprovechar tanto

organismos del fondo como de la superficie; lo que la hace más susceptible a la contaminación. Dentro de su dieta encontramos esponjas, cangrejos, camarones, langostas, medusas y pescado, lo que puede promover la bio acumulación de los contaminantes ingeridos por sus presas. Su dieta en la fase juvenil cambia drásticamente según su localización. En aguas oceánicas se alimenta de organismos pelágicos como langostillas y huevos de peces, mientras que en aguas costeras se alimentan de crustáceos, moluscos, peces y salpas (Montenegro et al 1986).

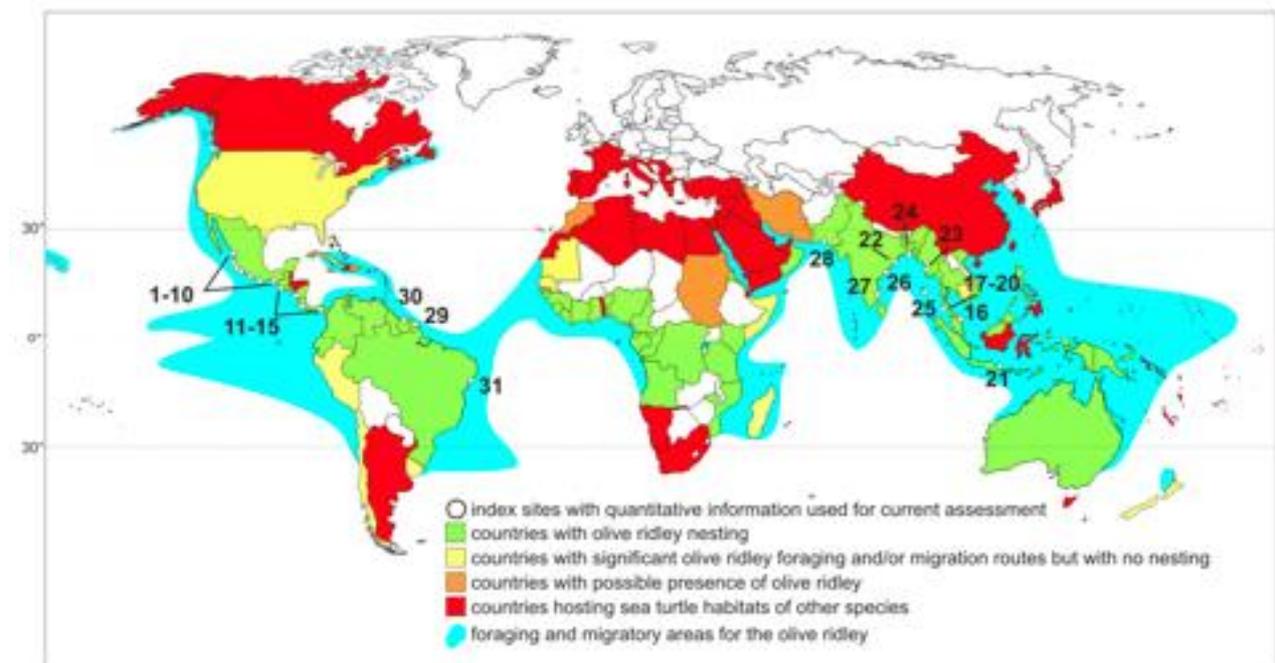
La amplia distribución que presenta la *Lepidochelys olivacea* en el globo terráqueo, su longevidad, sus hábitos alimenticios y su estado de conservación, además de 30 años de estudio sobre la biología de la especie, constituye un excelente modelo para estudiar el efecto de la contaminación del océano en los seres vivos.

## MIGRACIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA

Para conocer los posibles contaminantes a la que esta tortuga está expuesta, es fundamental conocer su ruta migratoria, para identificar las zonas de alimentación, así como los sitios en el mar altamente contaminados por plástico, para encontrar los lugares de traslape. A continuación se presenta una revisión de toda la literatura que habla acerca de su distribución.

La lista roja de la IUCN (2011) reporta la distribución de esta especie en el mundo (figura 1).

Figura 1. Mapa de distribución de *Lepidochelys olivacea* según la ICUN.



No obstante, existen estudios que muestran que el área de forrajeo y migración para la *L. olivacea* en el Océano Pacífico Tropical del Este (zona de distribución de las poblaciones mexicanas) es mucho más extensa, como se verá a continuación.

Aunque todas las especies de tortugas marinas comparten un ciclo de vida, que abarca gran parte del período de desarrollo en el mar abierto, la *Lepidochelys olivacea* junto con la *Dermodochelys coriacea* constituyen las especies más pelágicas. Esto dificulta el poder realizar una documentación de su trayectoria por lo que muchos años el período desde que las tortugas recién nacidas se adentraban al mar hasta que

las hembras regresaban a desovar se conocía como los "años perdidos" (Paolo Luschi *et al.* 2003). La zona ocupada por las tortugas se infería de los resultados obtenidos de los registros de recaptura (René Márquez *et al.* 1976). En la década de los 90, estudios de telemetría dieron a conocer la ruta de migración de algunos ejemplares adultos y un estudio realizado por Jeffrey J. Polovina (2004) se centró en juveniles. Sin embargo, el uso de telemetría no es posible en crías de tortuga por lo que este período sigue siendo el menos estudiado.

#### Crías:

Por crías se entiende a las tortugas que conservan la cicatriz umbilical (Márquez *et al.*, 1976). Las crías después de nacer se dirigen a la playa y son acarreadas por las corrientes marinas hasta llegar a sus "nursery habitats" en donde pasan varios años. Estos movimientos a la deriva en las corrientes les proporcionan alimento y disminuyen el riesgo de ser ingeridos por algún depredador, dado que en su mayoría se encuentran en la costa (Paolo Luschi *et al.* 2003). Probablemente el hábitat de alimentación de las crías se encuentra en el Océano Pacífico Tropical del Este que corresponde a la región comprendida entre los 25°N-20°S y del continente americano a los 140°W. (Beavers *et al.* 1996).

#### Juveniles:

Se consideran juveniles aquellas tortugas cuya cicatriz umbilical sea imperceptible, hasta los 30 cm de longitud del caparazón, y que aún conservan huellas de las quillas en los escudos dorsales y abdominales. (Márquez *et al.* 1976).

Un estudio llevado a cabo por Jeffrey J. Polovina (2004) en Hawaii siguió la trayectoria de 10 juveniles de *L. olivacea* en su trayectoria por el Pacífico Norte. En este estudio, por medio de técnicas genéticas se demostró que 6 de las 10 tortugas tenían su origen en poblaciones del Pacífico Este, lo que nos dice que tanto las tortugas del este como las del oeste se alimentan juntas en el Giro del Pacífico Norte. Dos de las tortugas provenientes del este eran probablemente sexualmente maduras, por lo que probablemente los juveniles y adultos compartan el área de alimentación.

No obstante, las tortugas golfinas provenientes del Pacífico Oeste pasan más tiempo en las corrientes oceánicas mayores, como la esquina sur del KEC, la corriente norecuatorial y la contracorriente ecuatorial (ECC). Las tortugas del este no muestran signos de haber utilizado estos hábitats, por lo que las diferentes poblaciones pueden

ocupar diferentes hábitats dentro del Gyro Subtropical. (Polovina *et al* 2004). La distribución de este grupo de *L. olivacea* se encuentra entre los 8-31°N, en áreas cuya temperatura osciló entre los 23°C y 28°C. La trayectoria de algunas tortugas indica que probablemente migran estacionalmente de norte a sur.

Existe evidencia de que a medida que los juveniles van creciendo, dejan de ser totalmente dependientes de las corrientes marinas y pueden nadar en contra de ésta para encontrar sus hábitats de forrajeo (Luschi *et al.* 2003). Los juveniles tardíos empiezan a acercarse a la zona nerítica, cerca de la playa donde nacieron. La trayectoria que realizan para corregir los miles de kilómetros que se dirigieron a la deriva es realizada de manera activa, a veces ayudados por los giros pero la evidencia sugiere que la mayoría de las veces las tortugas nadan de manera activa (Paolo Luschi *et al.* 2003).

Sub-adultos y adultos:

Los subadultos son ejemplares que presentan todas las características de un adulto, pero no están aún en etapa reproductiva y la talla del caparazón generalmente es mejor a los 55 cms. Los adultos han iniciado la etapa reproductiva y generalmente poseen un caparazón mayor a los 55 cms. (Márquez *et al.* 1976).

Sin duda, la fase más conocida de la *L. olivacea* es la de la tortuga adulta. Esta especie, a diferencia de la mayoría de las tortugas marinas, en vez de dirigirse a un sitio de alimentación definido tras la puesta, tiende a comportarse de igual manera que los juveniles. Esto es, realiza movimientos errantes a través de miles de kilómetros (Luschi *et al.* 2003), lo que sugiere que pueden compartir el área de alimentación con tortugas más jóvenes.

René Márquez (1976) señala que de acuerdo a los registros de recaptura de las tortugas adultas, pueden existir subpoblaciones definidas por las áreas de anidación, y que una vez terminada la época de reproducción se dirijan a sus áreas de alimentación que se encuentran al norte y sur de México hasta Centro América. Según este autor es posible que la subpoblación de Oaxaca se dirija hacia el sur hasta América Central y la de Guerrero y Jalisco hacia el norte, hasta la Península de Baja California internándose en el Golfo de California y al Oeste de la Península. No se ha determinado el grado de mezcla de estas subpoblaciones en el área de alimentación. Se han observado colonias de adultos que permanecen en áreas cercanas al sitio de reproducción durante todo el año.

Plotkin señala que la *L. olivacea* en el Océano Pacífico Tropical del Este se distribuye ampliamente en la zona pelágica desde México hasta Perú y que no siguen ningún corredor específico. Su estudio de telemetría demuestra también, que las tortugas golfinas del Océano Pacífico Tropical del Este pueden cambiar sus patrones de migración como adaptación a los cambios del ambiente como es el caso del evento climático El Niño. De acuerdo con la investigadora, el patrón migratorio de hembras y machos es muy similar, y ninguno de los 2 muestra algún tipo de fidelidad por un área específica. (Plotkin 2010).

Los resultados telemétricos de Beavers, que siguieron a un macho adulto en el océano Pacífico Tropical del Este, muestran que el ejemplar se desplazó durante casi 4 meses por la región comprendida entre los 5°N-20°N y del continente a más allá de los 120°W. Los autores no especifican el origen de la tortuga. Esta trayectoria estuvo influenciada por la corriente norecuatorial (NEC) que fluye hacia el este entre los 10°N-20°N y la contracorriente norecuatorial (NEC) que fluye al este entre los 4°N-10°N, y por la corriente de California, que penetra al Pacífico Tropical del Este de diciembre a abril a los 10°N-20°N. (Beavers *et al.* 1996).

Por su parte, Peter Etnoyera señala que hay reportes de grandes grupos de *L. olivacea* en el Océano Pacífico Tropical del Este hasta los 120°W. La telemetría que realizaron muestra como la tortuga *L. olivacea* "Manuela" se desplazó entre los 110°W y 118°W, y los 20°N y 28°N (Etnoyera *et al.* 2005). El estudio tampoco indica el lugar de origen de los ejemplares encontrados en las redes ni el de la tortuga que siguieron.

Finalmente, Páez-Osuna en su estudio de plomo en *L. olivacea* del Pacífico del Este, señala que la especie se distribuye desde las costas de centroamérica y sur de México hasta los 120° W. Sin embargo, no indica cómo fue que obtuvo el área de forrajeo y distribución de esta especie (Páez-Osuna *et al.*, 2010).

Contrariamente, el estudio realizado por Yonat Swimmer para determinar la trayectoria seguida por tortugas *L. olivacea* de Costa Rica muestra que éstas tienen una distribución muy restringida. El uso de pop-off satellite archival tags (PSAT) permitió determinar las trayectorias más probables seguidas por estas tortugas. Los resultados señalan que el 36% de las tortugas se encontraban en el Domo de Costa Rica, cerca de los 8-10°N y los 88-90°W. Estas aguas se caracterizan por tener una cantidad de alimento para las tortugas. (Yonat Swimmer *et al.* 2009).

Hacen falta estudios con tecnologías novedosas como los isótopos radioactivos para poder conocer con certeza la distribución de *Lepidochelys olivacea* durante su ciclo de vida. De los artículos revisados podemos concluir que el área de distribución de la L. olivacea proveniente de las costas mexicanas se encuentra en el Pacífico tropical del Este, que se encuentra entre los 28°N-20°S y del continente hasta los 140°W. Esta zona concuerda con la zona de acumulación de desechos plásticos marinos del Pacífico Norte (consultar capítulo siguiente) (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Distribución de la tortuga golfina en el Océano Pacífico.

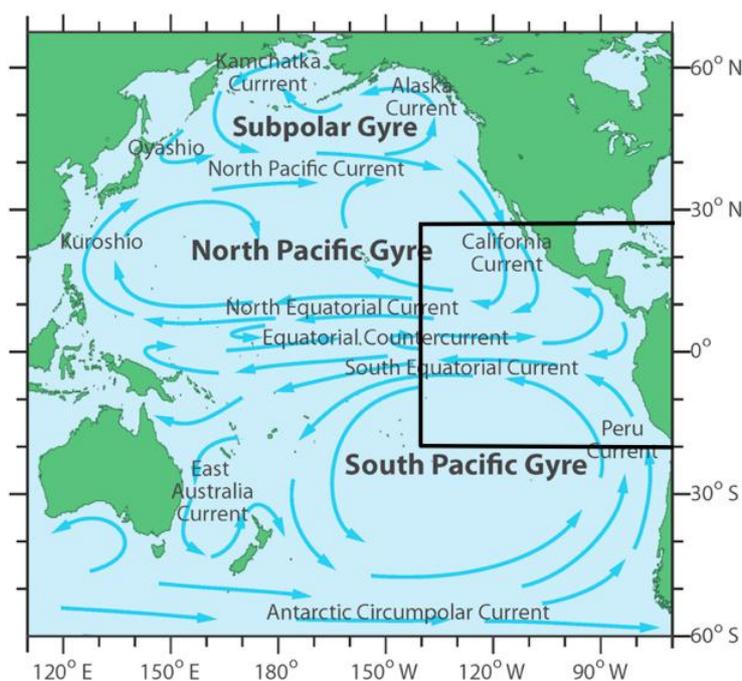
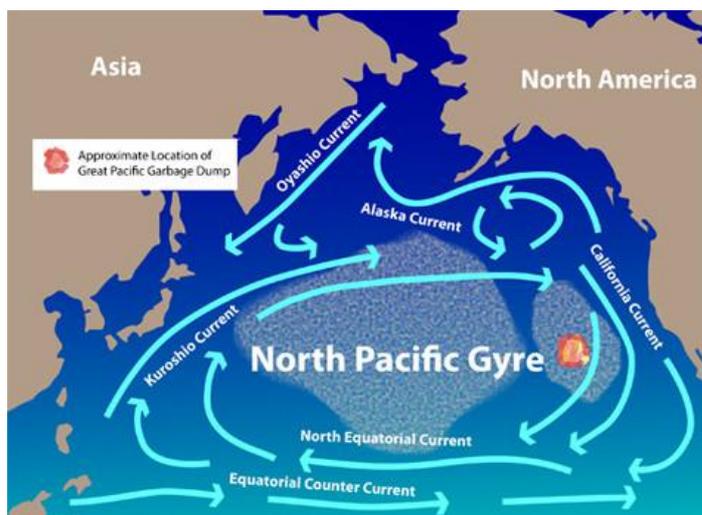


Figura 3. Probable distribución de los desechos plásticos en el Océano Pacífico.



## EL PLÁSTICO EN EL MAR

La demanda mundial de plásticos ha aumentado constantemente a lo largo de los últimos años y en la actualidad se sitúa en alrededor de 245 millones de toneladas anuales. (Barnes *et al.* 2009) En Estados Unidos, entre 1970 y 2003 los plásticos se convirtieron en el segmento de residuos municipales de más rápido crecimiento, con un aumento de 9 veces (James 2008).

Como resultado, estos polímeros sintéticos, han estado entrando en el medio ambiente marino en cantidades paralelas a su nivel de producción durante el último medio siglo. Sin embargo, en las últimas tres décadas, la tasa de deposición se ha acelerado más allá de la tasa de producción, y los plásticos son ahora uno de los contaminantes más comunes y persistentes en las aguas del océano y playas de todo el mundo (James 2008).

Desde 1970 existe una preocupación por la cantidad de desechos marinos en el océano, por lo que se ha vuelto un tema clave para la biología de la conservación de ecosistemas marinos. Estos estudios muestran cómo incluso en la Antártida se existen desechos plásticos (Zarfl y Matthies, 2010)

Los desechos marinos pueden consistir en plástico, vidrio, metales, espuma de poliestireno, caucho, equipos de pesca abandonados y buques abandonados. Los plásticos son el tipo predominante de desechos marinos y representan entre el 60% y el 80% del total de los desechos marinos en los océanos del mundo, alcanzando niveles de hasta 95% en algunos sitios (EPA act 2011).

Los desechos marinos pueden degradar los hábitats oceánicos, amenazar fauna marina y costera, interferir con la navegación, resultar en pérdidas económicas y amenazar la salud y seguridad humana (EPA act 2011).

Actualmente, el Giro del Pacífico Norte es en donde se concentra la mayor cantidad de estos desechos marinos plásticos, en particular entre los 20oN y 40oN, entre las aguas tropicales y subárticas. Esta área de desechos concentrados se divide en dos zonas de acumulación: el parche de basura de oriente que ocurre fuera de Japón y el parche de basura de occidente, entre Hawaii y California (EPA act 2011).

El tamaño de los parches de desechos es difícil de calcular porque están en continuo movimiento por lo que la distribución y la cantidad de los desechos no está bien

cuantificada. Sin embargo, se estima que contienen 100 millones de toneladas de basura; la mayoría de los desechos se encuentra por debajo de la superficie del agua y se extiende en profundidad hasta los 30 metros (EPA act 2011).

Aproximadamente la mitad de los desechos plásticos flotan y permanecen cerca de la superficie del océano. Con el tiempo, y conforme se van desintegrando en plásticos más pequeños, organismos y sedimentos se les agregan, aumentando el peso de las partículas lo que puede causar que se hundan y eventualmente alcancen el fondo del océano. La otra mitad de los plásticos no flota por lo que se va directamente al fondo del mar. La mayoría de los estudios ha explorado la acumulación de plástico por hasta 30 metros debajo de la superficie del océano (EPA act 2011). La remoción de estos plásticos resulta imposible con tecnologías actuales, dado que el sol fotodegrada al plástico en pedazos cada vez más pequeños, que alcanzan el tamaño del plancton; hoy en día existen lugares en el océano en donde la proporción plástico: plancton es de 6:1. Esto hace imposible su limpieza puesto que filtrarlos implicaría retirar junto con ellos el plancton, y terminar con la productividad primaria del océano. Esto trae como resultado que muchos animales consuman enormes cantidades de plástico diariamente.

El transporte de los desechos marinos, especialmente de plásticos, constituye por sí mismo un mecanismo de transporte de compuestos orgánicos persistentes. Los plásticos son polímeros hechos por el hombre que pueden contener otros contaminantes orgánicos como ftalatos y fenoles incluyendo el BPA. Adicionalmente, los plásticos tienen alta habilidad para el almacenamiento de contaminantes hidrofóbicos como PAHs, PCBs y DDT, por lo que la red trófica podría estar afectada en su totalidad por la presencia de plásticos en el océano. (EPA 2011). Estos químicos pueden penetrar en las células, interactuar químicamente con moléculas biológicas importantes y pueden causar una alteración del sistema endocrino (Foster 2006).

## EL BISFENOL A

Algunos de los contaminantes encontrados en los plásticos tienen esta capacidad de alterar el desarrollo y funcionamiento del sistema endocrino así como el de los órganos que responden a las señales endocrinas. Los efectos de estos disruptores endocrinos pueden ser irreversibles y permanentes y pueden ser transmitidos verticalmente. Los que tienen la capacidad de comportarse como estrógenos reciben el nombre de xenoestrógenos, ecoestrógenos o estrógenos ambientales (Jones *et al.*, 2000, Brion *et al.* 2002).

Los organismos son más susceptibles en etapa de embrión temprano, feto o neonatos.

Algunos de los efectos reportados en fauna silvestre han tenido como efecto una función anormal de la tiroides en aves y peces, disminución de la fertilidad en peces, aves y mamíferos, alteración del sistema inmune en aves y mamíferos (Crain 2007).

Sus efectos pueden manifestarse en formas totalmente diferentes dependiendo de la especie, edad y estado fisiológico o pueden manifestarse hasta que el individuo llegue al estado adulto, aunque haya sido expuesto al disruptor en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Dentro de estos compuestos, los más comunes son los que mimetizan la acción de los estrógenos, al unirse a receptores estrogénicos y tener la capacidad de inducir respuestas similares a las producidas por la hormona 17β estradiol. Es por esto que reciben el nombre de xenoestrógenos (Jones *et al.* 2000 Brion *et al.* 2002).

A diferencia de los estrógenos naturales, los xenoestrógenos son difíciles de degradar, por lo que se acumulan en los animales; de la misma forma, tienen un periodo de vida largo que les permite permanecer en el ambiente por mucho tiempo; y al ser lipofílicos, tienen la capacidad de almacenarse en el tejido graso y de esta forma bioacumularse a lo largo de la red trófica (Facemire, 2000). Estas sustancias ya se han encontrado en zonas en donde nunca se han utilizado debido a su traslado mediante el aire, el agua y los animales y plantas (Zhu y Norstrom 1993, Facemire, 2000).

Se sabe que los compuestos xenoestrogénicos se acumulan en la superficie del mar (Obbard 2006). Debido a esto, algunos plastificantes de ftalato han sido prohibidos por la Comisión Europea (Andrady 2005), y numerosos estudios han encontrado

efectos nocivos de otro plastificante común, el bisfenol-A. (Vom Saal y Welshons 2005).

Al menos el 25% de los desechos marinos plásticos tiene la capacidad de liberar BPA.

Se ha observado que la biodegradación de los polímeros de plástico por microorganismos introduce BPA en el agua salada (Artham y Doble 2009). Otro estudio señala que cuando los plásticos de policarbonato se exponen a las sales en el agua de mar, comienzan a desprender BPA de forma acelerada (Sajiki y Yonekubo, 2003). Otra fuente de contaminación del ambiente marino con BPA está constituida por los lixivados provenientes de los vertederos, y es mayor en el continente asiático (Saquing *et al.* 2009). Concentraciones significativas de BPA han sido detectadas en muestras del Gyro del Pacífico Norte. (Saquing *et al.* 2009)

Este compuesto orgánico con 2 grupos funcionales fenol fue desarrollado en Rusia en 1891 y actualmente es un componente clave para la manufactura de plásticos, resinas epoxy y policarbonato de plástico. Tan sólo en Estados Unidos, más de 1 millón de toneladas de BPA son sintetizadas y utilizadas cada año (EPA act 2011).

Desde la década de los 90 se comprobó la actividad estrogénica del BPA, así como la liberación de esta sustancia de los plásticos 3 y 7 cuando son expuestos a una fuente de calor (EPA act 2011).

El principal mecanismo de acción del BPA es el acoplamiento directo a los receptores de estradiol. Sin embargo a través de 3 mecanismos secundarios esta sustancia es capaz de elevar los niveles de estrógeno del organismo. Primero, el BPA estimula la acumulación de RNA mensajero para los receptores de estrógenos. Segundo, el BPA tiene la capacidad de separar al 17B estradiol de su proteína acarreadora, situación que eleva la disponibilidad endógena de los estrógenos. Finalmente, el BPA inhibe la expresión del 17B estradiol endógeno (Krishnan 1993).

El efecto del BPA en un organismo depende de la cantidad del xenobiótico, la etapa fisiológica en la que los organismos estuvieron en contacto con él, y el tiempo durante el cual los individuos estuvieron en contacto con la fuente de exposición. Los efectos identificados en especies silvestres incluyen la alteración de la determinación sexual debido a una exposición durante la organogénesis de las gónadas; la alteración de la función gonadal debido a una exposición durante y después de la organogénesis de las gónadas; y la producción de vitelogenina hepática tras la exposición de individuos totalmente organizados (Voom Saal 2006).

El BPA, aunque tiene una vida media corta se considera persistente debido a su continua disposición (EPA act, 2011). Es bioacumulable debido a que la concentración en los organismos que ocupan eslabones más altos en la red trófica es mayor que la del ambiente que los rodea. Esto se debe a su absorción a través de sus alimentos.

Tiene una toxicidad individual. Se ha encontrado en tejidos de animales, hasta en concentraciones de 15µg/Kg.

En la vida silvestre se han hecho una gran cantidad de estudios con dosis conocidas para observar el efecto que tiene el BPA en peces y anfibios, y se ha observado tanto un efecto de disruptor endócrino (Alteración de la determinación del sexo, alteración función gonadal, producción hepática de vitelogenina) como teratogénico (microcefalia, longitud corporal disminuida, edema, escoliosis). La mayoría de estos últimos ocurren a dosis poco probables de suceder en el ambiente. (Crain 2007).

El único estudio realizado en reptiles es en el cocodrilo *Caiman latirostris*, en donde la aplicación de 9mg de BPA por huevo, a huevos incubados a temperatura masculinizante generó una reversión sexual (Stoker 2003 y 2007).

El único estudio que reporta tasas de mortalidad es en animales silvestres es en caracoles, en donde los caracoles hembra expuestos al BPA tienen una mortalidad del 13.3% al 15.7%, en comparación a la mortalidad de 3.8% del control (Oehlmann 2006).

La liberación de BPA supone un grave problema para las redes tróficas del océano. Algunos de los animales que corren un mayor riesgo son las tortugas marinas, pues se distribuyen en aguas tropicales y subtropicales, con algunas especies presentes en la zona de convergencia del Pacífico. Las tortugas marinas no parecen distinguir entre el plástico y las presas naturales por lo que ingieren gran cantidad de los primeros. (Lutz 1990). Además de la ingestión directa de los plásticos, las tortugas ingieren otras presas como zooplancton crustáceo, que se ha demostrado que no distingue entre algas y perlas de poliestireno (Bern 1990). Esto puede repercutir el futuro de la especie considerando que exposiciones cortas a BPA pueden tener efectos permanentes en el desarrollo de los organismos acuáticos, especialmente en el tiempo de las ventanas críticas.

Las tortugas marinas adultas podrían no acumular concentraciones letales de estos contaminantes, pero la transferencia de los contaminantes acumulados durante la vida de una tortuga hembra hacia los huevos podría alcanzar niveles que comprometan el desarrollo del embrión.

Existen estudios que han medido concentraciones de BPA en la dieta de *Lepidochelys olivacea* como camarón (Basheer *et al.* 2004), peces (Belfroid *et al.* 2002), cangrejo (Basheer *et al.* 2004), calamar (Basheer *et al.* 2004) y almeja (Heinonen *et al.*, 2002).

La dieta y la ingesta de agua puede conllevar a la acumulación de BPA en el tejido adiposo (Corsolini *et al.* 2000).

## TRANSMISIÓN MATERNA DE CONTAMINANTES

En especies ovíparas, las hembras comúnmente transmiten parte de la carga de contaminantes a sus huevos debido al carácter lipofílico de los contaminantes. Todas las sustancias detectadas en sangre de *Dermochelys* también se encontraron en los huevos, confirmando la transmisión materna en tortugas marinas. Esto causa preocupación con contaminantes orgánicos persistentes que han mostrado afectar etapas tempranas sensibles y con ello la viabilidad de la descendencia de muchos reptiles. (Guirlet 2010, Raushenberg *et al.* 2002).

Al ser consumidos por los adultos, los contaminantes alcanzan el tejido adiposo vía el torrente sanguíneo y son acumulados (Corsolini *et al.* 2000). Una vez que estas sustancias son ingeridas, pueden ser eliminadas o transformadas en otros compuestos más o menos tóxicos, como es el caso de los compuestos hidrosolubles. Por otro lado pueden ser almacenados en los tejidos, en el caso de los compuestos liposolubles. Estos compuestos son almacenados en el tejido graso principalmente. Esto ocurre porque el producto químico se absorbe más rápido de lo que se puede metabolizar o excretar, o porque no puede ser metabolizado, o es metabolizado y los productos de degradación no se pueden eliminar (Beek *et al.* 2000). Su carácter lipofílico es lo que hace que se mantenga en los tejidos grasos de los organismos como el tejido adiposo, el hígado y el cerebro.

Las reservas lipídicas se movilizan en períodos de alta demanda de energía y de ayuno, y con ello los tóxicos presentes en el tejido adiposo. La temporada de reproducción requiere de mucha energía debido a la vitelogénesis, a la migración y al enorme esfuerzo de producir y poner huevos. Se piensa además que las tortugas pueden sobrellevar este período sin ingesta de alimento o con una ingesta muy pequeña, lo que incrementa la movilización de estos contaminantes (Debiec *et al.*, 2006).

La vitelogénesis es el proceso mediante el cual las proteínas y los lípidos se almacenan progresivamente en los ovocitos de los animales ovíparos, generando el vitelo de los huevos (Guraya 1989). El principal compuesto involucrado en este proceso es la vitelogenina (VTG), una proteína relativamente grande (205kDa) que se sintetiza en el hígado y es transportada vía plasma al ovario (Heck *et al.* 1997). La VTG lleva lípidos (principalmente triglicéridos) a los ovocitos que se están desarrollando.

Esta inversión inicial de nutrientes a través de la transferencia materna durante la formación del huevo, es de gran importancia para el desarrollo óptimo de las crías (Hopkins *et al.* 2004, Roe *et al.* 2004). Es aquí también, donde los contaminantes lipofílicos son movilizados y transferidos al huevo en desarrollo. (Bowden *et al.* 2004), lo que puede comprometer la salud embrionaria o juvenil, así como su viabilidad (Keller *et al.* 2004a, Keller y McClellan- Green 2004, Keller *et al.* 2006). Se sabe, además, que en los organismos ovíparos, las etapas tempranas de desarrollo son más sensibles a los contaminantes químicos que los adultos (Russell *et al.* 1999).

La formación de los huevos ocurre cuando las hembras se encuentran en aguas pelágicas entre 4 y 5 meses antes de llegar a los sitios de anidación. Los contaminantes presentes en los huevos representan la contaminación en sus reservas lipídicas y por lo tanto representan la contaminación acumulada durante su forrajeo.(Fossette *et al.* 2007, Caut *et al.* 2008).

La exposición a contaminantes por las tortugas marinas puede variar de acuerdo al nivel de contaminación y al tiempo que pasan en las áreas de forrajeo. Las tortugas pueden forrajear por algunos años entre dos períodos reproductivos y se conoce como el intervalo remigratorio. Entre más largo sea este intervalo, mayor es la acumulación de contaminantes. Algunas tortugas se alimentan en sitios más contaminados que otras (Rivalan *et al.* 2005).

Existen numerosas referencias de la transferencia materna de diferentes contaminantes en tortugas como PBCs, OCs, metales pesados y HAPs (Bárcenas 2009). No se han llevado a cabo estudios de la transmisión materna de BPA en tortugas, pero en aves está reportado que existe, aunque es baja. No obstante se sabe que en aves la transmisión materna de contaminantes fácilmente metabolizables es baja (Hallidin 2001).

La *Lepidochelys olivacea* es una de las tortugas más pelágicas por lo que recorre miles de kilómetros durante su migración, facilitando la exposición a varios tóxicos ambientales (Ward y Lafferty 2004).

## DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA

En aves y mamíferos, la determinación sexual se establece en el momento de la fertilización, debido a la presencia de los cromosomas sexuales. En contraste, la mayoría de los reptiles carecen de cromosomas sexuales (Pieau, 1996, Koopman 2001) y en ellos, la temperatura de incubación durante un periodo crítico de desarrollo embrionario, conocido como periodo sensible a la temperatura (PST), es el factor que determina el sexo de los embriones. Este proceso se conoce como determinación sexual dependiente de la temperatura (DST) (Bull 1980, Pieau & Dorizzi 2004).

La diferenciación sexual en las 7 especies de tortugas marinas es gobernada por la temperatura. Desvanes y colaboradores (1993) demostraron que la actividad de la aromatasa es influenciada por la temperatura en la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) en donde temperaturas altas incrementan su actividad y resultan en crías hembras.

Se ha demostrado que el desarrollo gonadal de especies con DST puede ser susceptible a factores exógenos como las hormonas esteroides. Particularmente en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, los embriones incubados a 26°C se diferencian como machos, mientras que los embriones incubados a 33°C se diferencian como hembras. La exposición a estrógenos en estudios de laboratorio, ocasionó una reversión en el sexo de esta especie que fueron incubadas a temperaturas que usualmente resultan en la producción de machos (Merchant-Larios *et al.* 1997). El 17 $\beta$ -estradiol tiene un papel teratogénico al inducir la regresión de los cordones sexuales precursores de la medula ovárica e inducir la proliferación de la corteza ovárica independientemente de la temperatura de incubación. En su hábitat, esta especie marina no se encuentra expuesta al estradiol sin embargo, uno de los principales contaminantes de cuerpos de agua salada es el bisfenol A (BPA).

El único estudio del efecto del BPA que se ha llevado a cabo en especies cuya determinación sexual esté dado por la temperatura es en el *Caiman latirosis*, que es un caimán endémico de las regiones subtropicales y tropicales de sudamérica. Su distribución restringida hace que por el contrario de lo que sucede con las tortugas marinas, estos animales no estén en contacto tan directo con la fuente de exposición. Los resultados de este estudio muestran que embriones adicionados con distintas dosis de BPA a temperatura masculinizante presentan desde una apariencia

desorganizada en los túbulos seminíferos, así como lumen vacío y perímetros incrementados, hasta una reversión sexual al 100%.

## REPRODUCCIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA

Las tortugas marinas son organismos de lento crecimiento y maduración sexual tardía ya que pueden pasar hasta 40 años antes de alcanzar esta madurez, y pueden pasar 10 años adicionales antes de su reproducción. (Frazier 1999, Márquez 2002). La *Lepidochelys olivacea* se considera que ha alcanzado la madurez sexual cuando alcanza una longitud de 60 cm, esto se alcanza entre los 10 y 18 años, con un promedio de 13 (Zug *et al.* 2006). Se sabe muy poco acerca del desarrollo en la pubertad, el momento de la maduración reproductiva, la aparición de características sexuales secundarias o, incluso, las concentraciones de estrógeno en plasma de tortugas inmaduras. (Lutz *et al.* 1996).

El cortejo y la cópula se dan en el mar, por lo general cerca de la costa, este ocurre durante la primavera e inicios del verano. La hembra puede almacenar el esperma del macho y usarlo a lo largo de la época de apareamiento.

En general las tortugas marinas no se reproducen cada año. El intervalo de remigración a desovar varía de una especie a otra, que generalmente que va de 1 a 9 años dependiendo la especie. La periodicidad reproductiva parece relacionarse con un ciclo de acumulación, eliminación, reorganización y uso de energía, el cual no está ampliamente documentado (Lutz *et al.* 1996). Las tortugas permanecen en sus áreas de alimentación a lo largo de un número variable de años, el cual en parte depende de la cantidad y calidad de alimento disponible (Bjorndal 1980), acumulando reservas de energía requeridas para hacer posible la vitelogénesis.

El periodo de reproducción ocurre después de la acumulación de reservas de grasa (uno o varios años), finalización de la vitelogénesis (10 a 12 meses) y desplazamiento a las áreas de apareamiento y anidación (de unos días a unos meses) (Stearns 1989).

La ovoposición se presenta de junio a diciembre, cuando miles de hembras llegan simultáneamente a las mismas costas a desovar, fenómeno conocido como arribada, en donde se llegan a reunir más de 100 mil hembras. Las hembras salen a una distancia no mayor de 50m sobre la playa, y desovan en un nido de 30 a 55 cm de profundidad, durante las noches, frecuentemente cuando la luna está en cuarto creciente o cuarto menguante. El número de huevos depositados por nidada puede ser de hasta 160, con una media de alrededor de 105, esto puede variar entre

localidades. Los huevos son de color blanco y de forma esférica con diámetro de 3.2 a 4.7 cm (Márquez 1990).

Tanto en el periodo de apareamiento como en la reproducción, las tortugas marinas se concentran espacial y temporalmente. Una hembra generalmente anida varias veces durante una temporada, el número promedio de nidadas es de dos a seis.

La estabilidad de una población depende de una proporción sexual adecuada. Un número reducido de hembras podría resultar en la producción de menos descendientes, mientras que pocos machos redundarían en menos apareamientos y una disminución en la fertilización.

En las tortugas marinas los efectos adversos en la reproducción son difíciles de investigar por razones logísticas. Los adultos son vistos rara vez, excepto cuando las hembras anidan. Es posible, además, que las tortugas con problemas reproductivos no visiten las playas de anidación y, por lo tanto, no son muestreadas. Por otro lado, el número de hembras anidantes ha disminuido en algunas poblaciones pero esta disminución originalmente se adjudicó a la pesca. Sin embargo, después de esfuerzos conservacionistas que prohibieron la pesca, algunas poblaciones siguen disminuyendo, como la de la tortuga lora (Turtle Expert Working Group TEWG 2000). Es por eso que los contaminantes deben de ser investigados como posible causa de esta disminución.

## OBJETIVO

### Objetivo general

El objetivo de este estudio es determinar el efecto del Bisfenol A suministrado experimentalmente en la diferenciación gonadal embrionaria de *Lepidochelys olivacea* y cuantificar los niveles de BPA presentes en los huevos de *Lepidochelys olivacea* de poblaciones naturales.

### Objetivos particulares

1. Cuantificar los niveles basales de Bisfenol A (BPA) en huevos de poblaciones naturales de *L. olivácea*.
2. Determinar el efecto del BPA en la diferenciación gonadal en *Lepidochelys olivácea*.

## HIPÓTESIS

El Bisfenol A interfiere en la diferenciación gonadal embrionaria de *Lepidochelys olivacea*. Además, existe la transmisión madre-cría de BPA en la *Lepidochelys olivacea*.

## JUSTIFICACIÓN

Es impostergable la realización de estudios para evaluar el efecto de los tóxicos presentes en los ecosistemas marinos. Los océanos cumplen con un papel ecológico fundamental para mantener la vida en la tierra y cumplen igualmente con un papel económico del cual depende un porcentaje importante de la población humana (consultar introducción). De acuerdo con el Fondo Para el Medio Ambiente Mundial la amenaza más grande de los mares es la contaminación química. Los plásticos liberan tóxicos como el BPA, que es un contaminante muy común en el agua salada por lo que es necesario estudiar lo que está pasando en la red trófica. Las tortugas cumplen con una serie de roles ecológicos del que dependen muchas otras especies, y al mismo tiempo pueden servir como biomonitores del estado de conservación del océano. Todas ellas se encuentran en alguna categoría de riesgo por lo que realizar estudios de toxicidad es doblemente importante, por un lado para extrapolar lo que

sucede en el mar y por el otro para ver lo que está pasando en sus poblaciones con la presencia de este tóxico.

Considerando la importancia de la gónada fetal en el establecimiento del sistema reproductor, elucidar el efecto del BPA en el desarrollo gonadal de las tortugas marinas resulta fundamental para entender las consecuencias biológicas de un agente contaminante ampliamente distribuido como el BPA. En este estudio por primera vez se cuantifican los niveles de BPA en huevos de la playa de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, y es el único estudio experimental en reptiles que se lleva a cabo en una especie biomonitora.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## SITIO DE ESTUDIO

Los muestreos se realizaron en la playa de Escobilla, en el estado de Oaxaca, en el pacífico mexicano, situado en el Km 182 de la carretera federal 200 (15-43°N y 44-96°W).

El Santuario, operado por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), a través del Centro Mexicano de la Tortuga, es uno de los pocos sitios en el mundo en los que se presenta la anidación masiva de esta especie, fenómeno conocido como "arribada", "arribazón" o localmente "morriña".

Actualmente, Playa La Escobilla está considerada como la más importante del mundo, por la cantidad de nidos que dejan dichos quelonios cada temporada.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los muestreos se efectuaron entre enero de 2012 y enero de 2014, con un permiso de no afectación de colecta otorgado por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

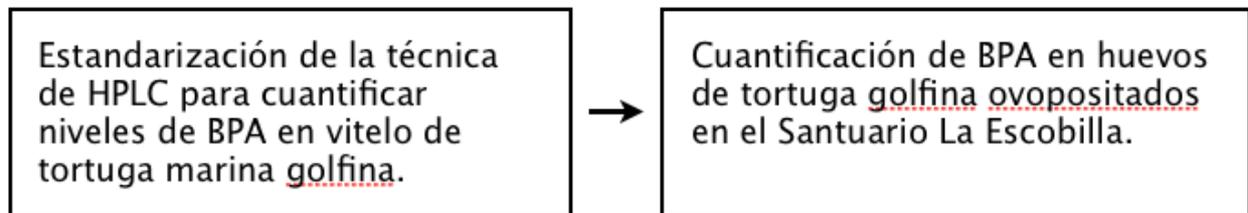
(número de permiso)

Los huevos fueron colectados poco después de la ovoposición de nidos seleccionados al azar. Éstos fueron colocados en vermiculita para que mantuvieran la temperatura y la humedad. La orientación original del nido fue mantenida durante su transporte, vía terrestre, al Laboratorio de Biología Celular y del Desarrollo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

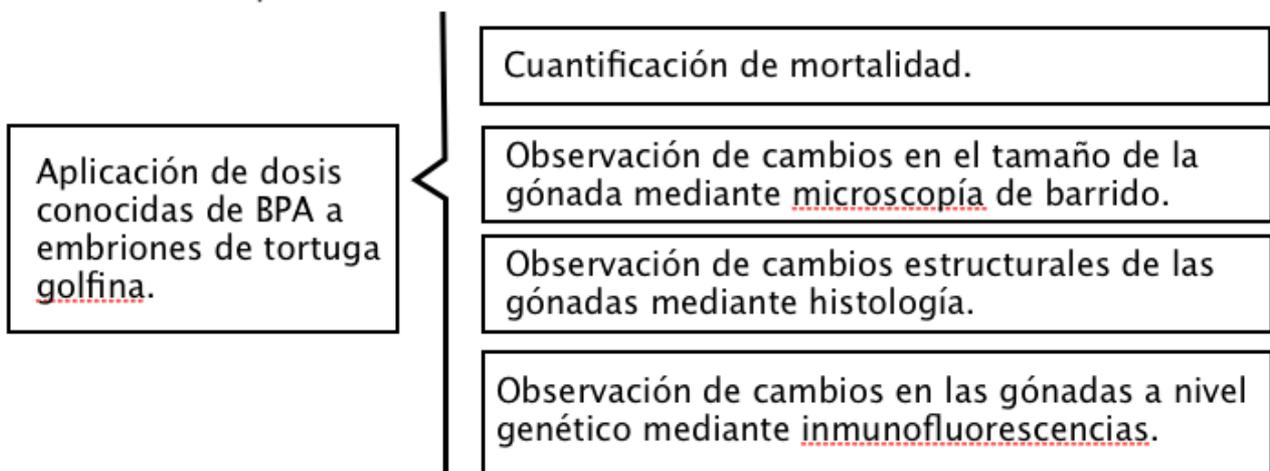
El estudio constó tanto de una parte observacional, para conocer la cantidad de BPA presente en los huevos de la playa, tanto de una parte experimental, en la que embriones de tortuga golfina fueron sometidos a dosis conocidas del xenoestrógeno para conocer el efecto en el desarrollo gonadal. La figura 4 sintetiza el estudio.

Figura 4. Síntesis del estudio realizado en *Lepidochelys olivacea* con relación al Bisfenol A.

Estudio de observación:



Estudio de experimentación:



## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CONTENIDO DE BPA EN HUEVOS DE LA PLAYA LA ESCOBILLA

### ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Al llegar al laboratorio, los huevos fueron retirados de la vermiculita, y separados según el nido al que pertenecían y fueron colocados en el refrigerador por un máximo de 10 días, antes de que el vitelo fuera sometido a un análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución, para cuantificar los niveles de BPA presente (ver más adelante).

Actualmente no existe ninguna técnica estandarizada a nivel mundial para medir este compuesto en vitelo, dada la complejidad del contaminante, por lo que se hizo una extensa revisión de la literatura para poder establecer una metodología. Esta metodología se estandarizó en la Unidad de Cromatografía Líquida de Alta Densidad del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se decidió basarnos en el método empleado por Abalat, modificado por Mita para cuantificar BPA en hígado de peces.

Todos los químicos, incluyendo el estándar de BPA, el metanol, la acetona, el hexano y el acetonitrilo grado HPLC (Sigma) y se usaron sin alguna purificación previa. Para la fase de extracción sólida se usó un cartucho Ligth Florisil de Waters. Se usó un equipo de HPLC Waters 600 y una columna Microsorb 300-C18, 5 $\mu$ L dp., 4.6 x 150mm.

Para construir la curva de calibración del BPA, diferentes cantidades conocidas del estándar de BPA fueron disueltas en metanol para obtener la respuesta del HPLC a una concentración conocida de HPLC. El tiempo de elución para este compuesto fue de 7.34-7.49 segundos. Esto se realizó por triplicado. Esta concentración de BPA fue relacionada con el pico de los cromatogramas obtenidos de las muestras de la playa (Anexo 1).

Antes de las mediciones de HPLC, la muestra requirió de dos pasos para la preparación: extracción y purificación. En el caso de la extracción, los huevos se pesaron completos, sin cascarón, y únicamente el vitelo. Para la homogenización, se tomaron aproximadamente 5 gramos de vitelo, se le adicionaron 2ml de metanol y se homogenizaron en un Vortex por 4 minutos. Las muestras se centrifugaron a 4000 revoluciones por minuto a 10°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante lipídico menos denso y se puso a evaporar el disolvente con una corriente de nitrógeno a 40°C. Posteriormente se resuspendió en una mezcla de acetona/hexano de 3:97.

Para la purificación, las muestras se sometieron a una extracción de fase sólida a través de un cartucho Sep Pack Florisil, equilibrado con la solución de acetona/hexano. Posteriormente se realizó un lavado con acetona/hexano de 5:95, y se obtuvieron 2 eluidos con acetona/hexano 40:60. Se eliminó el disolvente mediante la evaporación con una corriente de nitrógeno a 40°C. Esto se resuspendió en MEOH y se filtró para finalmente someterse al análisis de HPLC.

Una vez realizado este proceso, se tomaron 10 $\mu$ L y se inyectaron en el equipo de HPLC Waters 600. Para la fase móvil se usó acetonitrilo: agua, el flujo es de 1.0 mL/min y el tipo de elución fue por gradiente (ver anexo 2 para el Cuadro de Gradiente). La detección se realizó por UV y fue de 225nm.

Con el fin de verificar la eficacia del método se llevó a cabo un análisis de recuperación de estándares y se realizaron los blancos para acetona/hexano y para metanol. Todo el material de laboratorio fue de vidrio para evitar la contaminación del material por parte del BPA liberado del plástico usado en el laboratorio. (Anexo 3)

Se obtuvo una recuperación de BPA agregado al vitelo de entre 76.95% y 95.50%, lo que nos dio un promedio de 86.22, valor que está aceptado por la EPA (Environmental Protection Agency).

El BPA no es completamente hidrofóbico, por lo que realizamos muestras complementarias para conocer la distribución del contaminante en el huevo, aplicando el estándar a todo el huevo y no únicamente al vitelo, y se recuperó un promedio de 53% de la cantidad total en el vitelo. Esto muestra que el BPA también está presente en las proteínas.

## ANÁLISIS DE CONTENIDO DE BPA EN HUEVOS DE LA PLAYA

Para la medición del BPA, se muestrearon 4 nidos frescos en el sitio de estudio antes mencionados, y con el permiso señalado se tomó una muestra de 6 huevos por nido, 24 huevos en total. Cada huevo estaba identificado de acuerdo con el nido del que procedía.

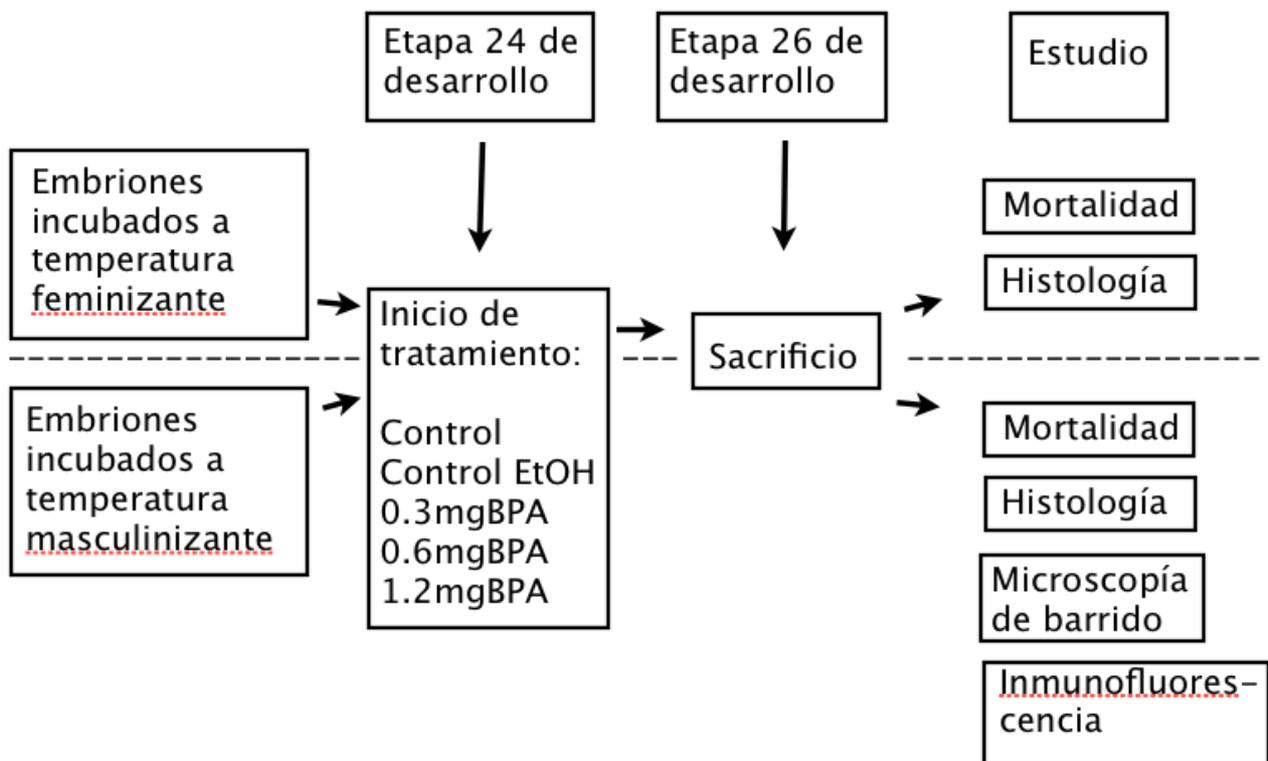
Los huevos fueron almacenados en el refrigerador por menos de una semana y fueron sometidos a la metodología desarrollada para cuantificar niveles de BPA mediante la técnica de HPLC.

## EXPERIMENTACIÓN DEL EFECTO DEL BPA EN EL DESARROLLO GONADAL DE TORTUGA GOLFINA CON DOSIS CONOCIDAS

Todo el trabajo de laboratorio fue conducido bajo la aprobación del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La figura 5 sintetiza el trabajo experimental realizado con embriones de tortuga *Lepidochelys olivacea*.

Figura 5. Esquema que sintetiza el estudio experimental realizado con dosis conocidas de Bisfenol A en embriones de tortuga *Lepidochelys olivacea*.



Una vez en el laboratorio, los huevos provenientes del sitio de estudio mencionado se colocaron en recipientes con vermiculita y se dividieron al azar en 2 grupos: uno se incubó a 26°C (temperatura masculinizante) y el otro se incubó a 33°C (temperatura feminizante). La humedad se verificó periódicamente, adicionando agua cuando era necesario, y la temperatura se monitoreaba mediante data loggers.

En cada grupo de incubación, los huevos fueron equitativamente distribuidos en 5 grupos de tratamiento: huevos control sin tratamiento o vehículo, huevos con

vehículo (60µg de EtOH75), huevos con 0.3mgBPA/huevo, huevos con 0.6mgBPA/huevo y huevos con 1.2mg/huevo. Consultar anexo 4 para ver el cuadro que sintetiza la aplicación de las dosis.

Todos los tratamientos fueron aplicados de manera tópica en el cascarón en la etapa 24 del desarrollo embrionario, es decir, antes de la diferenciación sexual. Estas dosis se obtuvieron partiendo de que el BPA en reptiles tiene un efecto 100 veces menor que el 17βEstradiol por lo que la dosis mínima conocida que causa efecto de este último, fue dividida 100 veces para obtener la dosis más alta de BPA a aplicar.

Las otras 2 dosis se obtuvieron por una progresión geométrica inversa.

Los animales de cada grupo se incuban hasta alcanzar la etapa 26 del desarrollo embrionario, cuando ya están determinados sexualmente. Para monitorear la temperatura de manera continua se utilizan termómetros electrónicos dataloggers y termómetros de mercurio, además del termómetro de cada incubadora.

Para la obtención de muestras para microscopía de barrido, histología y para inmunofluorescencia se necesitó de la realización de 10 experimentos para obtener una N de 12 individuos por grupo de experimentación para cada uno de los 2 sexos.

Cuando alcanzan la etapa 26, los animales son sacrificados de manera rápida para evitar dolor en el embrión y posteriormente las gónadas, los mesonefros y el complejo gónada mesonefros se extrae por microdissección y se procesa de acuerdo con la técnica de laboratorio a realizar.

## MICROSCOPIA DE BARRIDO

Se realizó una microdissección para obtener los complejos urogenitales. Posteriormente se fijaron en Karnovsky toda la noche y se enjuagaron con un buffer de cacodilatos 1M. La post fijación se realizó con tetraóxido de osmio durante 3 horas. Se enjuagaron con agua bidestilada y se deshidrataron en alcohol al 70% por una hora, al 80% por una hora, al 90% por una hora, y finalmente al 100% 3 veces por una hora cada vez. Finalmente se almacenaron en el alcohol y se embolsaron en papel de arroz.

Cada muestra fue identificada y se llevó a la Unidad de Microscopía de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en donde fueron secadas por punto crítico con CO<sub>2</sub> y posteriormente fueron recubiertas con oro para garantizar su conductibilidad. Una vez finalizado este proceso se montaron y se observaron en el microscopio a un aumento de 20X y 40X.

## INCLUSIÓN EN EPON PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Después del sacrificio se extrajo por microdissección 1 complejo gónada mesonefros por cada embrión de tortuga. Se fijó el tejido en Karnovsky por 24 horas, se lavó con un buffer de cacodilato de sodio 0.1M y se dejó por una hora. La post fijación se realizó con tetraóxido de osmio 1% en buffer de Zelterqvst por una hora más. Se lavó con agua destilada y se deshidrato en alcohol al 70% por 10 minutos, alcohol al 80% por 10 minutos, alcohol al 90% por 10 minutos, alcohol al 100% 2 cambios de 20 minutos cada uno. Finalmente en dos cambios de acetonitrilo de 20 minutos cada uno.

Para la impregnación se realizó una dilución EPON: acetonitrilo 1:1 de una hora, posteriormente EPON: acetonitrilo 2:1 y finalmente la muestra se dejó en EPON puro por 24 horas. La inclusión se realizó en moldes plásticos y se dejaron en una estufa a 60°C por 24 horas.

Se realizaron cortes transversales semifinos en el microtomo de 1 micra, se tiñeron con azul de toluidina y se montaron en portaobjetos. Se les aplicó Citoseal y se colocó el cubreobjetos para observarse en el microscopio.

## INMUNOFLUORESCENCIAS

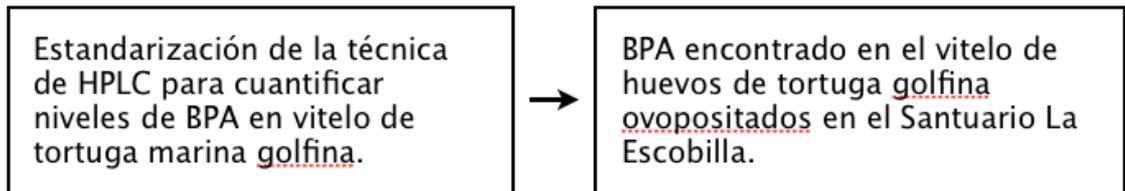
Después del sacrificio se extrajo por microdissección 1 complejo gónada mesonefros por cada embrión de tortuga. Se dejaron en PFA 4% por 24 horas, se enjuagaron con PBS 1X con un Ph de 7.4 y se deshidrataron con sacarosa 10% durante 1 hora, sacarosa 20% durante una hora, y sacarosa al 30% toda la noche. Para la preinclusión se hizo una dilución de sacarosa: tissutake (OCT) 30:70, una de 1:1, y finalmente se incluyeron en tissutake al 100% en cápsulas BIM y se congelaron en hexano en hielo seco a -50°C aproximadamente. Se obtuvieron cortes transversales de 20 micras en el criostato. Se montaron en laminillas, se desecaron de 1 a 2 horas en un desecador y se guardaron a -70°C.

Para realizar las inmunofluorescencias se atemperaron, se desecaron otra vez y se llevaron a la Facultad de Medicina, en donde se realizó el protocolo para la inmunofluorescencia en donde se realizó una inmunofluorescencia doble con un anticuerpo anti-Sox9 específico de *L. olivacea* y un anticuerpo anti-Citoqueratina (Cq) de humano para marcar células epiteliales.

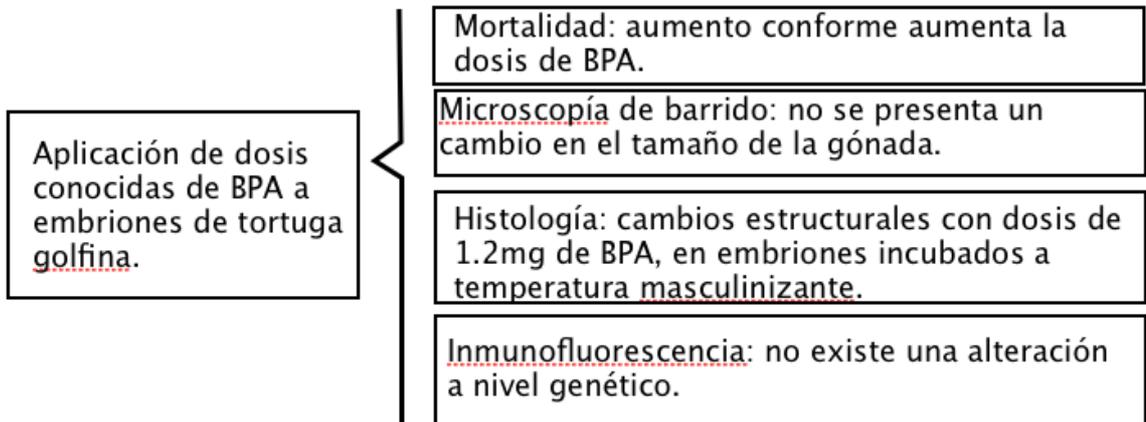
## RESULTADOS

Figura 6. Esquema que sintetiza los resultados encontrados en el estudio de *Lepidochelys olivacea* en relación al Bisfenol A.

### Estudio de observación:



### Estudio de experimentación:



# ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CONTENIDO DE BPA EN HUEVOS DE LA PLAYA LA ESCOBILLA

## MEDICIÓN DE BPA EN LOS HUEVOS DE LA PLAYA

Se obtuvieron muestras positivas a BPA en todos los nidos analizados . Las cantidades exactas se muestran en el Cuadro 3. En el anexo 5 se puede ver el orden de los cromatogramas para cada una de las muestras y los anexos 6 al 29 muestran los cromatogramas.

Cuadro 3. Cantidad de  $\mu\text{g/g}$  de BPA encontrados en los nidos provenientes de la playa.

Nido1 $\mu\text{g/g}$	Nido 2 $\mu\text{g/g}$	Nido 3 $\mu\text{g/g}$	Nido4 $\mu\text{g/g}$
0	0.034	0.027	0.016
0	0	0.041	0.016
0	0	0.022	0.020
0	0.021	0.016	0.017
0.026	0.017	0.029	0.022
0.022	0	0.028	0.019

## EXPERIMENTACIÓN DEL EFECTO DEL BPA EN EL DESARROLLO GONADAL DE TORTUGA GOLFINA CON DOSIS CONOCIDAS

### MORTALIDAD.

Para la obtención de las muestras necesarias para los estudios de laboratorio, se utilizaron un total de 812 huevos, distribuidos de manera desigual según el grupo de estudio (control sin vehículo, control con EtOH al 75%, 0.3mgBPA, 0.6mgBPA, 1.2mgBPA). En la figura 7 se puede observar la distribución del número de huevos según la dosis y en la figura 8 se aprecia que de los 812 huevos, la gran mayoría (537) fueron incubados a temperatura masculinizante.

Figura 7. Gráfica que indica el número de huevos totales utilizados por cada dosis de Bisfenol A.

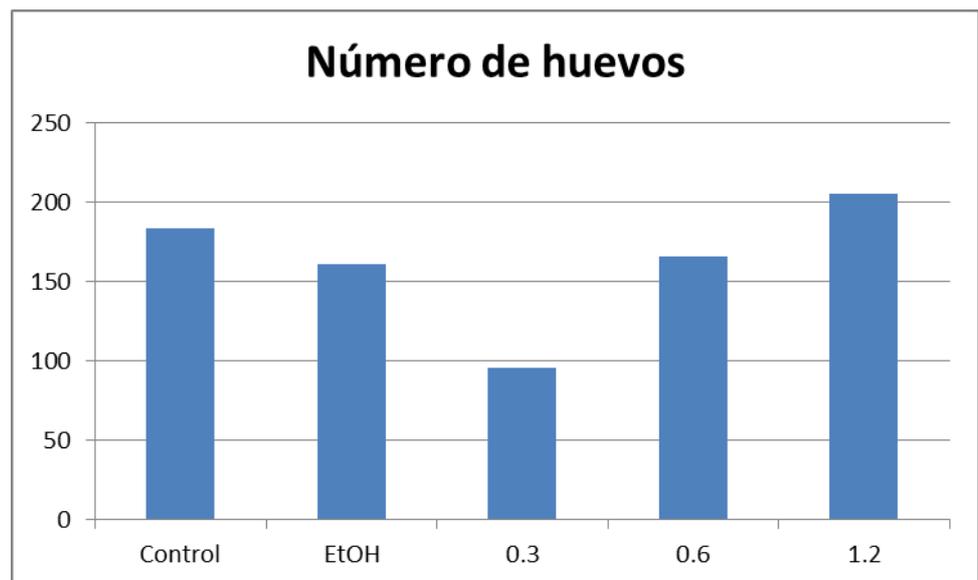
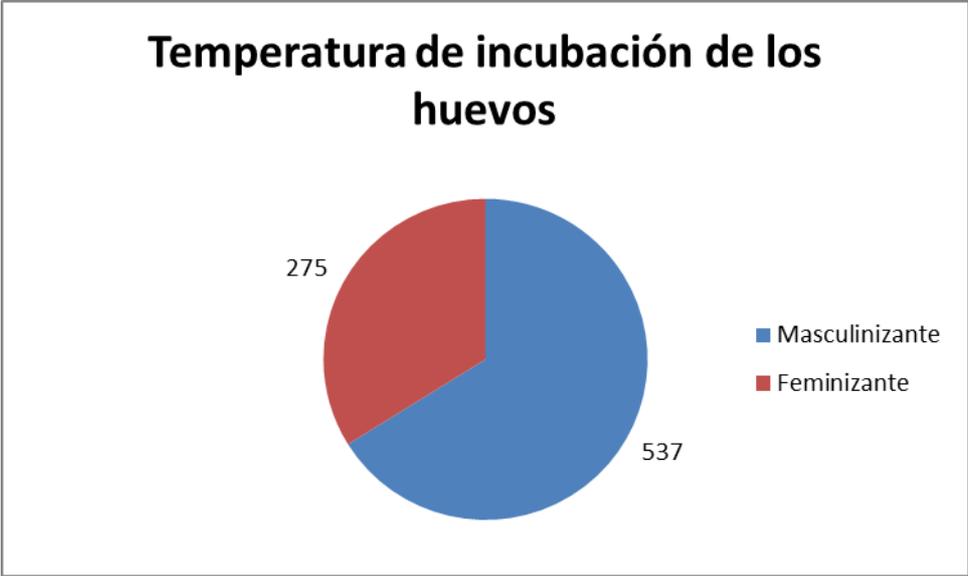
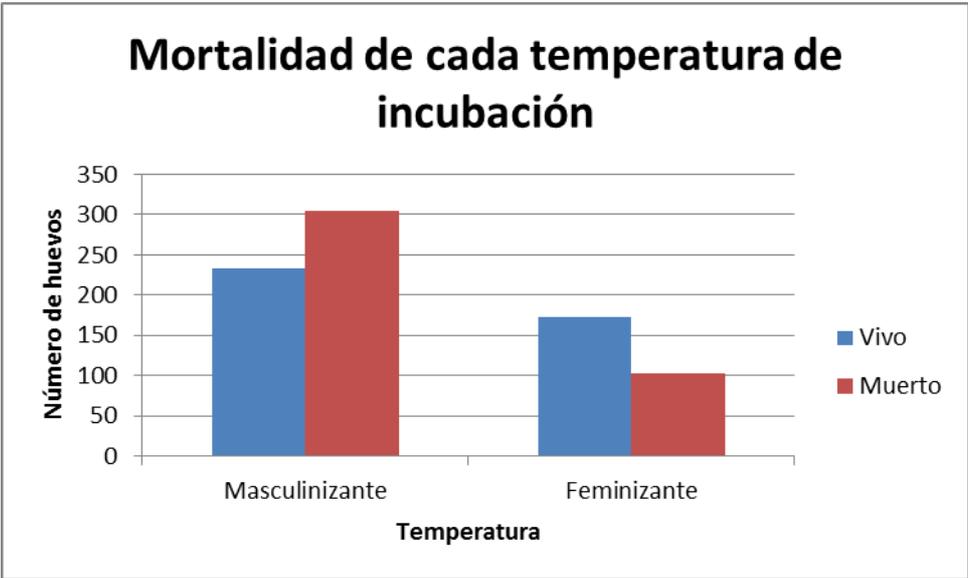


Figura 8. Grafica que muestra el número de huevos incubados a temperatura masculinizante y el número de huevos incubados a temperatura feminizante.



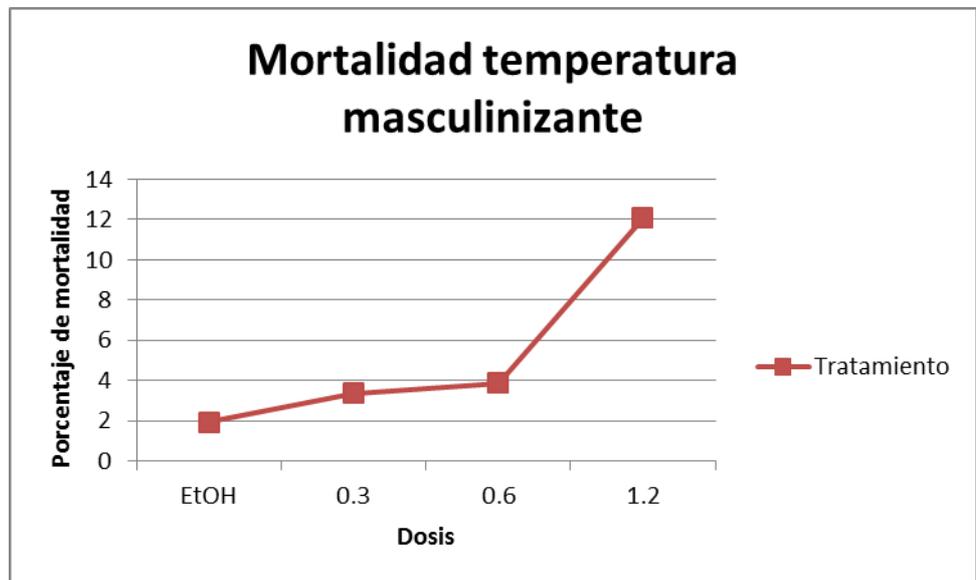
De los 812 huevos se registraron 406 vivos y 406 muertos. De los 537 huevos incubados a temperatura promotora de machos 233 vivieron y 304 murieron; para los 275 huevos incubados a temperatura promotora de hembras, 173 vivieron y 102 murieron. Consultar figura 9.

Figura 9. Número de huevos muertos y vivos según la temperatura de incubación.



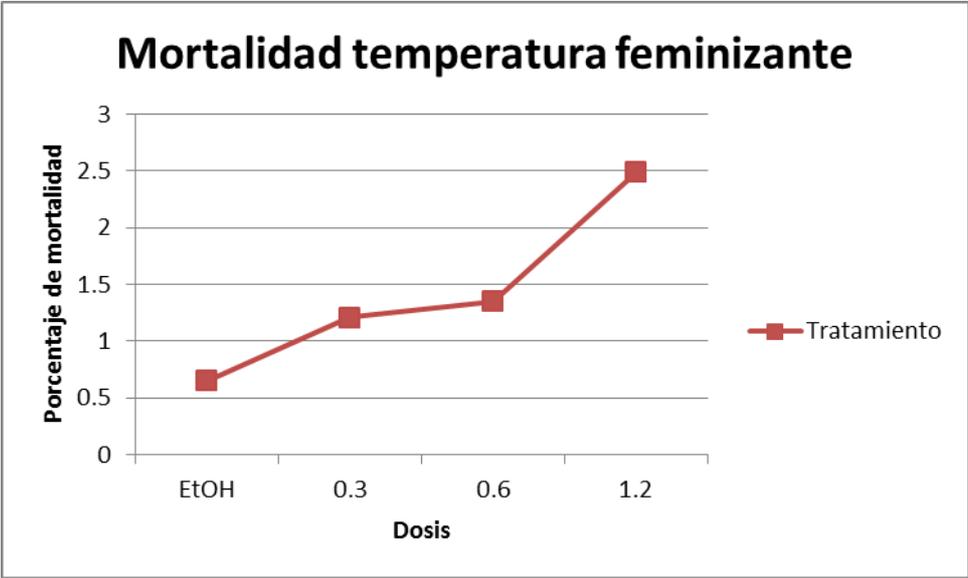
La supervivencia de los embriones incubados a temperatura de macho es menor que la de los embriones incubados a temperatura de hembra. El vehículo utilizado afecta la viabilidad de los embriones. Para los embriones incubados a temperatura masculinizante, el control de EtOH al 75% aumenta la probabilidad de muerte en un 1.92%, la dosis de 0.3mg de BPA en 3.35%, la dosis de 0.6mg de BPA en 3.86% y la dosis de 0.6mg de BPA en 12.06%. Consultar figura 10.

Figura 10. Porcentaje de mortalidad para las diferentes dosis de Bisfenol usadas en embriones incubados a temperatura masculinizante. Los valores fueron obtenidos con respecto a la mortalidad del control.



Para los embriones incubados a temperatura feminizante, el control de EtOH al 75% aumenta la probabilidad de muerte en un .65%, la dosis de 0.3mg de BPA en 1.21%, la dosis de 0.6mg de BPA en 1.35% y la dosis de 0.6mg de BPA en 2.49%. Consultar figura 11.

Figura 11. Porcentaje de mortalidad para las diferentes dosis de Bisfenol usadas en embriones incubados a temperatura feminizante. Los valores fueron obtenidos con respecto a la mortalidad del control.



Para obtener los resultados descritos anteriormente se realizó una regresión logarítmica. En el anexo 30 se puede consultar el análisis estadístico.

## MICROSCOPIA DE BARRIDO:

Con la microscopía de barrido se buscó comparar de manera cuantitativa el efecto que tiene el BPA con el efecto que tiene el 17B estradiol en la reducción del tamaño de la gónada. Para esto utilizamos 3 muestras de embriones incubados a temperatura masculinizante con EtOH al 75%, 3 muestras de embriones incubados a temperatura masculinizante, sometidos a 0.3mg de BPA por huevo, 3 muestras de embriones sometidos a 0.6mg de BPA por huevo, y 3 muestras de embriones incubados a temperatura masculinizante, sometidos a 1.2mg de BPA.

No se observó el efecto característico de gónadas sometidas a 17BEstradiol para las gónadas tratadas con BPA. Cualitativamente este tóxico no tienen ningún efecto en la alteración del tamaño de la gónada.

En la figura 2 se muestra un complejo gónada-mesonefro control negativo al cual no se le aplicó nada, en la figura 3 se observa una imagen de un complejo gónada-mesonefro tratada con 17BEstradiol en un experimento realizado por el Dr. Merchant, en la figura 4 se observa una muestras de complejo gónada-mesonefros tratada con 0.3mgBPA, en la figura 5 se observa una muestras de complejo gónada-mesonefros tratada con 0.6mgBPA y en la figura 6 se observa una muestras de complejo gónada-mesonefros tratada con 1.2mgBPA.

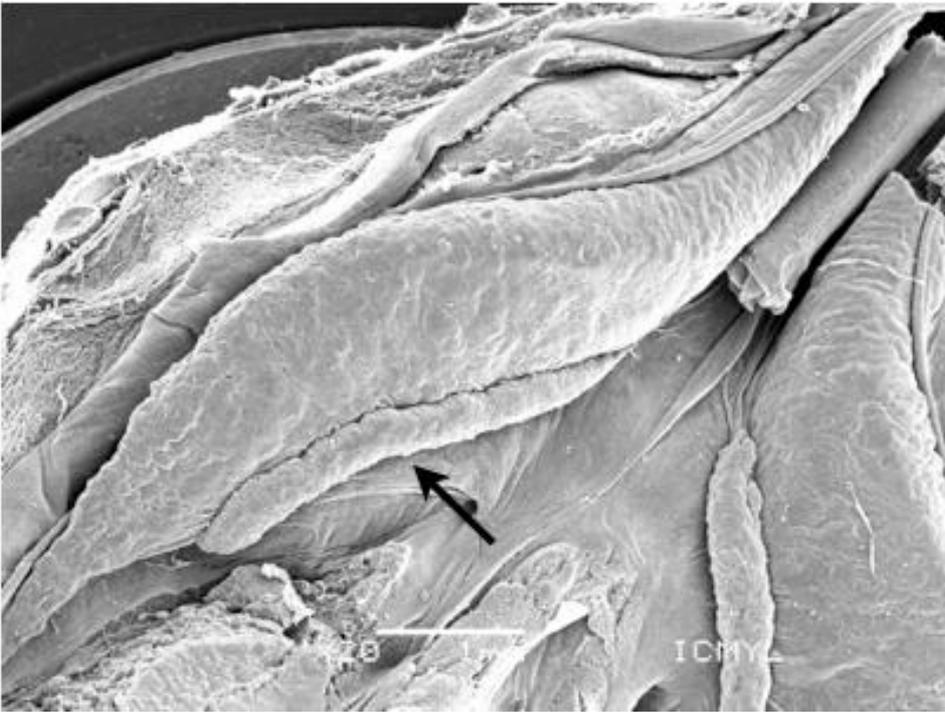


Figura 2. Complejo gónada-mesonefro de embrión de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* incubada a temperatura masculinizante. Se observa la gónada (flecha).

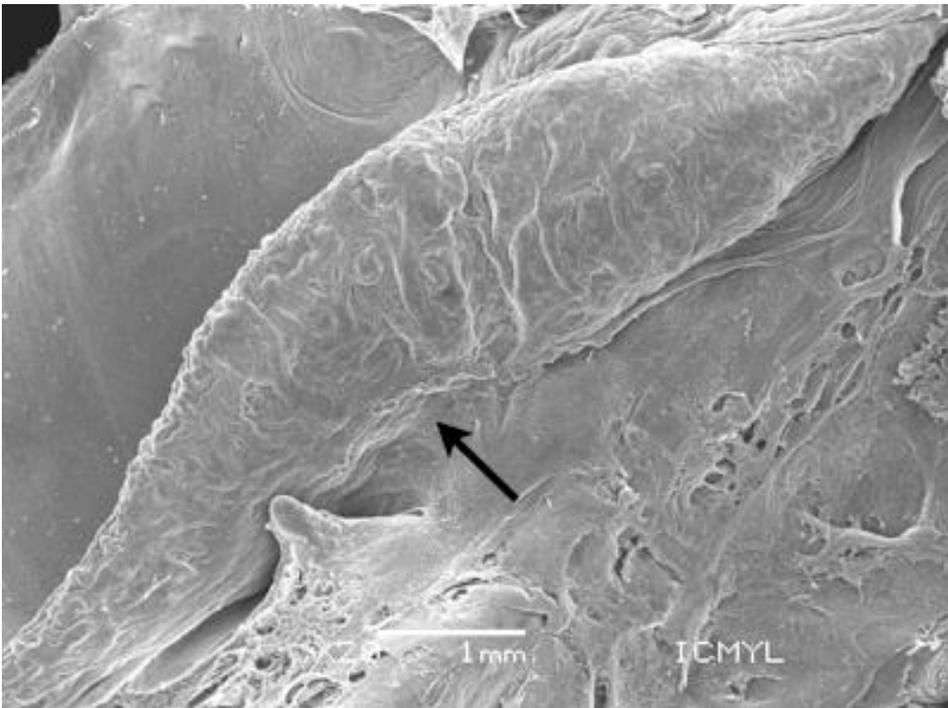


Figura 3. Complejo gónada-mesonefro de embrión de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* incubada a temperatura masculinizante, tratada en un experimento del Dr. Merchant con 17βEstradiol. Se observa la gónada muy reducida de tamaño, casi ausente (flecha).

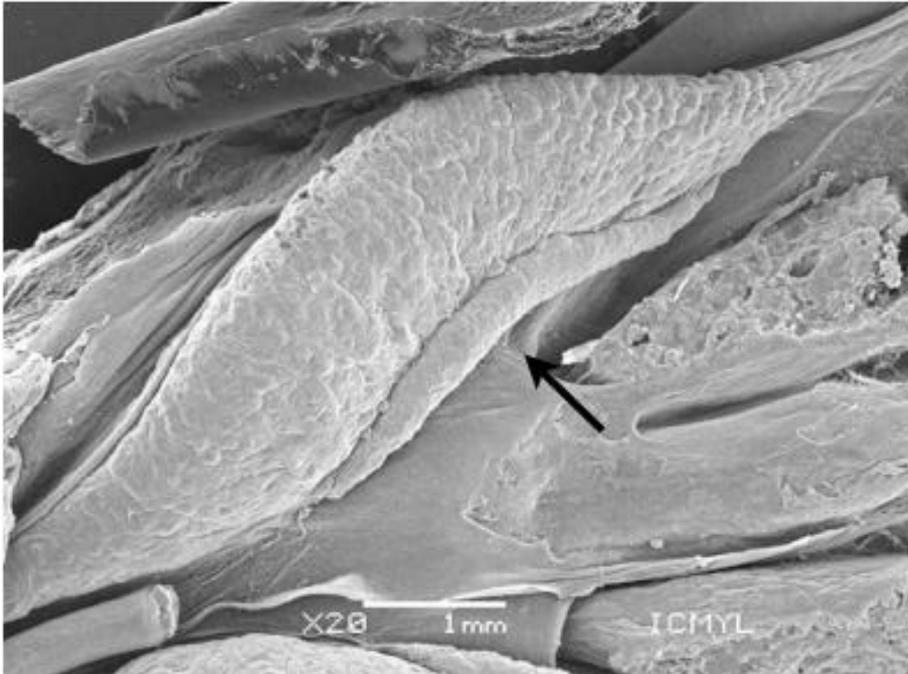


Figura 4. Complejo gónada-mesonefro de embrión de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* incubada a temperatura masculinizante, tratada con 0.3mg de BPA. No se observa el tamaño de la gónada reducido (flecha).

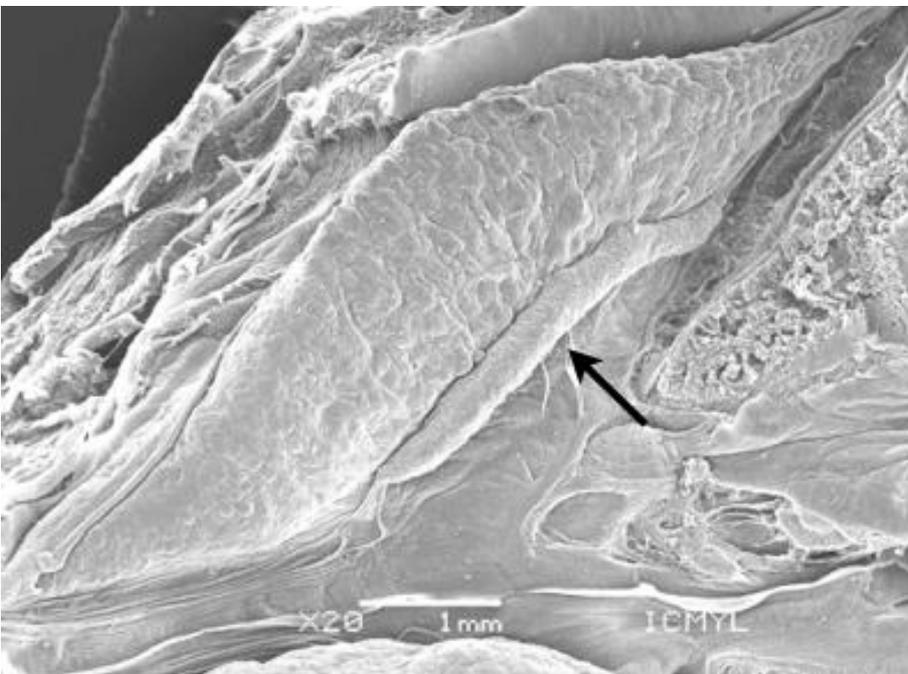


Figura 5. Complejo gónada-mesonefro de embrión de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* incubada a temperatura masculinizante, tratada con 0.6mg de BPA. No se observa el tamaño de la gónada reducido (flecha).

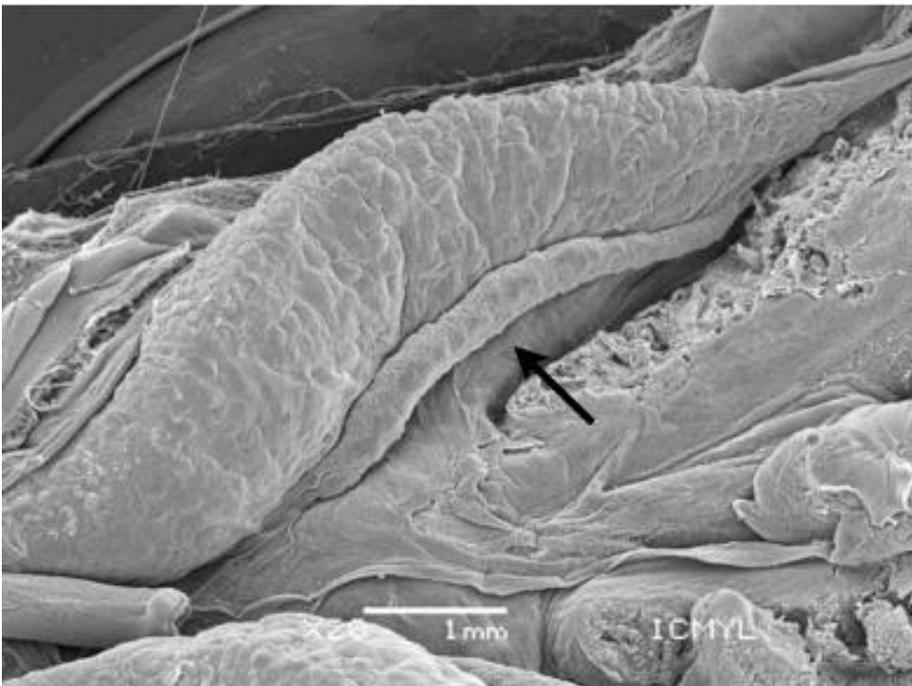


Figura 6. Complejo gónada-mesonefro de embrión de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* incubada a temperatura masculinizante, tratada con 1.2mg de BPA. No se observa el tamaño de la gónada reducido.

# HISTOLOGÍA

El análisis histológico con EPON, se realizó en cortes semifinos transversales de gónadas incubadas tanto a temperatura promotora de macho como a temperatura promotora de hembra en la etapa 26 del desarrollo, una vez que ya están determinadas sexualmente.

## TEMPERATURA MASCULINIZANTE

Durante la etapa 26 la gónada comienza su diferenciación en testículo y presenta una corteza delgada formada por células epiteliales simples, con algunas células germinales. Presenta cordones medulares formados por células somáticas, y se encuentran rodeados por tejido conectivo o estroma. En este último se pueden observar vasos sanguíneos.

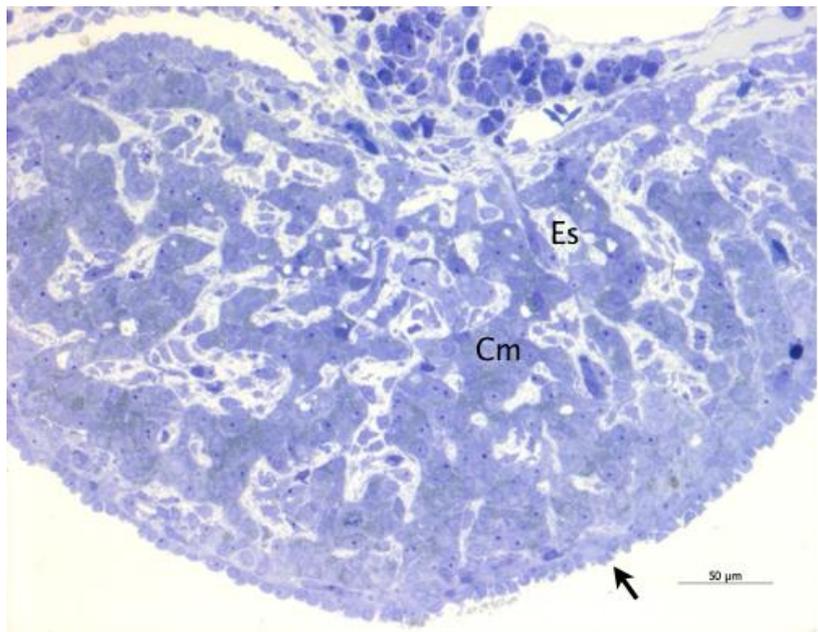


Figura 7. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, perteneciente al periodo de diferenciación sexual, a 20X, con tinción de toluidina. Al comienzo de su diferenciación, el testículo presenta un epitelio superficial delgado (flecha) con células germinales embebidas en él, los cordones medulares (Cm) son bastante conspicuos y se encuentran rodeados por tejido estromático (Es), en el cual se pueden observar vasos sanguíneos.

Dosis de 0.3g de BPA:

Los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 0.3mg de BPA, incubados a temperatura masculinizante no presentaron ninguna alteración aparente. El anexo 31 sintetiza los hallazgos. En la figura 8 se observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento.

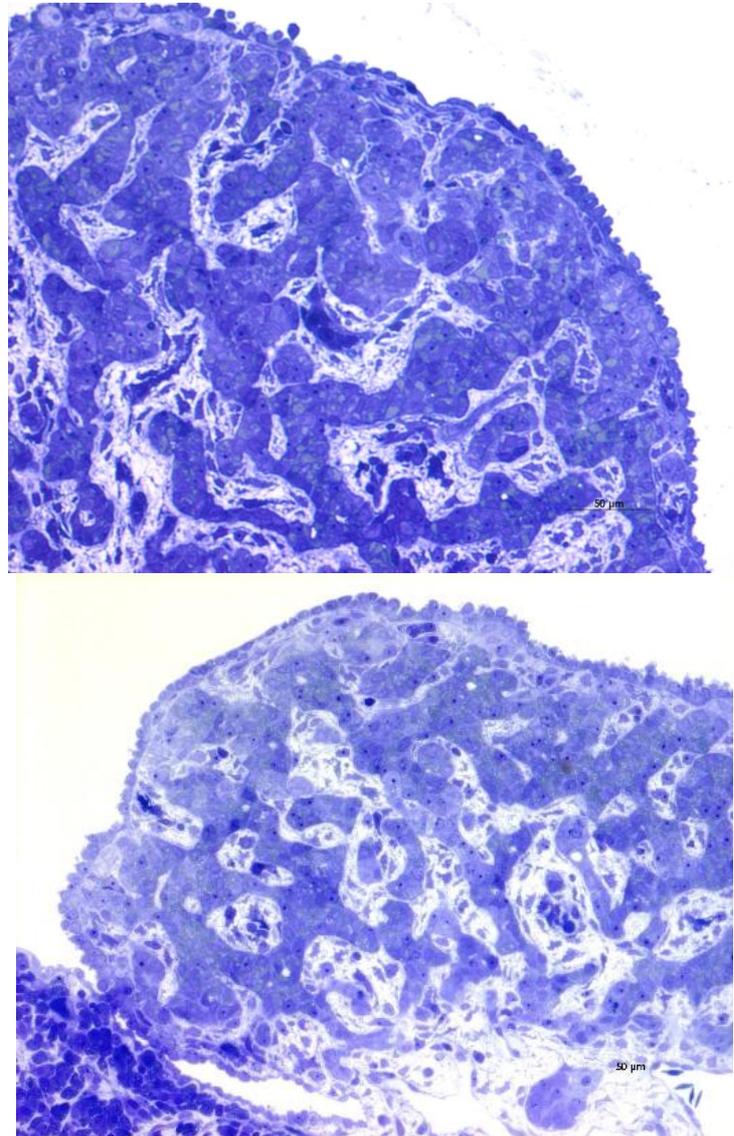


Figura 8. Corte semifino transversal de gónadas de *L. olivacea* incubadas a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratadas con 0.3mg de BPA por huevo (2 de 9). Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un epitelio superficial delgado con células germinales embebidas en él, cordones medulares conspicuos, rodeados por tejido estromático.

Dosis de 0.6g de BPA:

De los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 0.3mg de BPA, incubados a temperatura masculinizante, una muestra presentó cambios en la estructura de los cordones medulares. El anexo 32 sintetiza los hallazgos. En la figura 9 se observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento.

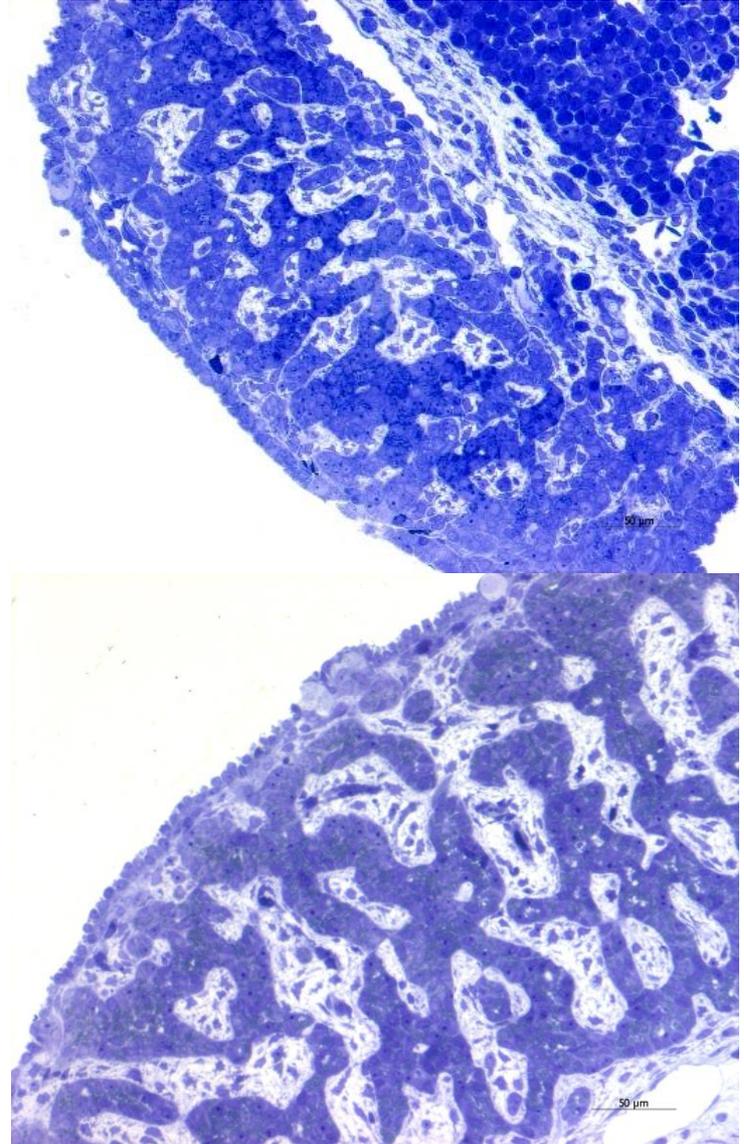


Figura 9. Corte semifino transversal de gónadas de *L. olivacea* incubadas a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratadas con 0.6mg de BPA por huevo (2 de 9). Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un epitelio superficial delgado con células germinales embebidas en él, cordones medulares conspicuos, rodeados por tejido estromático.

Dosis de 1.2mg de BPA:

De los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 01.2mg de BPA, incubados a temperatura masculinizante, 4 muestras presentaron cambios en la estructura de los cordones medulares, y un epitelio cúbico estratificado. El anexo 33 sintetiza los hallazgos. En as figuras 10-13 observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento. Las 4 muestras presentan una pérdida de los cordones medulares y un epitelio cúbico estratificado. En el anexo 34 se muestra la medida de la corteza de las gónadas que presentaron un epitelio cúbico estratificado.

Para cuantificar el engrosamiento del epitelio de la gónada, se midieron 7 puntos aleatorios del epitelio de cada una de las gónadas, en todos los grupos de tratamiento, y se compararon con una regresión lineal.

El único grupo con una diferencia significativa fue el de las gónadas incubadas a temperatura masculinizante y tratadas con 1.2mg de BPA por huevo, en donde el epitelio está engrosado 12.85 veces más que el promedio de los controles.

En el anexo 35 se puede consultar el análisis estadístico.

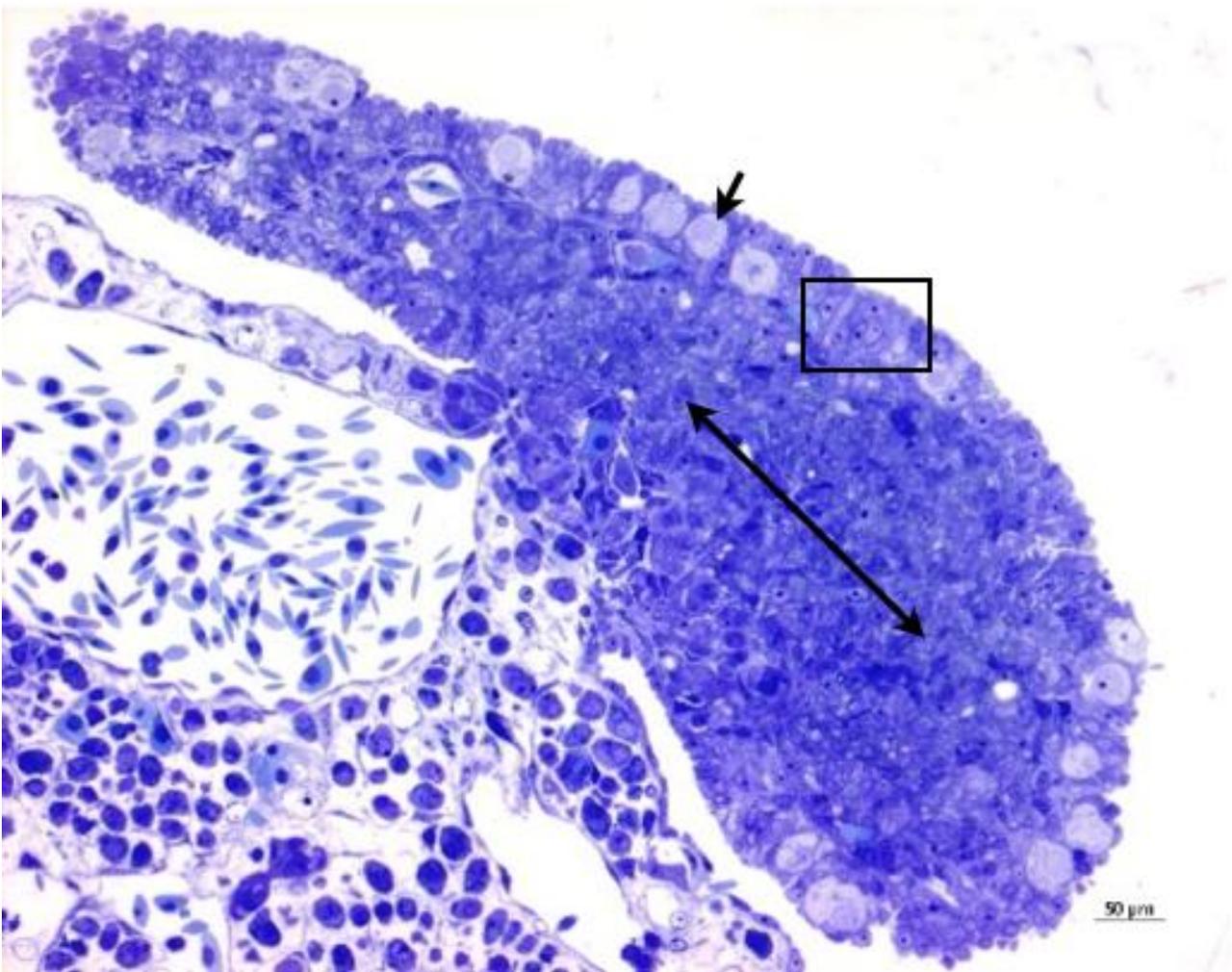


Figura 10. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratada con 1.2mg de BPA por huevo. Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un ovotestis en donde el epitelio superficial es estratificado (cuadro) con células germinales embebidas en él, y hay una regresión de los cordones medulares (flecha doble).

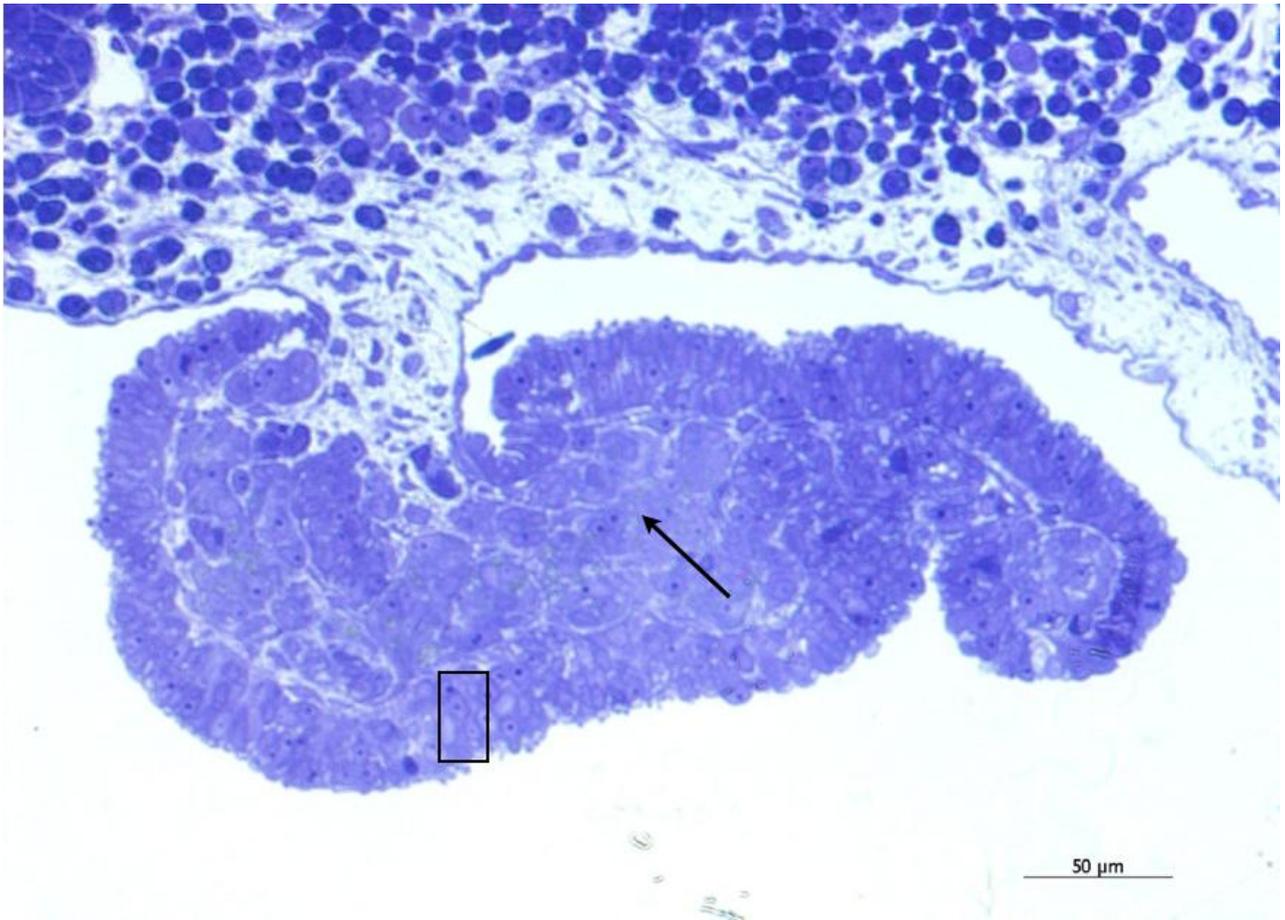


Figura 11. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratada con 1.2mg de BPA por huevo. Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un ovotestis en donde el epitelio superficial es estratificado (cuadro) con células germinales embebidas en él, y hay una regresión de los cordones medulares (flecha).

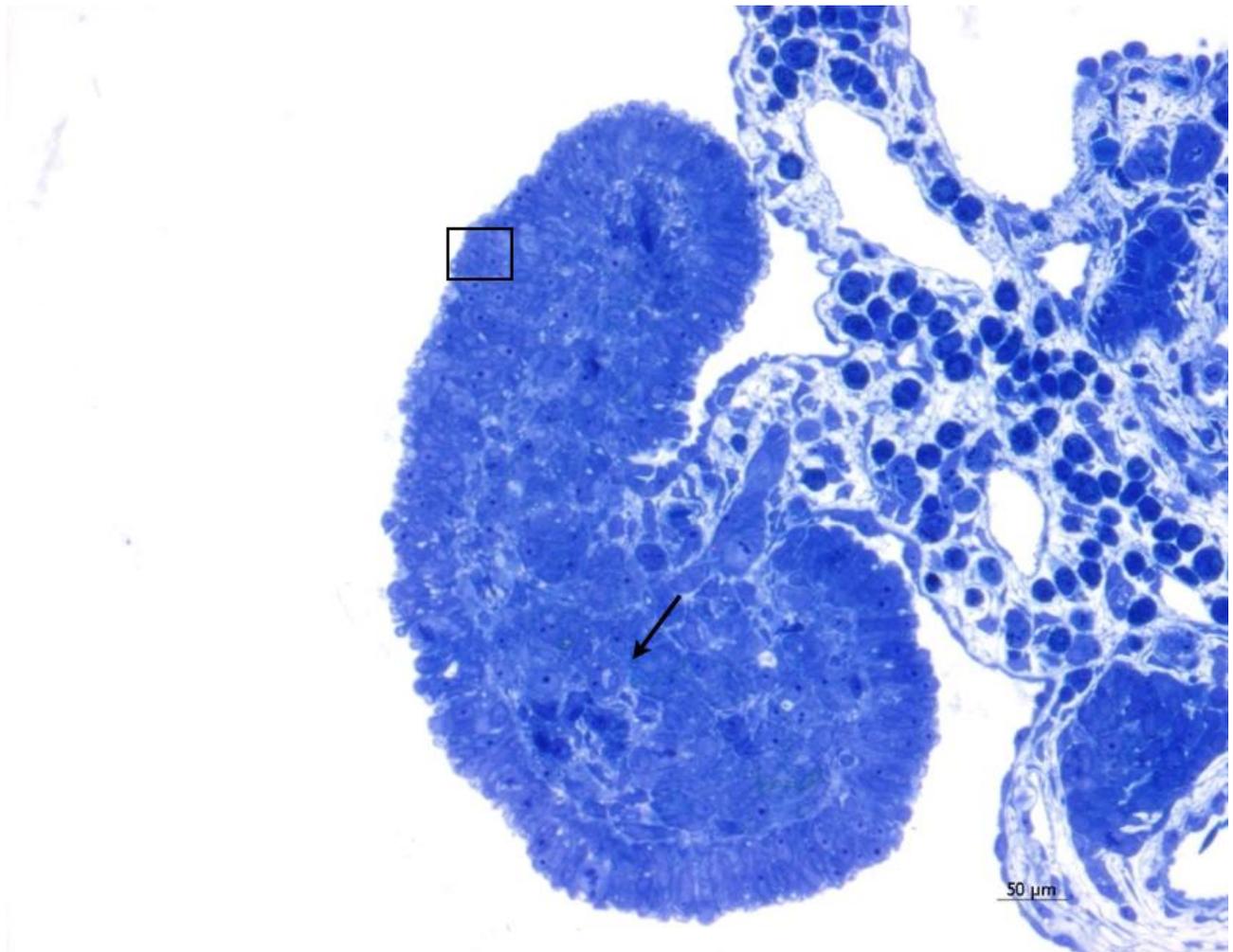


Figura 12. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratada con 1.2mg de BPA por huevo. Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un ovotestis en donde el epitelio superficial es estratificado (cuadro) con células germinales embebidas en él, y hay una regresión de los cordones medulares (flecha).

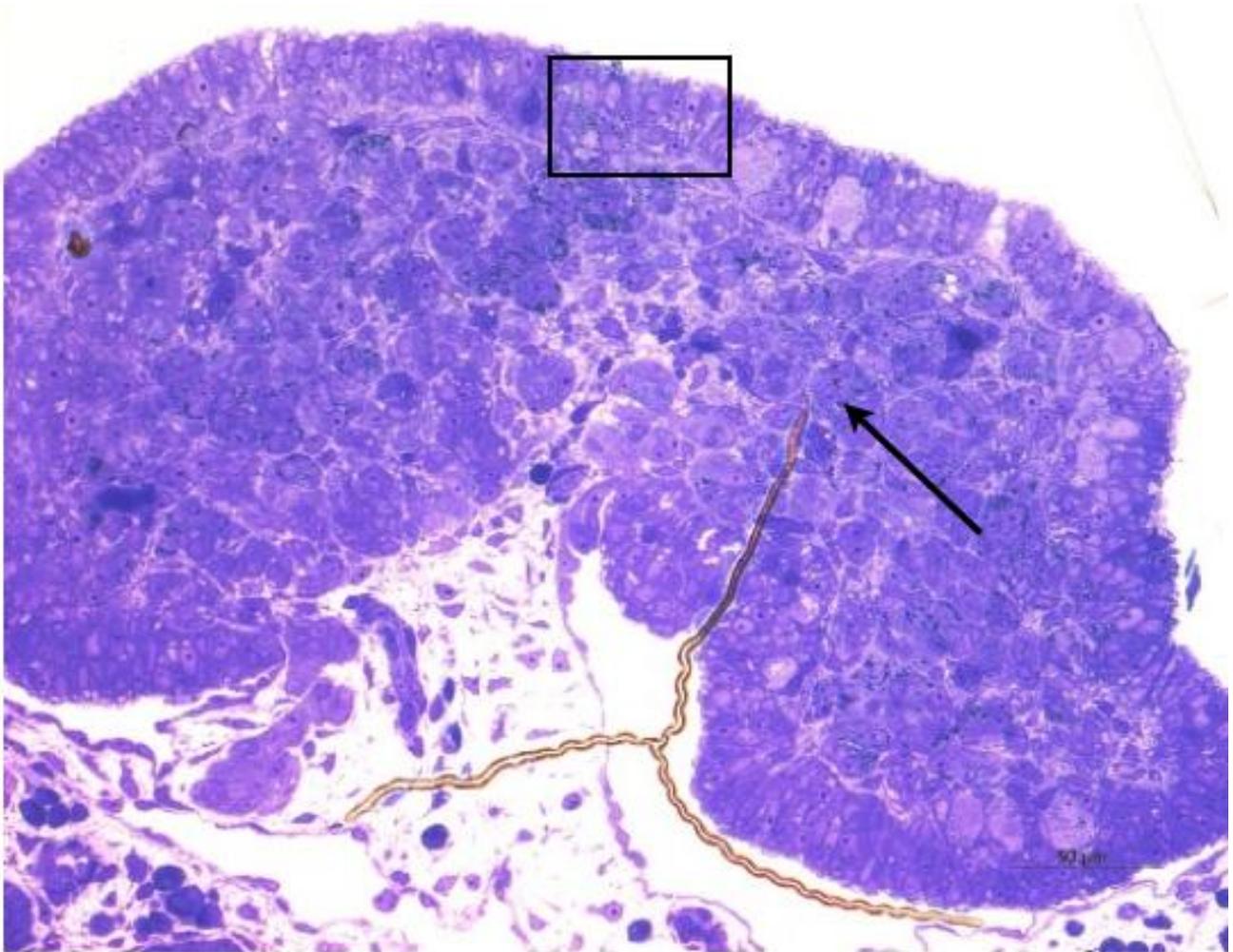


Figura 13. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura masculinizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratada con 1.2mg de BPA por huevo. Tinción de toluidina, aumento total 20X. Se observa un ovotestis en donde el epitelio superficial es estratificado (cuadro) con células germinales embebidas en él, y hay una regresión de los cordones medulares (flecha).

## TEMPERATURA FEMINIZANTE

Durante la etapa 26 la gónada comienza su diferenciación en ovario y presenta una corteza formada por un epitelio cúbico estratificado con algunas células germinales. La médula está formada por células somáticas y en ésta, se pueden observar los cordones medulares fragmentados. El tejido estromático está formado por tejido conectivo fibroso y presenta pocos vasos sanguíneos.

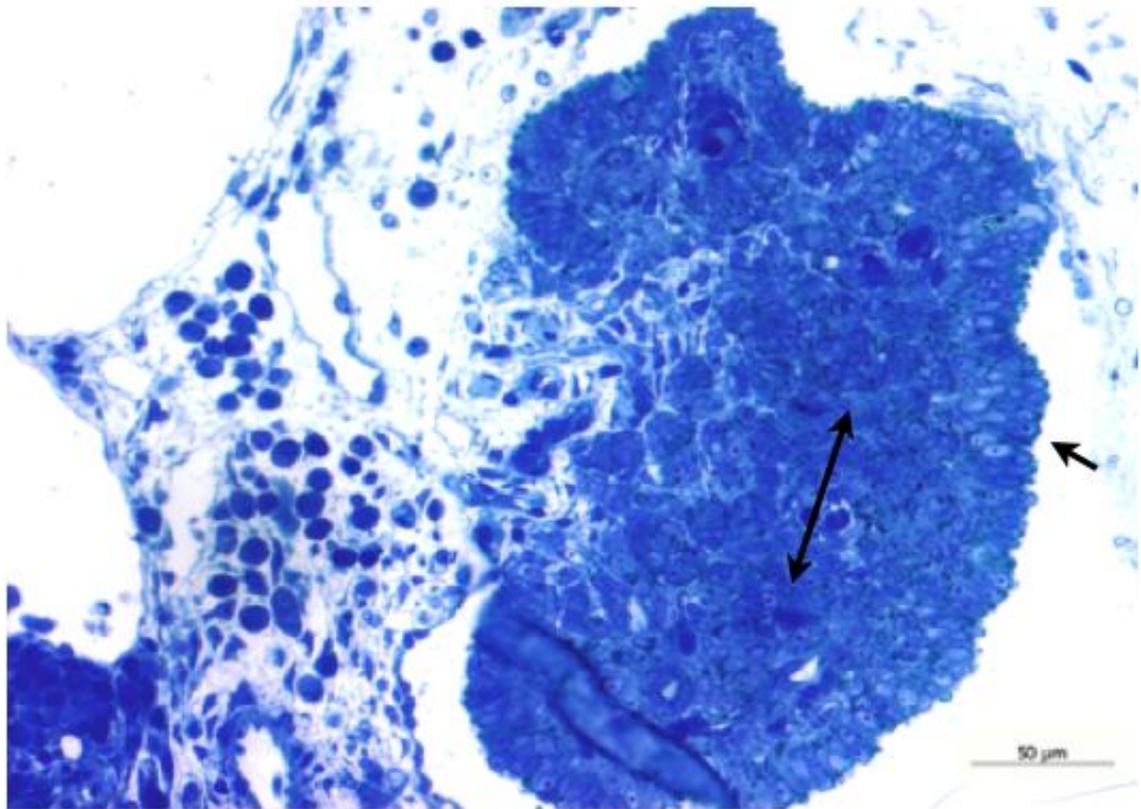


Figura 14. Corte semifino transversal de gónada de *L. olivacea* incubada a temperatura feminizante durante la etapa 26 del desarrollo, perteneciente al periodo de diferenciación sexual, a 20X, con tinción de toluidina. Al comienzo de su diferenciación, el ovario presenta un epitelio cúbico estratificado (flecha) con células germinales. La médula está formada por células somáticas y en ésta, se pueden observar los cordones medulares fragmentados. El tejido estromático está formado por tejido conectivo fibroso y presenta pocos vasos sanguíneos.

Dosis de 0.3g de BPA:

Los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 0.3mg de BPA, incubados a temperatura feminizante no presentaron ninguna alteración aparente. En la figura 15 se observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento.

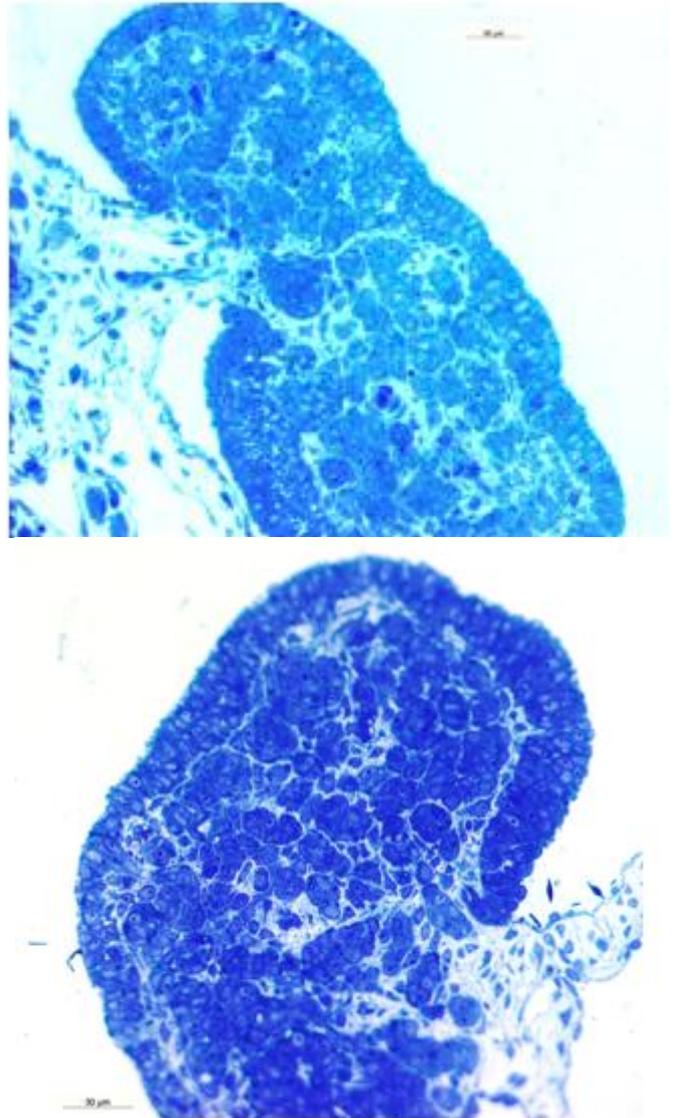


Figura 15. Corte semifino transversal de gónadas de *L. olivacea* incubada a temperatura feminizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratadas con 0.3mg de BPA (2 de 9). Tinción de toluidina, aumento total 20X. Las gónadas presentan unepitelio cúbico estratificado con células germinales. En la médula se observan los cordones medulares fragmentados.

Dosis de 0.6g de BPA:

Los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 0.6mg de BPA, incubados a temperatura feminizante no presentaron ninguna alteración aparente. En la figura 16 se observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento.

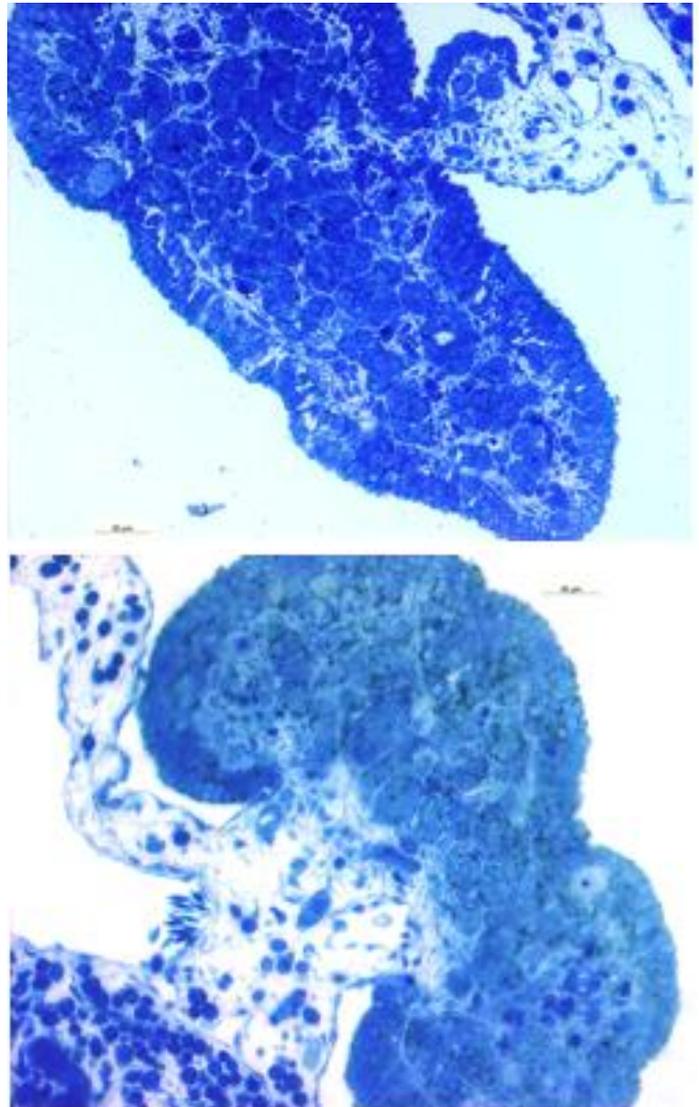


Figura 16. Corte semifino transversal de gónadas de *L. olivacea* incubada a temperatura feminizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratadas con 0.6mg de BPA (2 de 9). Tinción de toluidina, aumento total 20X. Las gónadas presentan unepitelio cúbico estratificado con células germinales. En la médula se observan los cordones medulares fragmentados.

Dosis de 1.2mg de BPA:

Los embriones tratados durante la etapa 26, con una dosis de 1.2mg de BPA, incubados a temperatura feminizante no presentaron ninguna alteración aparente. En la figura 17 se observan cortes transversales de gónadas sometidas a este tratamiento.

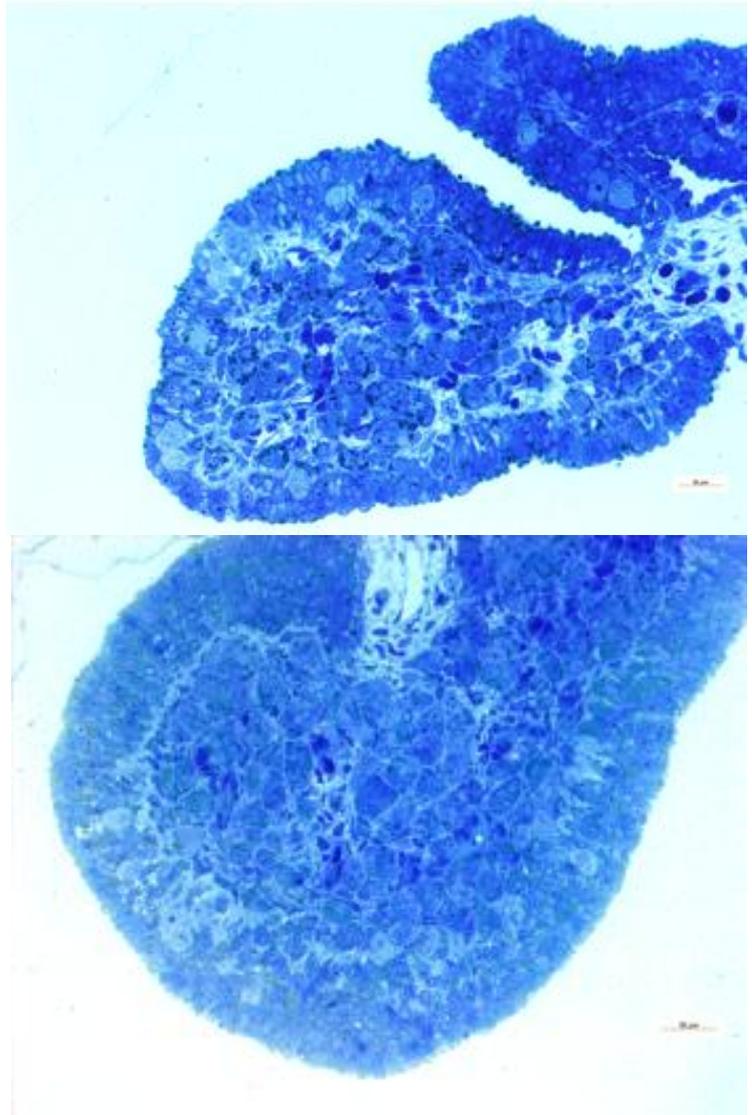


Figura 17. Corte semifino transversal de gónadas de *L. olivacea* incubada a temperatura feminizante durante la etapa 26 del desarrollo, tratadas con 0.6mg de BPA (2 de 9). Tinción de toluidina, aumento total 20X. Las gónadas presentan unepitelio cúbico estratificado con células germinales. En la médula se observan los cordones medulares fragmentados.

## INMUNOFLUORESCENCIAS

El estudio de inmunofluorescencia se realizó con cortes por congelación de la gónada de embriones incubados a temperatura masculinizante tratados con dosis de 1.2mg de BPA, así como cortes por congelación de gónadas de embriones incubados a temperatura masculinizante que fungían como control.

De forma natural, Sox 9 está presente en la gónada bipotenciada de embriones de *Lepidochelys olivacea*, y cuando la gónada está diferenciada continúa presente en los cordones medulares del macho, mientras que en la hembra, Sox9 prácticamente desaparece de la zona medular de la gónada. En ambas gónadas diferenciadas el epitelio es negativo a esa proteína.

Se realizó la inmunofluorescencia a las muestras de embriones incubados a temperaturas masculinizantes tratados con dosis de 1.2mg de BPA por huevos para observar una posible disminución de la intensidad de Sox9, ya que fue a esta dosis en la que se presentaron organismos con ovotestis. No se encontraron diferencias en Sox9 entre los individuos incubados a temperatura masculinizante tratados con 1.2mg de BPA y los individuos del grupo control. Estos resultados si bien son cualitativos, sugieren que el BPA no tiene un efecto a nivel genético, ya que es evidente la similitud de la señal de Sox9 en las gónadas tratadas en comparación con los controles.

La figura 18 presenta una inmunofluorescencia de Sox9 y Cq de un control de embriones de la Dra. Verónica Díaz incubados a temperatura masculinizante. Las figuras N2-N3 presentan gónadas pertenecientes a embriones incubados a temperatura masculinizante tratados con 1.2mg de BPA.

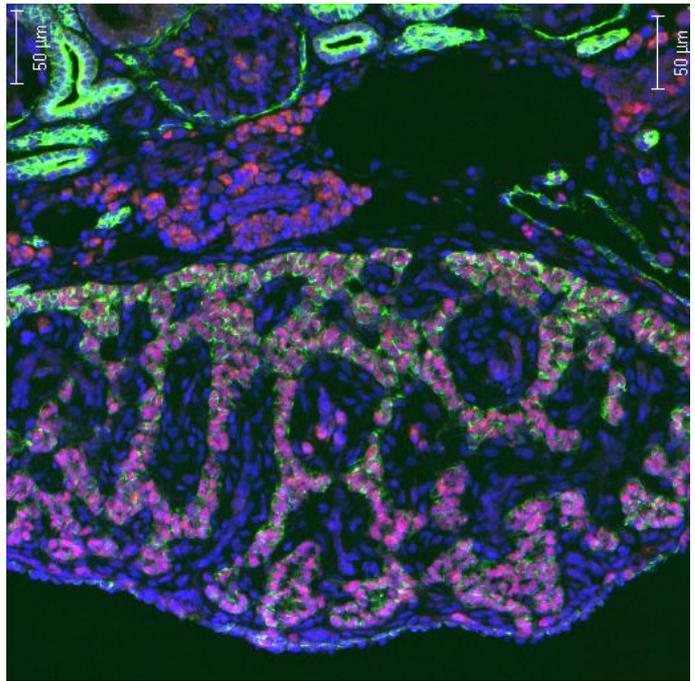


Figura 18. Doble inmunofluorescencia de Sox9 y Citoqueratina (Cq) en gónada de embrión en estadio 26, incubada a temperatura masculinizante perteneciente a un control. La señal roja indica la detección de la proteína de Sox9 mientras que la señal verde indica la presencia de Cq en células epiteliales; los núcleos celulares están marcados con azul. (Foto de la Dra. Verónica Díaz).

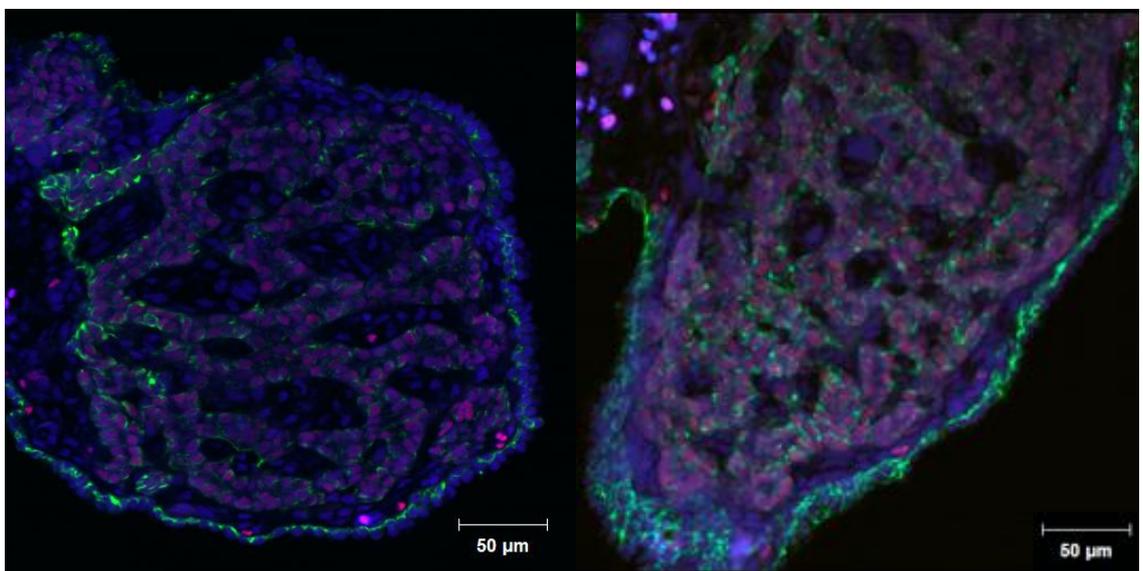


Figura 19. Doble inmunofluorescencia de Sox9 y Citoqueratina (Cq) en gónadas de embriones en estadio 26, incubada a temperatura masculinizante tratadas con 1.2mg de BPA por huevo. La señal roja indica la detección de la proteína de Sox9 mientras que la señal verde indica la presencia de Cq en células epiteliales; los núcleos celulares están marcados con azul.

## ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA MEDIR BPA EN VITELO DE TORTUGA MARINA GOLFINA

Para poder realizar la determinación de niveles de BPA presentes en los huevos de la playa se decidió usar el método de cromatografía líquida de alta densidad HPLC, siendo esta técnica la más utilizada para la medición de BPA en tejidos lipídicos por su alta sensibilidad y especificidad (Mita *et al* 2011).

Hasta el momento, no existe a nivel mundial una técnica estandarizada para cuantificar niveles de BPA en los organismos. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) considera como eficiente una técnica que recupere entre el 40 y el 120% del tóxico. Con la técnica empleada se recuperó el 86.22% del compuesto. Además, con esta se obtuvieron buenos resultados en los parámetros usados para la validación de técnicas de HPLC: linealidad, repetibilidad, precisión, exactitud, especificidad, límite mínimo de detección, límite mínimo de cuantificación y estabilidad del compuesto (EPA act, 2011).

## PRESENCIA DE BPA EN LOS HUEVOS DE LA PLAYA

Con este estudio se demuestra la transmisión de BPA de la tortuga marina golfina a sus embriones. Al contrario de la mayoría de los estudios de contaminantes en huevos de tortuga, en donde se han realizado mediciones en huevos infértiles, en el presente se tomamos huevos al azar poco después de la ovoposición, lo que reduce el sesgo en las concentraciones de los contaminantes encontrados en los muestreos oportunistas.

La acumulación de químicos hidrofóbicos en el ecosistema marino es controlada por una combinación de bioconcentración química y biomagnificación. La biomagnificación se da por la exposición y absorción a través de la dieta, resultando en una concentración más alta que la concentración de la presa consumida, lo que hace que las especies carnívoras y omnívoras almacenen una mayor cantidad de este compuesto (Artham *et al* 2009).

El haber encontrado dentro del mismo nido huevos contaminados con BPA y huevos no contaminados con BPA puede estar influido por distintos factores biológicos como la cantidad de lípidos, la estacionalidad, la reproducción, el tamaño, el ciclo de vida, el uso del hábitat, la migración o el número de huevo formado.

Con el fin de poder comprender los cambios en la concentración de BPA en los huevos, sería importante realizar una determinación de BPA a lo largo de un año para observar si existen cambios en la concentración del compuesto según la temporada, y realizar mediciones a largo plazo para comparar los registros de cada año y ver si el compuesto se mantiene de forma estable o si aumenta año con año.

Además de este estudio, existe otro en el que se midió la transmisión vertical de este compuesto en codornices, en condiciones de laboratorio. Los autores reportaron que la transmisión vertical es baja, por lo que sería interesante tomar una muestra de sangre de la tortuga adulta a la hora de la ovoposición y cuantificar el nivel de BPA en sus huevos. Para esto es necesario estandarizar una técnica de HPLC para determinar BPA en suero de tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Halldin *et al* 2001).

## MORTALIDAD

Junto con un estudio realizado en el caracol *Lymnaea stagnalis*, este es el único estudio que informa sobre un incremento en la mortalidad de los organismos tratados con BPA. En nuestro estudio, las hembras presentaron una menor mortalidad que los machos, y esto podría ser explicado por el tiempo de contacto con el tóxico, siendo mucho menor en las hembras. Para ambos sexos, la mortalidad fue aumentando conforme aumentó la dosis de BPA, hasta aumentar en más de un 12% para los embriones tratados con 1.2mg de BPA incubados a temperatura masculinizante. Sería importante realizar un estudio de mortalidad con dosis similares a las encontradas en el vitelo de los huevos con nuestra técnica de HPLC para estimar si la presencia del tóxico encontrado en forma natural podría estar alterando la viabilidad de los embriones (Yang y Yang 2014).

## MICROSCOPIA DE BARRIDO

El efecto del BPA definitivamente no es evidente como el que se observa en muestras tratadas con 17 $\beta$ Estradiol. Esto únicamente se puede estimar de forma cualitativa puesto que las condiciones del tratamiento de la muestra para su preparación para la microscopía de barrido, así como la orientación de la gónada a la hora de observar las

imágenes en el microscopio hacen que un estudio cuantitativo sea subjetivo. El efecto del 17βEstradiol es claro al observarse claramente una disminución del tamaño de la gónada y no necesita cuantificarse para observar la diferencia. Por el contrario, no se observaron diferencias entre el tamaño de las gónadas tratadas con diferentes dosis de BPA y el grupo control. Con base en estas observaciones podemos decir que el BPA no tienen ningún efecto aparente en el tamaño de las gónadas (Merchant-Larios *et al*, 1997).

## HISTOLOGÍA

Los hallazgos en la evaluación histológica coinciden con un estudio realizado en el cocodrilo *Caiman latirosis*, en cuanto a que se observan cambios histológicos en gónadas de reptiles tratados con BPA. Ambos estudios multiplican la dosis menor de respuesta del 17βEstradiol 100 veces, para embriones incubados a temperatura masculinizante. con lo que los cocodrilos presentan un 100% de reversión sexual de machos a hembras, mientras que en las tortugas únicamente 4 muestras de 9 presentaron un ovotestis, y las 4 pertenecían al mismo nido. El resto de las muestras no presenta ninguna alteración histológica. En dosis más bajas usadas en el estudio del cocodrilo, la histoarquitectura de los testículos también se ve afectada, mientras que para la tortuga no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con las dosis menores (Stoker *et al* 2003).

Para embriones incubados a temperatura feminizante, en el estudio de los cocodrilos no se encontró ningún cambio aparente en la morfología de la gónada. De igual forma las tortugas tratadas con las 3 dosis de BPA incubadas a temperatura feminizante no presentaron diferencias aparentes con respecto al grupo control (Stoker *et al* 2003).

La dosis de BPA necesaria para inducir un efecto como el del 17βEstradiol es de 100 veces mayor en nuestro experimento *in vivo*, igual que para el experimento de los cocodrilos. En contraste, estudios *in vitro* sugieren que esta dosis debe de ser 1000 veces mayor (Stoker *et al* 2003).

## INMUNOFLUORESCENCIA

No existe ningún estudio a nivel genético del efecto del BPA en el desarrollo de la gónada. En el presente estudio se evaluó la presencia o ausencia de SOX9 en las gónadas tratadas con 1.2mg de BPA, ya que fueron las que presentaron alteraciones histológicas importantes. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las muestras tratadas con BPA y los controles, pues SOX9 se encontró en todas las muestras. Contrariamente, en las muestras tratadas con dosis de 17βEstradiol, la cantidad de SOX9 disminuyó. Por lo que se concluye que el BPA no tiene un efecto a nivel genético.

## CONSIDERACIONES FINALES

Hasta el momento, son escasos los trabajos que estudien el efecto del BPA en vertebrados silvestres, menos aún en vertebrados marinos y únicamente existe un reporte en reptiles. Igualmente son muy escasos los estudios que cuantifican la concentración del BPA en la superficie del océano en el giro del pacífico norte, en donde se encuentra la sopa de plástico y por dónde pasa la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Stoker *et al* 2003, EPA acto 2011).

Este trabajo permitió comprobar la hipótesis planteada en que existe una transmisión vertical de BPA de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* adulta a sus embriones, y que el BPA afecta el desarrollo gonadal de los embriones.

Por otra parte, este estudio es el primero que da a conocer valores de las concentraciones de BPA en el vitelo de una especie de fauna silvestre; y es también el primero en aportar evidencia sobre el efecto del BPA con dosis conocidas en el desarrollo gonadal de una tortuga marina.

Nuestros resultados confirman la utilidad de usar especies con determinación sexual por temperatura como un modelo para medir la actividad estrogénica de compuestos *in vivo* y para utilizarlas como biomonitor de disruptores endócrinos en el ambiente acuático.

La mayoría de los estudios hechos con BPA en especies no mamíferas se realizan en ambientes controlados de laboratorio. Nuestro estudio se centra en la población silvestre para poder corroborar si las poblaciones de *Lepidochelys olivacea* están en riesgo de exposición al BPA. Paralelamente realizamos estudios de laboratorio necesarios para determinar el efecto del tóxico en las gónadas de esta especie.

La exposición embrionaria al BPA resulta en numerosas anomalías funcionales y del desarrollo. Su efecto como disruptor se puede reflejar en diversos niveles al influenciar señalizaciones mediadas por estrógenos, y por su capacidad para afectar la hormona tiroidea. El contacto con el BPA durante el desarrollo embrionario puede ocasionar alteraciones tan diversas, que van desde alteraciones morfológicas en el desarrollo gonadal, hasta daños en el sistema nervioso central, que se traducen en una alteración de los comportamientos normales de reproducción, supervivencia y cuidado parental cuando el individuo alcanza la etapa adulta. Esto último por el efecto disruptor en el eje neuroendócrino gonadal. Su amplio espectro de acción, hace que el efecto en muchos tejidos susceptibles a los efectos del BPA no hayan sido estudiados aún; y probablemente estos efectos varíen de acuerdo con la clasificación taxonómica de las especies, por lo que realizar un estudio más amplio de la acción del BPA en la regulación neuroendócrina en la etapa embrionaria resulta sumamente complejo en especies silvestres.

## CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la técnica de HPLC para cuantificar niveles de Bisfenol A en vitelo de tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.
2. Se probó la transmisión vertical de Bisfenol A de las tortugas adultas a los huevos encontrados en la playa.
3. Los machos presentan una mayor mortalidad que las hembras de *Lepidochelys olivacea* cuando están expuestos al Bisfenol A.
4. Conforme se aumenta la dosis de Bisfenol A aumenta la mortalidad para hembras y machos de *Lepidochelys olivacea*.
5. Dosis de 1.2mg de BPA por huevo en embriones incubados a temperatura masculinizante pueden llegar a inducir ovotestis.
6. La dosis que provoca un ovotestis es 100 veces mayor que la dosis de 17BEstradiol ,con la que se observa un efecto en la histoarquitectura de la gónada.
7. En los embriones incubados a temperatura feminizante tratados con Bisfenol A no se presenta ninguna alteración histológica aparente.
8. El Bisfenol A no causa una reducción de tamaño de la gónada como lo causó el 17BEstradiol.
9. La presencia de SOX9 no disminuye para las muestras tratadas con Bisfenol A que presentaron un ovotestis.

## LITERATURA CITADA.

- Abreu-Grobois, A., Plotkin, P., (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group) 2008. *Lepidochelys olivacea*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species.
  - Acevedo, A. Feeding of 3 species of marine turtles on the southwestern platform of Cuba. *Revista De Investigaciones Marinas*. 1984. 5:29.
- Aguirre, A., G. Balazs, B. Zimmerman y F. Galey. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. *Marine Pollution Bulletin* 1994. 28:109-114.
  - Ahnert, A., Borowski, C. Environmental risk assessment of anthropogenic activity in the deep sea. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 2000. 7: 299-315.
- Alam, S. y M. Brim. Organochlorine, PCB, PAH, and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from northwest Florida, USA. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 2000. 35:705-724.
- Alava, J., J. Keller, J. Kucklick, J. Wyneken, L. Crowder y G. Scott. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *Science of the Total Environment* 2006. 367:170-181.
  - Alvarado D., and FIGUEROA L. Comportamiento reproductivo de la tortuga negra *Chelonia agassizi*. *Ciencia y Desarrollo*. 1991. 17(98):43-49.
  - Andrady A.L. *Plastics and the environment*. Publisher John Wiley and sons, 2005.
- Andrady Anthony L., *Microplastics in the marine environment*. *Marine Pollution Bulletin*. 2011.
- Andrew Crain, Marcus Eriksen, Taisen Iguchi, *et al.* An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. , *Reproductive Toxicology* 2007, vol. 24 225-239.

- Artham T, Boble M. Fouling and degradation of polycarbonates in seawater field and lab studies. *Journal of Polymers and the Environment*, 2009.
- Bárcenas Anelisse, Maldonado Adrián. Malformaciones en embrione y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. *Revista Veterinaria México*, 2009.
  - Barnes D.K.A., Galgani F., Thompson R.C., Barlaz M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Trans. R. Soc. B*. 2009.
- Beavers Sally C., Cassano Edward R. Movements & Dive Behaviour of a Male Sea Turtle (*Lepidochelys olivacea*) in the Eastern Tropical Pacific. *Journal of Herpetology* 1996. Vol 30, No.1, pp. 97-104.
- Bergeron, J., D. Crews y J. McLachlan. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives* 1994. 102:780.
- Bern L. Size-related discrimination of nutritive and inert particles by freshwater zooplankton. *J. Plank Res.* 1990.
- Berthold, P. Control of bird migration. 1a. edición. Chapman and Hall, London, England, 1996.
  - Bjorndal, K. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia* 1985. 1985:736-751.
  - Bjorndal, K. y G. Zug. Growth and age of sea turtles. *Biology and conservation of seaturtles*, revised edition. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA 1995. 599-600.
  - Bjorndal, K.A. and J.B.C. Jackson. Roles of sea turtles in marine ecosystems: reconstructing the past. in P.L. Lutz, J. Musick and J. Wyneken (editors), *Biology of Sea Turtles*, volume II. CRC Press, Boca Raton, FL.2003 Pages 259-273.
  - Blight, L.K., Burger, E. Occurrence of plastic particles in seabirds from the eastern North Pacific. *Marine Pollution Bulletin*. 1997 34 (5): 323-325.
  - Bodwen R.M., Harms H.K., Paitz R.T. *et al.* Does optimal egg size vary with demographic stage because of a physiological constraint? *Funct Ecol* 2004.

- Bruland, K.W., Donat, J.R., and Hutchins, D.A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnology and Oceanography* 36 (8): 1555-1577.
- Caut S. Guirlet, Angulo E., Das E. Isotope Analysis reveals foraging area dichotomy for atlantic leatherback turtles. *Plos One* 2008.
  - CITES Appendices I, II and III. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>
- Colborn, T., F. Vom Saal y A. Soto. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 1993 101:378.
- CONABIO. *Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica* (CDB). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, agosto 2009. [http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion\\_internacional/doctos/4oInforme\\_CONABIO.pdf](http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/4oInforme_CONABIO.pdf)
- Crain A, Eriksen M, Iguchi T, *et al.* An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 2007. Vol. 24: 225-239.
- Crisp, T., E. Clegg, R. Cooper, W, *et al.* Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives* 1998. 106:11.
- Daoji LI and Daler Dag. Ocean Pollution from land-based sources: East China Sea, China. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 33(1):107-113. 2004. <http://dx.doi.org/10.1579/0044-7447-33.1.107>
- David Cantonwine<sup>1</sup>, John D Meeker, Howard Brisa, *et al.* Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study . *Environmental Health* 2010.
  - Debier C. Pomeroy P.P., Dupont C. *et al.* Mobilization of PCBs from blubber to blood in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) during the post-weaning fast. *Aquatic Toxicology* . 2006.

- Derraik José, The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 2008.
- Derraik, Jose G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 44, 2002. 842-854
- Eckert, Karen L., Bjorndal, Karen A., Abreu-Grobois, Alberto., *et al.* Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. 2000 ISBN 2-8317-0580-0.
  - Ehrhart, L. A review of sea turtle reproduction. en K. A. Bjorndal, Editor. *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 1981. Pp. 29-38 .
- Etnoyer Peter, Canny Daid, Mate Bruce R, *et al.* Sea-surface temperature gradients across blue whale and sea turtle foraging trajectories off the Baja California Peninsula, Mexico. *Deep Sea Research II* . January 2006.
  - EPA. Marine debris in the North Pacific: a summary of existing information and indentification of data gaps. 2011.
  - Fernie, K., J. Smits, G. Bortolotti y D. Bird. In ovo exposure to polychlorinated biphenyls: Reproductive effects on second-generation American kestrels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2001. 40:544-550.
  - Fossete S., Ferraoli S., Tanaka H., *et al.* Dispersal and dive patterns in gravid leatherback turtles during the nesting season in French Guiana. *Marin Ecology Prog.* 2007.
  - Foster P.M.D., Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phalates esters. *Int. F. Androl*, 2006.
  - Fox, G. Effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife in Canada: Past, present and future. *Water Quality Research Journal of Canada* 2001. 36:233-251.
- Frazier, J. (Ed.) International instruments and marine turtle conservation. *Journal of International Wildlife Law & Policy*. 2002. 5:1-207.

- Frazier, J. Prehistoric and Ancient Historic Interactions Between Humans and Marine Turtles. In: P. L. Lutz, J. A. Musick & J. Wyneken (Eds.) *The Biology of Sea Turtles Vol 2*. Boca Raton, Florida, CRC Press. 2003. pp. 1-38.
- Frederick, and Ana M. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Human, Theo Colborn, . *Environmental Health Perspectives* 1993.
- Fritts, T. y M. McGehee. Effects of petroleum on the development and survival of marine turtle embryos. 1989.
- Gregory MR, Bryan PG. Pelagic plastic and other seaborne persistent synthetic debris: a review of southern hemisphere perspectives. In: coe JM, Rogers DB, editors. *Marine debris-sources, impacts and solutions*. New York: Springer-Verlag (1997).
  - Guillette Jr, T. Gross, G. Masson, *et al.* Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 1994. 102:680.
  - Guillette Jr, L., D. Pickford, D. Crain, A. Rooney y H. Percival. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and comparative endocrinology* 1996. 101:32-42.
  - Guirlet, E., K. Das y M. Girondot. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology* 2008. 88:267-276.
  - Guirlet, E., K. Das, J. Thomé y M. Girondot. Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting in French Guiana. *Chemosphere* 2010. 79:720-726.
  - Guraya, S. *Ovarian follicles in reptiles and birds*. Springer-Verlag, Berlin, Germany 1989.
- Hall, RJ. *Effects of Environmental Contaminants on Reptiles: A Review*. USFWS Special Scientific Report-Wildlife. 1998. No.228: 1-12.

- Hall RJ, and Henry PFP. Assessing Effects of Pesticides on Amphibians and Reptiles: Status and Needs. *Herpetological Journal*. 1992. 2:65-71.
  - Halldin Krister, Berg Cecilia, Bergman Ake, Distribution of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in quail eggs, embryos and laying birds and studies on reproduction variables in adults following in ovo exposure. *Developmental toxicology* 2001. 2001.
- Hamann, M., C. Limpus y J. Whittier. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 2002. 172:485-493.
  - Hamann, M., C. J. Limpus y J. M. Whittier. Seasonal variation in plasma catecholamines and adipose tissue lipolysis in adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*). *General and comparative endocrinology* 2003. 130:308-316.
- Herbst L Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 1994. Pp 389-425.
- Herbst L H, Klein P A. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. *Environmental Health Perspectives*. 1995. Pp 103, 27-30.
  - Hopkins, W., B. Staub, J. Baionno, B. Jackson, J. Roe y N. Ford. Trophic and maternal transfer of selenium in brown house snakes (*Lamprophis fuliginosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004. 58:285-293.
- Hutchinson, J. y M. Simmonds. A review of the effects of pollution on marine turtles. Greenpeace Internacional, London 1991.
- Instituto Nacional de Ecología, I. N. d. E., . Programa Ambiental de México. INE- SEMARNAP. Programa Nacional de Protección y Conservación de Tortugas Marinas: Resultados 1992-1997, México 1999.
- Johnson LL, Lomax DP, Myers MS, *et al.* Xenoestrogen exposure and effects in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, WA. *Aquat Toxicol*. 2008 Jun 2;88(1):29-38.

- Kelly, S., K. Eisenreich, J. Baker, y C. Rowe. Accumulation and maternal transfer of polychlorinated biphenyls in snapping turtles of the upper Hudson River, New York, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008. 27:2565-2574.
- Kimitaka Pingqing. Ubiquity of Bisphenol A in the atmosphere. *Environmental Pollution*. 2010.
- Licht, P. 1982. Endocrine patterns in the reproductive cycle of turtles. *Herpetologica* 38:51- 61.
- Luschi Paolo, Hayes Graeme C., Papi Floriano. A review of long-distance currents by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *Oikos* Vol. 103, 2003. pp. 293-302.
- Lutz, P.L. Studies on the ingestion of plastic and latex by sea turtles. In: *Proc. Int. Conf. Marine Debris*. 1990.
- Lutz, P., J. Musick, y J. Wyneken. 1996. *The biology of sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Márquez, R., A. Villanueva-O., C. Peñaflores-S. Sinopsis de datos biológicos sobre la Tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829). INP/52 Sinopsis sobre las Pesca. Instituto Nacional de Pesca, México, DF. 1976.
- Márquez, R. 1990. *FAO Species Catalogue; Sea Turtles of the World*. An annotated and illustrated catalogue of the sea turtle species known to date. *FAO Fisheries Synopsis* 125:1-81.
- Márquez, R. 1996. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. La ciencia desde México. Fondo de la cultura económica. México.
- Márquez, R., Peñaflores, C., Vasconcelos, J.C. Olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) show signs of recovery at La Escobilla, Oaxaca. *Marine Turtle Newsletter* 1996. 73:5-7.
- Márquez, R. (1995). *Tortugas Marinas*. En: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E. & Niem, V.H. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca*. Pacífico Centro-Oriental. Volúmen III. Vertebrados, parte 2. Roma, FAO. Vol. III: 1653-1663.

- Márquez, R. (2002). Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de cultura económica. 3a edición. 198 pp.
  - Márquez, R., Carrasco, M.A., Jiménez, M.C., Peñaflores-S, C., Bravo-G, R. Kemp's and olive ridley sea turtles population status. In: Coyne, M.S., Clark, R.D. (Comps.), Proceedings of the Twenty-First Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-528. U.S. Department of Commerce, National Marine Fisheries Service, Miami, FL. 2005. Pp. 237-239.
- Márquez, R., Jiménez, M.C. (2010). El posible efecto del cambio climático en las tortugas marinas. En: Botello, A.V., Villanueva-Fragoso, S., Gutiérrez, J. y Rojas Galaviz, J.L. (eds). Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático. SEMARNAT-INE, UNAM-ICMyL, Universidad Autónoma de Campeche. 97-112.
- Merchant-Larios, H., Villalpando, Fierro, I., Centeno Urruiza, B. Gonadal Morphogenesis under Controlled Temperature in the Sea Turtle. *Lepidochelys olivacea* Herpetological Monographs, 1989. 3:43-61.
- Merchant-Larios H, Ruiz-Ramirez S, Moreno-Mendoza N, Marmolejo-Valencia A. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. Gen Comp Endocrinol. 107: 373-385 (1997).
- Merchant-Larios, H. Determining hatchling sex. En: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. (eds.). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication 1999, No. 4.
- Meylan Peter A., Meylan Anne B., Gray Jefnnifer A. The ecology and migration of sea turtles. Bulletin of the American Museum of Natural History No. 367, 70pp. Agosto 2011.
  - Mita L, Bianco M, Viggiano E. Bisphenol A content in fish caught in two different sites of the Tyrrhenian Sea (Italy) Chemosphere 82 (2011) 405-410.
  - Montenegro, S. B., N. G. Bernal & A. Martinez G., 1986. Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, en la costa de Oaxaca, Méx. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM, México., 13(2):121-32

- Moore Charles, Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long term threat. Algalita MARine Research Foundation, 2009.
- Mortimer, J.A., Donnelly, M. & Plotkin, P. Sea Turtles. *In: Sheppard, C. (ed.) Seas at the Millenium: an Environmental Evaluation.* Elsevier Press 2000., Chapter 3. p. 59-71.
- NOAA. **The nation's ocean and coastal agency:** Supporting coastal communities, promoting a robust economy, and protecting coastal and marine ecosystems <http://oceanservice.noaa.gov/welcome.html>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.DIARIO OFICIAL. Jueves 30 de diciembre de 2010.
- Páez-Osuna F., Calderón Campuzano M.F., Soto-Jiménez M.F., *et al.* Lead in blood and eggs of the sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from the Eastern Pacific: Concentration, isotopic composition and maternal transfer. Marine Pollution Bulletin . 2010. Vol. 60. pp. 433-439.
- Pagano, J., P. A. Rosenbaum, R. N. Roberts, G. M. Sumner y L. V. Williamson. 1999. Assessment of Maternal Contaminant Burden by Analysis of Snapping Turtle Eggs. Journal of Great Lakes Research 25:950-961.
- Peñaflores-Salazar, C., Vasconcelos-Pérez, J., Albavera-Padilla, E. and Jiménez Quiroz, M.C. 2001. Especies sujetas a protección especial. Tortuga golfina. In: M.A. Cisneros, L.F. Beléndez, E. Zárate, M.T. Gaspar, L.C. López, C. Saucedo and J. Tovar (eds), *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo: 1999-2000*, pp. 1001-1021. Instituto Nacional de la Pesca/SEMARNAT. México.
  - Plotkin Pamela T., Nomadic behaviour of the highly migratory of the olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in the eastern tropical Pacific Ocean. Plotkin Pamela T., Endangered Species Research. Vol. 13, 2010. pp. 33-40.
- Polovina Jeffrey J., Balazs George H., Howell Evan A., *et al.* Forage and migration habitat of loggerhead (*Caretta caretta*) and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles in the Central North Pacific Ocean. Fisheries Oceanography 13:1, 2004. pp. 36-51.

- Pritchard, P. 2002. Global Status of Sea Turtles: An Overview. Inter-American Convention for the Protection and Conservation of Sea Turtles, First Conference of the Parties (COP1IAC), . Inter-American Convention for the Protection and Conservation of Sea Turtles, San José, Costa Rica.
- Pugh, R. y P. Becker. 2001. Sea turtle contaminants: A review with annotated bibliography. Report NISTIR 6700. SC:National Institute of Standards and Technology, Charleston USA.
  - Rauschenberg R.H., Sepulveda M.S., Wiebe J.J., *et al*, Predicting contaminant body burdens from eggs and evidence of maternal transfer in Alligator mississippiensis. The Society for Environmental Toxicology and Chemistry 23rd Annual Meeting. 2002.
    - Rauschenberger, R., M. Sepúlveda, J. Wiebe, N. Szabo y T. Gross. Predicting maternal body burdens of organochlorine pesticides from eggs and evidence of maternal transfer in Alligator mississippiensis. Environmental Toxicology and Chemistry 2004 23:2906-2915.
    - Rivalan P., Prevot-Juliard A.C., Choquet R., *et al*. Trade-off between current reproductive effort and delay to next reproduction in the leatherback sea turtle. Oecologia 2005.
    - Russell, R., F. Gobas y G. Haffner. Role of chemical and ecological factors in trophic transfer of organic chemicals in aquatic food webs. Environmental Toxicology and Chemistry 1999. 18:1250-1257.
  - Sajiki, Yonekubo. Leaching of Bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. Chromosphere, 2003.
  - Sánchez, R., Reyes, G. Ixtapilla, Michoacán: recolonization, wandering or a new olive Ridley nesting site? Book of Abstracts. 18th International Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. 1998. Mazatlán, México.
  - Saquing Jovita M., Teuten Emma L., Knappe Detelef R. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society, 2009.
  - Schumacher, I., L. Herbst, M. Kerben, L. Ehrhart, D. Bagley y P. Klein. Vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). Página 284. Citeseer, USA.

- Schwarz, R. y H. Lee. 1980. Biological processes affecting the distribution of pollutants in marine sediments. Part 1. Accumulation, trophic transfer, biodegradation and migration. Pp. 533-553 en J. Baker, editor. Contaminants and sediments, 2, Análisis, chemistry, biology. Ann arbor Science, Springfield. U.S.A.
- Shannon M, Eisenreich L, Baker J, *et al.* Accumulation and maternal transfer of polychlorinated biphenyls in snapping turtles of the upper hudson river, New York, US. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008. Vol. 27, No. 12, pp. 2565–2574.
- Sheehan, D., E. Willingham, D. Gaylor, J. Bergeron y D. Crews. 1999. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? Environmental Health Perspectives 107:155.
- Sight, H.B., Brune W.H., Crawford J.H., *et al.*, Chemistry and transport of pollution over the Gulf of Mexico and the Pacific: spring 2006 INTEX-B campaign overview and first results. Atmos. Chem. Phys., 2009, 9, 2301-2318.
- Snover, M. 2002. Growth and ontogeny of sea turtles using skeletochronology: Methods, validation and application to conservation. Duke University, Durham NC, USA.
- Stoker C, Rey F, Rodriguez H, *et al.* Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol General and Comparative Endocrinology 133 2003. 287–296
- Stoker Cora, Beldoménico Pablo, Bosquiazzo Verónica, *et al.* Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. General and Comparative Endocrinology (2008).
- Storelli, Maria. Perrone, Veronica., Marcotrigiano, Giuseppe. Organochlorine contamination (PCBs and DDTs) in deep-sea fish from the Mediterranean sea. Marine pollution bulletin 2007;54(12):1968-71.
- Suedel, B., J. Boraczek, R. Peddicord, P. Clifford, y T. Dillon. 1994. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. Reviews of environmental contamination and toxicology 136:21.

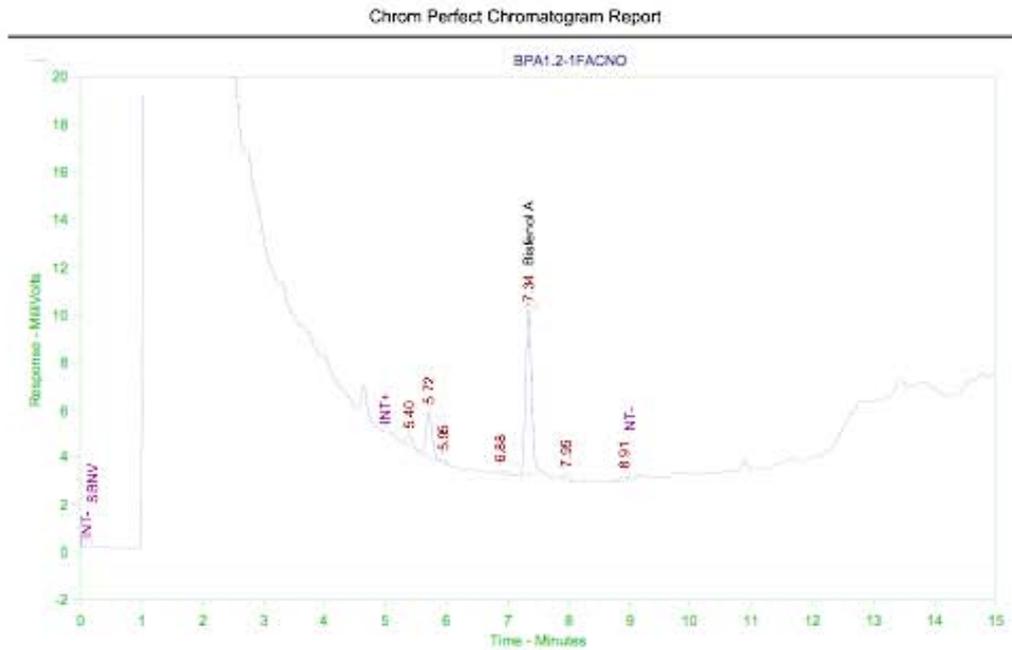
- Swimmer Yonat, Mc Naughton Lianne, Foley David, *et al.* Movements of olive ridley sea turtles *Lepidochelys olivacea* and associated oceanographic features as determined by improved light-based geolocation. Endangered Species Research, Published online february 11, 2009.
  - Vom Saal, Weishons. Large effects for small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. Environ. Research, 2005.
- Vonier, P., D. Crain, J. McLachlan, L. Guillette Jr y S. Arnold. 1996. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. Environmental Health Perspectives 104:1318.
- Walser, Manfred, Pohlmann Kirsten, Neumann Christian. The value of our oceans. The economic benefits of marine biodiversity and healthy ecosystems. WWF Germany, Frankfurt am Main. June 2008. [http://awsassets.panda.org/downloads/wwf\\_value\\_of\\_our\\_oceans\\_report\\_sep08.pdf](http://awsassets.panda.org/downloads/wwf_value_of_our_oceans_report_sep08.pdf)
- Ward J.R., Lafferty K.D., The elusive baseline of marine disease: are disease in ocean ecosystems increasing? Plos biology 2004.
- Wibbels, T., D. Owens, C. Limpus, P. Reed y M. Amoss Jr. 1990. Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). General and comparative endocrinology 79:154.
- Willingham, E. y D. Crews. 1999. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. General and comparative endocrinology 113:429-435.
- Willingham, E., T. Rhen, J. Sakata y D. Crews. 2000. Embryonic treatment with xenobiotics disrupts steroid hormone profiles in hatchling red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Environmental Health Perspectives 108:329.
- Witzel, W. Selective predation on large cheloniid sea turtles by tiger sharks *Galeocerdo cuvier*. Japanese Journal of Herpetology. 1987. 12:22-29.
- Zarlf C., Matthies M., Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic? Marine Pollution Bulletin 2010. Vom Saal, Weishons. Large

effects for small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ. Research*, 2005.

- Zarlf C., Matthies M., Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic? *Marine Pollution Bulletin* 2010.
- Zhanga Jie, Cookeb Gerard, Curranb Ivan, *et al.* GC-MS analysis of bisphenol A in human placental and fetal liver samples. *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 209-214.
- Zintek Lawrence, Kosempa Michael, Wesolowski Dennis. Proposed and Recently Approved ASTM Methods for Nonvolatile Compounds Analyzed by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. US EPA Region 5 Chicago Regional Laboratory Rob Rothman and Oba Vincent, ORD- National Homeland Security Research Center, United States Environmental Protection Agency.

# ANEXOS

## Anexo 1. Cromatograma con una cantidad conocida del estándar de BPA.



Sample Name = BPA1.2-1FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenol Mayo2013\Bisfenol A.0056.RAW

Method File Name = C:\Metodos\Bisfenol A.1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A cal\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 6/3/2013 4:05:07 PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.40		0.00	0.000	3244	4.782	BB	0.16
2	5.72		0.00	0.000	13350	19.679	BB	0.11
3	5.95		0.00	0.000	856	1.261	BB	0.13
4	6.88		0.00	0.000	1701	2.508	BB	0.26
5	7.34	Bisfenol A	0.96	100.000	45797	67.508	BB	0.10
6	7.95		0.00	0.000	1634	2.409	BB	0.19
7	8.91		0.00	0.000	1258	1.854	BB	0.22

Total Area = 67639.21

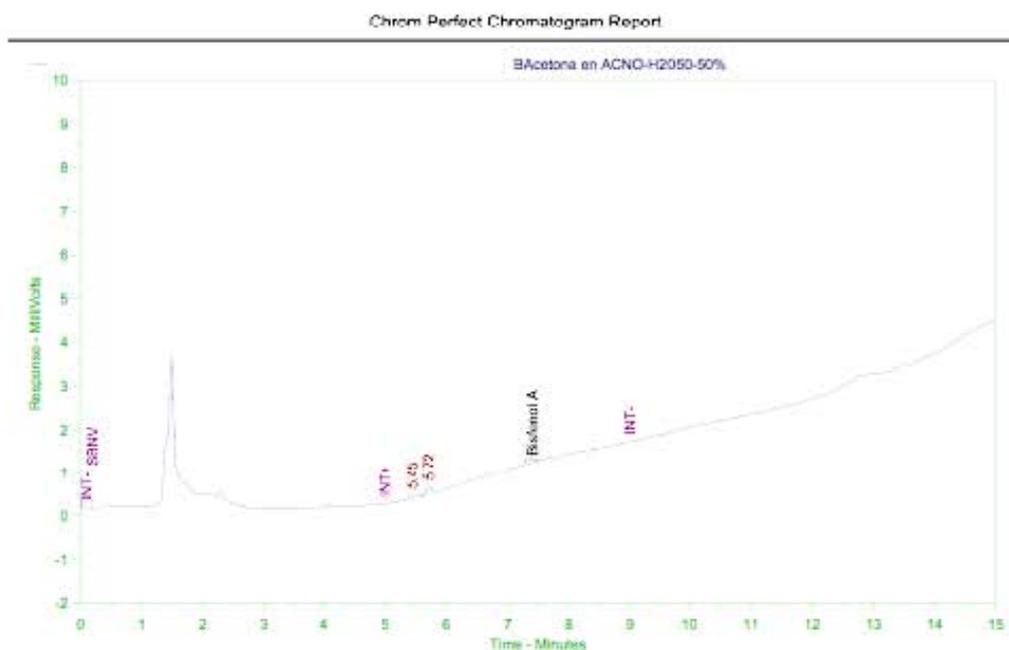
Total Height = 10019.21

Total Amount = 0.964086

Anexo 2. Cuadro de Gradiente HPLC

<b>Tiempo</b>	<b>Flujo</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>	<b>Curva</b>
Inicio	1.0mL/min	60	40	*
10	“	25	75	6
11	“	25	75	6
12	“	0	100	1
22	“	0	100	6
23	“	60	40	1
30	“	60	40	6

### Anexo 3. Cromatograma realizado para el blanco de acetona.



Sample Name = BAcetona en ACNO-H2O50-50%

Instrument = HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenol A Junio 2013\Bisfenol A.0012.RAW

Method File Name = C:\Metodos\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo 1D.CAL

Date Taken (end) = 6/12/2013 4:55:51 PM

Method Version = 1

Calibration Version = 2

Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.45		0.00	N/A	415	29.429	BB	0.17
2	5.72		0.00	N/A	996	70.571	BB	0.19

Total Area = 1411.00x

Total Height = 191.598x

Total Amount = 0

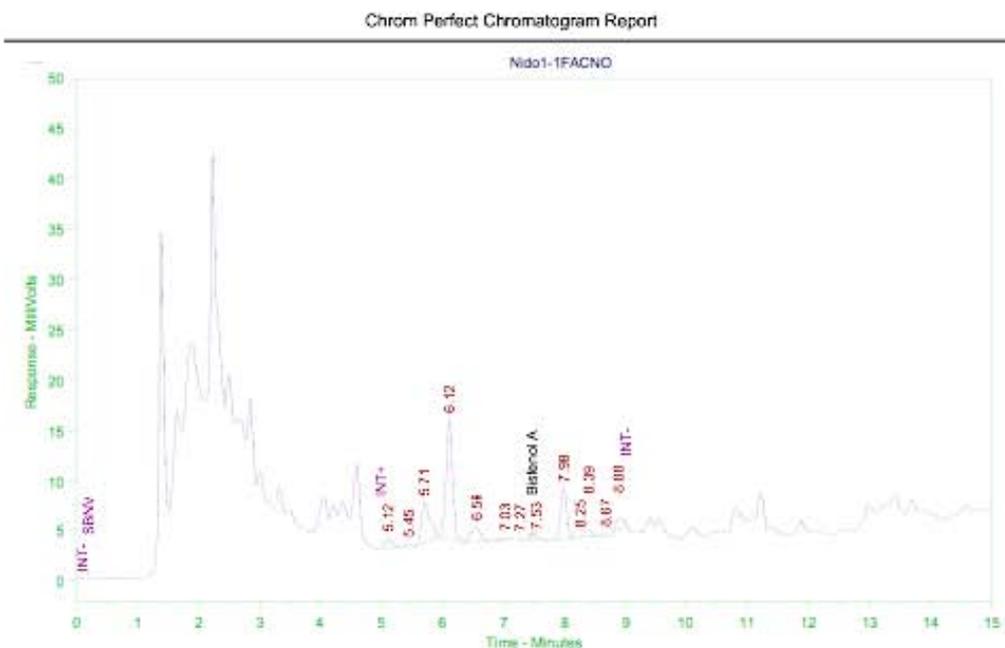
Anexo 4. Experimento de BPA en diferentes grupos dependiendo de la dosis de BPA.

Temperatura de incubación	Grupo experimental	Etapas de desarrollo al experimento	Etapas de desarrollo al sacrificio.	No. total de animales examinados.
26oC	.3mg BPA	24	26	12
26oC	.6mg BPA	24	26	12
26oC	1.2mg BPA	24	26	12
33oC	Control sin vehículo	24	26	12
33oC	Control con vehículo (EtOH75)	24	26	12
33oC	.3mg BPA	24	26	12
33oC	.6mg BPA	24	26	12
33oC	1.2mg BPA	24	26	12

Anexo 5. Cromatogramas de las muestras.

<b>Nido</b>	<b>Muestra</b>	<b>Cromatograma</b>
1	1	Anexo 6
1	2	Anexo 7
1	3	Anexo 8
1	4	Anexo 9
1	5	Anexo 10
1	6	Anexo 11
2	1	Anexo 12
2	2	Anexo 13
2	3	Anexo 14
2	4	Anexo 15
2	5	Anexo 16
2	6	Anexo 17
3	1	Anexo 18
3	2	Anexo 19
3	3	Anexo 20
3	4	Anexo 21
3	5	Anexo 22
3	6	Anexo 23
4	1	Anexo 24
4	2	Anexo 25
4	3	Anexo 26
4	4	Anexo 27
4	5	Anexo 28
4	6	Anexo 29

Anexo 6. Cromatograma del a muestra 1 del nido 1.



Sample Name = Nido1-1FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0033.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1b.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 16:35PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.12		0.00	N/A	6640	3.196	BB	0.13
2	5.45		0.00	N/A	1461	0.713	BB	0.15
3	5.71		0.00	N/A	39258	18.895	BB	0.19
4	6.12		0.00	N/A	89118	42.893	BB	0.12
5	6.56		0.00	N/A	14934	7.188	BB	0.16
6	7.03		0.00	N/A	967	0.466	BB	0.16
7	7.27	Bisfenol A	0.00	N/A	231	0.111	BB	0.09
8	7.53		0.00	N/A	2201	1.059	BB	0.20
9	7.98		0.00	N/A	37241	17.924	BB	0.11
10	8.25		0.00	N/A	618	0.298	BB	0.09
11	8.39		0.00	N/A	4392	2.114	BB	0.12
12	8.67		0.00	N/A	808	0.389	BB	0.11
13	8.88		0.00	N/A	9882	4.756	BB	0.16

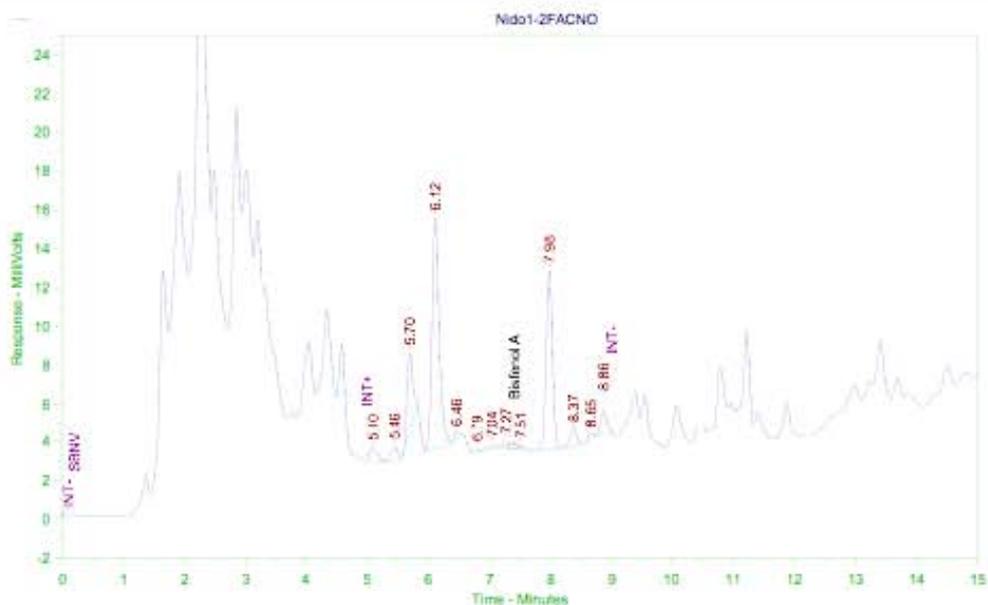
Total Area = 207770.1

Total Height = 26143.7

Total Amount = 0

# Anexo 7. Cromatograma de la muestra 2 del nido 1.

## Chrom Perfect Chromatogram Report



Sample Name = Nido1-2FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0034.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 5:40PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

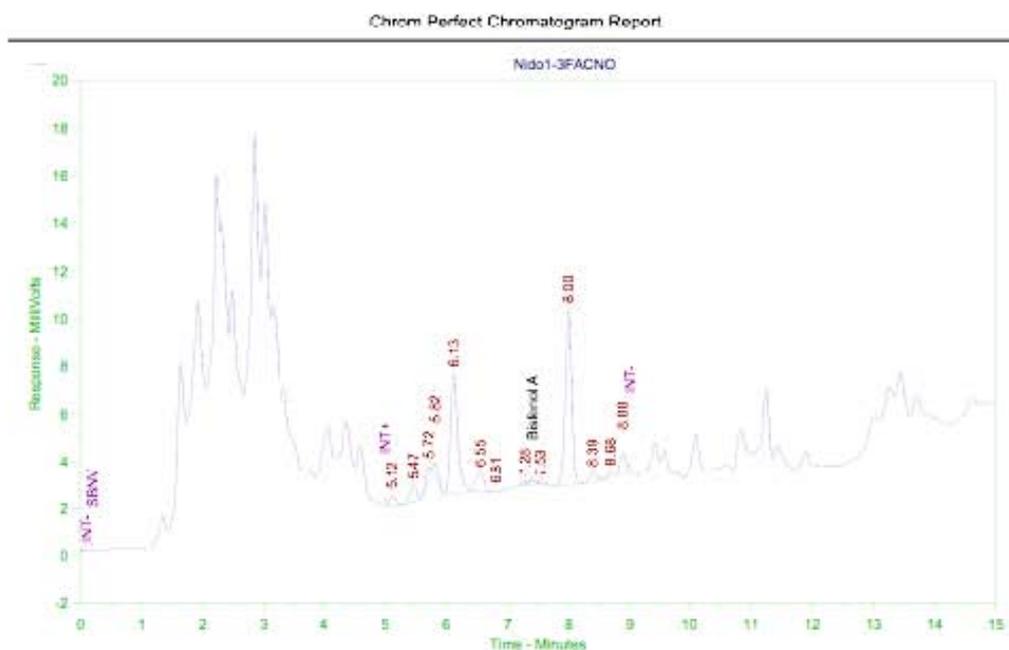
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.10		0.00	N/A	5763	2.513	BB	0.15
2	5.46		0.00	N/A	4950	2.158	BB	0.12
3	5.70		0.00	N/A	26857	11.710	BB	0.18
4	6.12		0.00	N/A	97620	42.565	BB	0.12
5	6.46		0.00	N/A	1963	0.856	BB	0.12
6	6.79		0.00	N/A	749	0.327	BB	0.10
7	7.04		0.00	N/A	2074	0.904	BB	0.22
8	7.27		0.00	N/A	2261	0.966	BB	0.11
9	7.51		0.00	N/A	1528	0.666	BB	0.12
10	7.98		0.00	N/A	67023	29.224	BB	0.11
11	8.37		0.00	N/A	7328	3.195	BB	0.13
12	8.65		0.00	N/A	1745	0.761	BB	0.12
13	8.86		0.00	N/A	9479	4.133	BB	0.12

Total Area = 229341.1

Total Height = 30559.1

Total Amount = 0

# Anexo 8. Cromatograma de la muestra 3 del nido 1.



Sample Name = Nido1-3FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0036.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 7:55:46PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

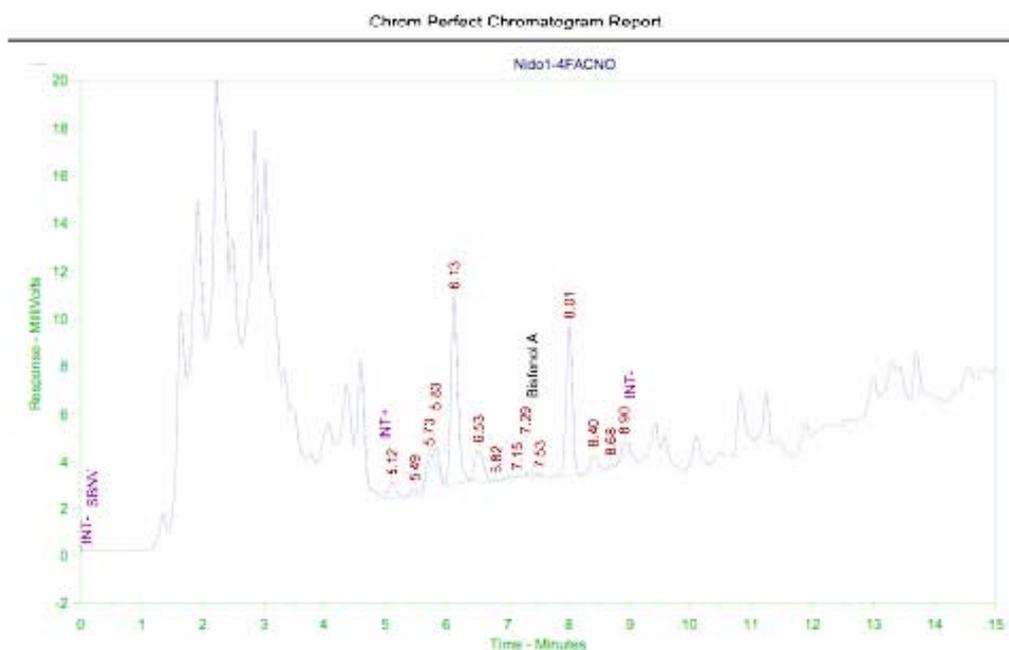
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.12		0.00	N/A	2982	2.270	BB	0.13
2	5.47		0.00	N/A	5285	4.023	BB	0.15
3	5.72		0.00	N/A	2719	2.070	BB	0.10
4	5.82		0.00	N/A	3712	2.826	BB	0.13
5	6.13		0.00	N/A	42317	32.216	BB	0.12
6	6.55		0.00	N/A	7812	5.795	BB	0.16
7	6.81		0.00	N/A	260	0.198	BB	0.11
8	7.28		0.00	N/A	843	0.642	BB	0.12
9	7.53		0.00	N/A	639	0.487	BB	0.21
10	8.00		0.00	N/A	54104	41.189	BB	0.11
11	8.39		0.00	N/A	3642	2.772	BB	0.20
12	8.68		0.00	N/A	1137	0.866	BB	0.13
13	8.88		0.00	N/A	6104	4.647	BB	0.13

Total Area = 131354.

Total Height = 17077.14

Total Amount = 0

# Anexo 9. Cromatograma de la muestra 4 del nido 1.



Sample Name = Nido1-4FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0037.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 8:33:37PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

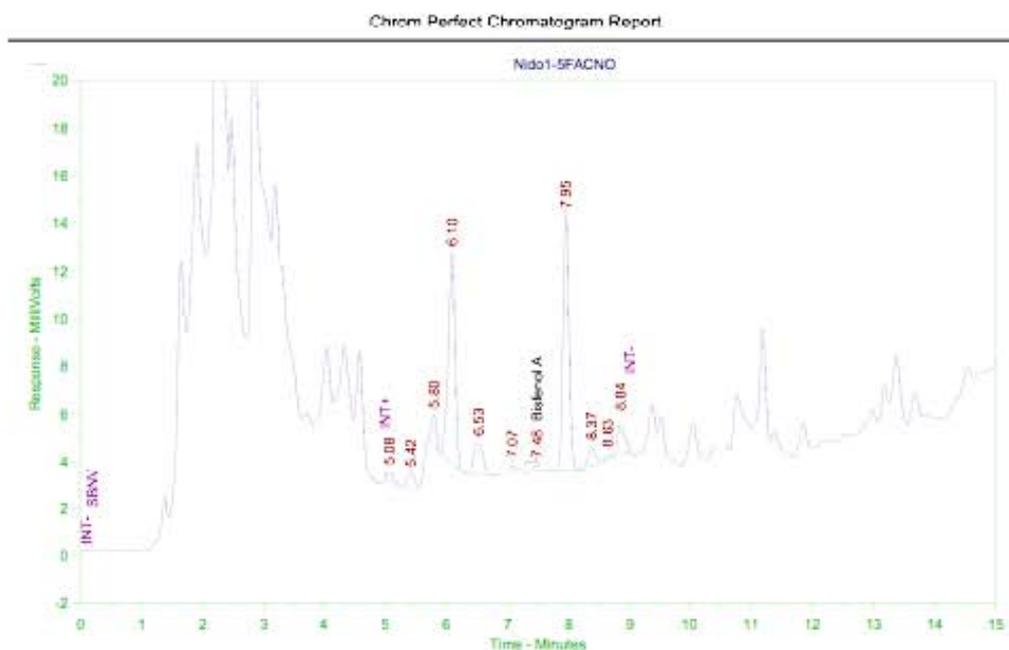
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.12		0.00	N/A	4920	3.230	BB	0.12
2	5.49		0.00	N/A	2210	1.451	BB	0.14
3	5.73		0.00	N/A	2893	1.899	BB	0.10
4	5.83		0.00	N/A	4825	3.167	BB	0.13
5	6.13		0.00	N/A	62304	40.896	BB	0.12
6	6.53		0.00	N/A	14130	9.275	BB	0.17
7	6.82		0.00	N/A	353	0.232	BB	0.12
8	7.15	Bisfenol A	0.00	N/A	897	0.589	BB	0.23
9	7.29		0.00	N/A	344	0.226	BB	0.08
10	7.53		0.00	N/A	701	0.460	BB	0.17
11	8.01		0.00	N/A	46566	30.566	BB	0.11
12	8.40		0.00	N/A	7014	4.604	BB	0.16
13	8.68		0.00	N/A	809	0.531	BB	0.13
14	8.90		0.00	N/A	4378	2.873	BB	0.16

Total Area = 152345.1

Total Height = 19718.0

Total Amount = 0

Anexo 10. Cromatograma de la muestra 5 del nido 1.



Sample Name = Nido1-5FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenol Mayo2013\Bisfenol A.0039.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/29/2013 06:06PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

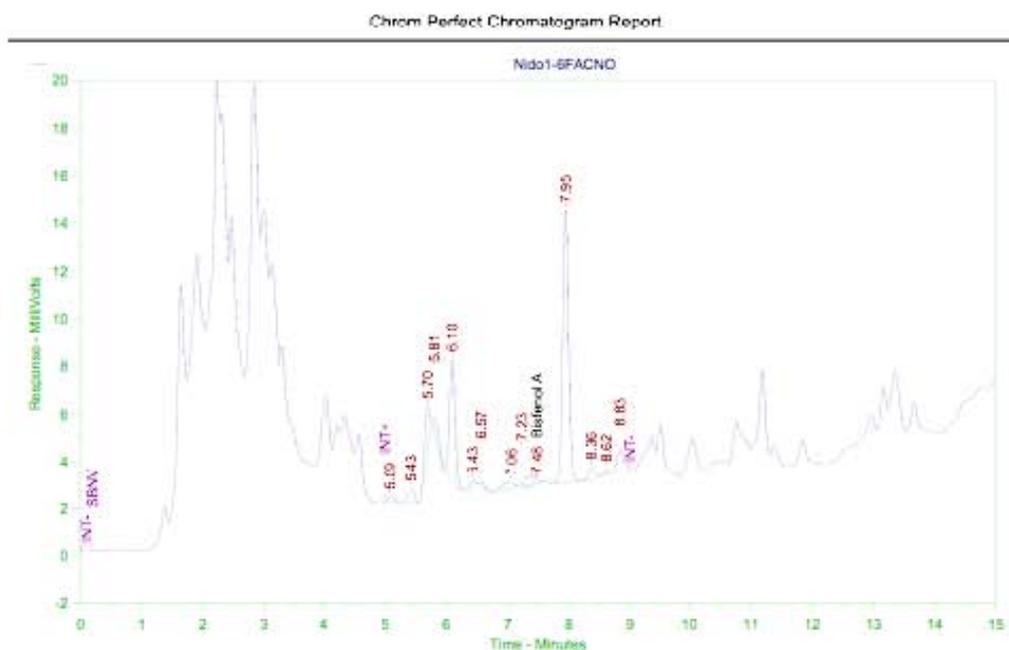
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.08		0.00	0.000	3417	1.730	BB	0.14
2	5.42		0.00	0.000	4959	2.510	BB	0.13
3	5.80		0.00	0.000	8129	4.115	BB	0.12
4	6.10		0.00	0.000	69110	34.988	BB	0.12
5	6.53		0.00	0.000	15507	7.850	BB	0.19
6	7.07		0.00	0.000	1418	0.718	BB	0.16
7	7.48	Bisfenol A	0.16	100.000	1780	0.901	BB	0.16
8	7.95		0.00	0.000	74857	37.897	BB	0.11
9	8.37		0.00	0.000	6609	3.346	BB	0.18
10	8.63		0.00	0.000	889	0.450	BB	0.11
11	8.84		0.00	0.000	10852	5.494	BB	0.16

Total Area = 197527.1

Total Height = 25924.1

Total Amount = 0.162089

# Anexo 11. Cromatograma de la muestra 6 del nido 6.



Sample Name = Nido1-6FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0040.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo10.CAL

Date Taken (end) = 5/29/2013 8:39:48PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

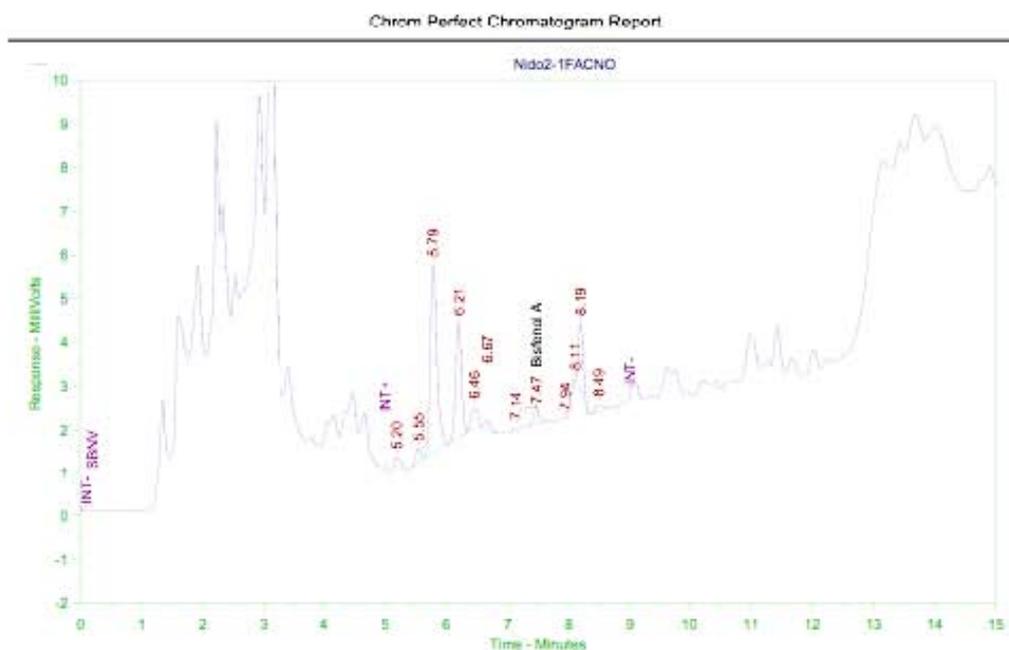
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.09		0.00	0.000	1934	1.258	BB	0.16
2	5.43		0.00	0.000	4589	2.984	BB	0.13
3	5.70		0.00	0.000	11157	7.255	BB	0.13
4	5.81		0.00	0.000	4301	2.797	BB	0.13
5	6.10		0.00	0.000	33125	21.540	BB	0.11
6	6.43		0.00	0.000	1064	0.692	BB	0.13
7	6.57		0.00	0.000	1060	0.689	BB	0.13
8	7.06		0.00	0.000	3066	1.994	BB	0.28
9	7.23		0.00	0.000	641	0.417	BB	0.12
10	7.48	Bisfenol A	0.15	100.000	1018	0.662	BB	0.14
11	7.95		0.00	0.000	78675	51.160	BB	0.11
12	8.36		0.00	0.000	4433	2.882	BB	0.15
13	8.62		0.00	0.000	1175	0.764	BB	0.11
14	8.83		0.00	0.000	7544	4.905	BB	0.13

Total Area = 153781

Total Height = 22477.6

Total Amount = 0.148205

## Anexo 12. Cromatograma de la muestra 1 del nido 2.



Sample Name = Nido2-1FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0025.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/27/2013 02:00PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

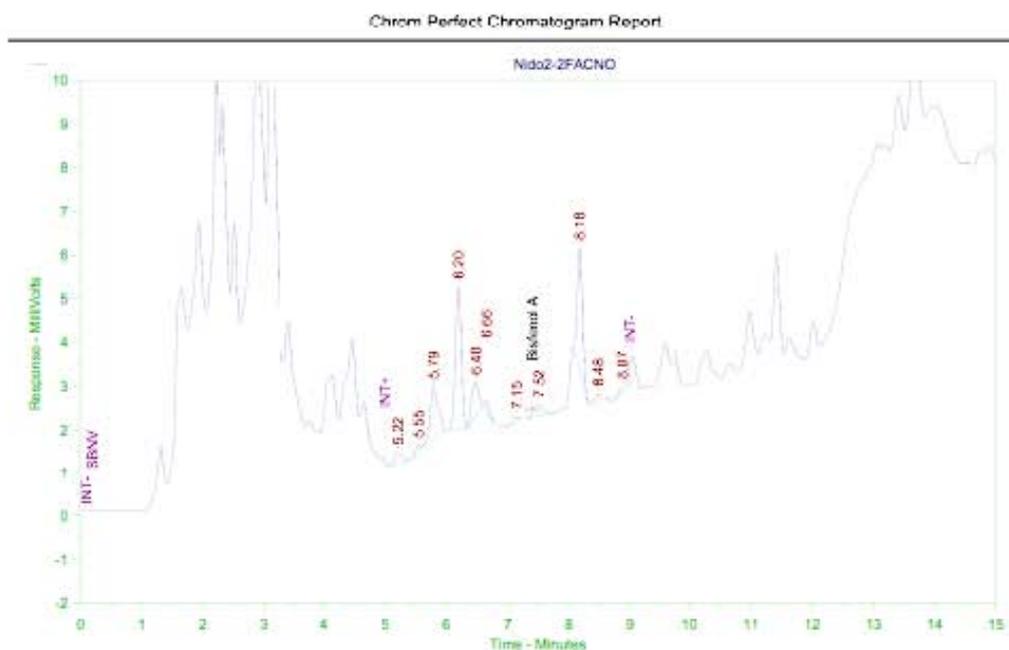
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.20		0.00	0.000	2861	3.850	BB	0.15
2	5.55		0.00	0.000	1969	2.649	BB	0.15
3	5.79		0.00	0.000	33184	44.652	BB	0.12
4	6.21		0.00	0.000	17835	23.998	BB	0.11
5	6.46		0.00	0.000	4016	5.404	BB	0.14
6	6.67		0.00	0.000	1232	1.657	BB	0.15
7	7.14		0.00	0.000	426	0.574	BB	0.14
8	7.47	Bisfenol A	0.17	100.000	2003	2.695	BB	0.15
9	7.94		0.00	0.000	1	0.001	BB	0.01
10	8.11		0.00	0.000	908	1.221	BB	0.08
11	8.19		0.00	0.000	6762	11.790	BB	0.11
12	8.49		0.00	0.000	1121	1.508	BB	0.20

Total Area = 74317.76

Total Height = 10380.;

Total Amount = 0.16615

## Anexo 13. Cromatograma de la muestra 2 del nido 2.



Sample Name = Nido2-2FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenol Mayo2013\Bisfenol A.0026.RAW

Method File Name = C:\Metodos\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/27/2013 3:38:14PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

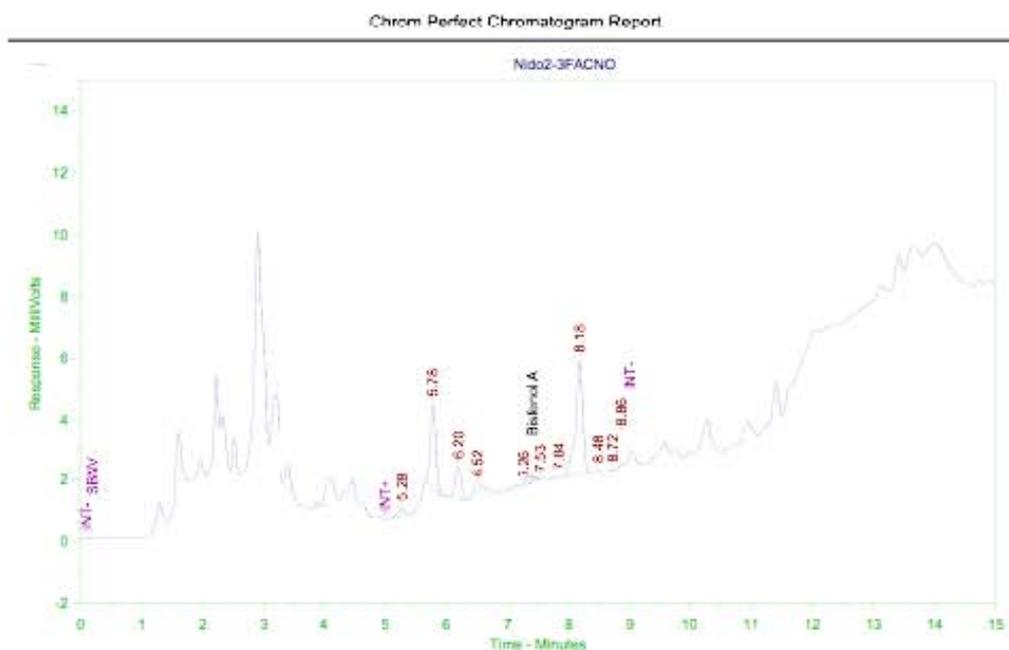
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.22		0.00	N/A	2618	4.003	BB	0.20
2	5.55		0.00	N/A	852	0.997	BB	0.10
3	5.79		0.00	N/A	11100	16.971	BB	0.18
4	6.20		0.00	N/A	22056	33.724	BB	0.11
5	6.48		0.00	N/A	5959	9.112	BB	0.19
6	6.66		0.00	N/A	1109	1.696	BB	0.12
7	7.15		0.00	N/A	585	0.895	BB	0.15
8	7.52	Bisfenol A	0.00	N/A	3134	4.793	BB	0.23
9	8.18		0.00	N/A	16542	25.294	BB	0.11
10	8.48		0.00	N/A	878	1.342	BB	0.13
11	8.87		0.00	N/A	767	1.173	BB	0.13

Total Area = 65400.91

Total Height = 9194.05

Total Amount = 0

# Anexo 14. Cromatograma de la muestra 3 del nido 2.



Sample Name = Nido2-3FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0027.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/27/2013 4:19:44PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

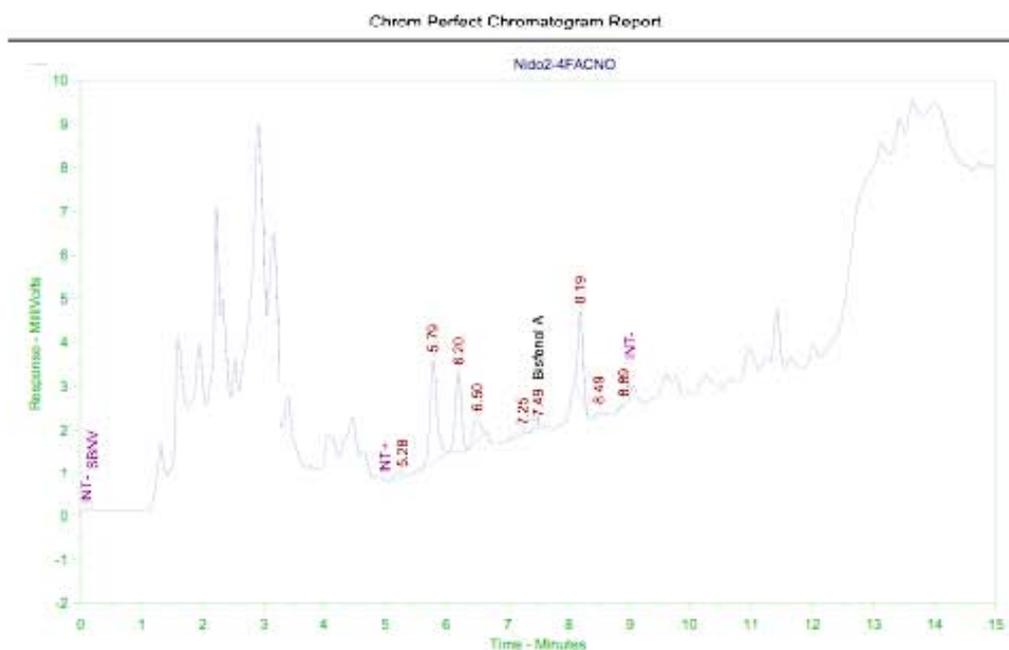
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.28		0.00	N/A	1950	3.069	BB	0.14
2	5.78		0.00	N/A	18223	28.679	BB	0.11
3	6.20		0.00	N/A	7143	11.242	BB	0.11
4	6.52		0.00	N/A	2558	4.025	BB	0.20
5	7.26		0.00	N/A	1061	1.670	BB	0.26
6	7.53		0.00	N/A	410	0.645	BB	0.13
7	7.84		0.00	N/A	361	0.568	BB	0.15
8	8.18		0.00	N/A	30641	48.222	BB	0.11
9	8.48		0.00	N/A	595	0.937	BB	0.15
10	8.72		0.00	N/A	139	0.218	BB	0.11
11	8.86		0.00	N/A	461	0.725	BB	0.12

Total Area = 63542.4

Total Height = 6465.62

Total Amount = 0

## Anexo 15. Cromatograma de la muestra 4 del nido 2.



Sample Name = Nido2-4FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0028.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/27/2013 4:55:04PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

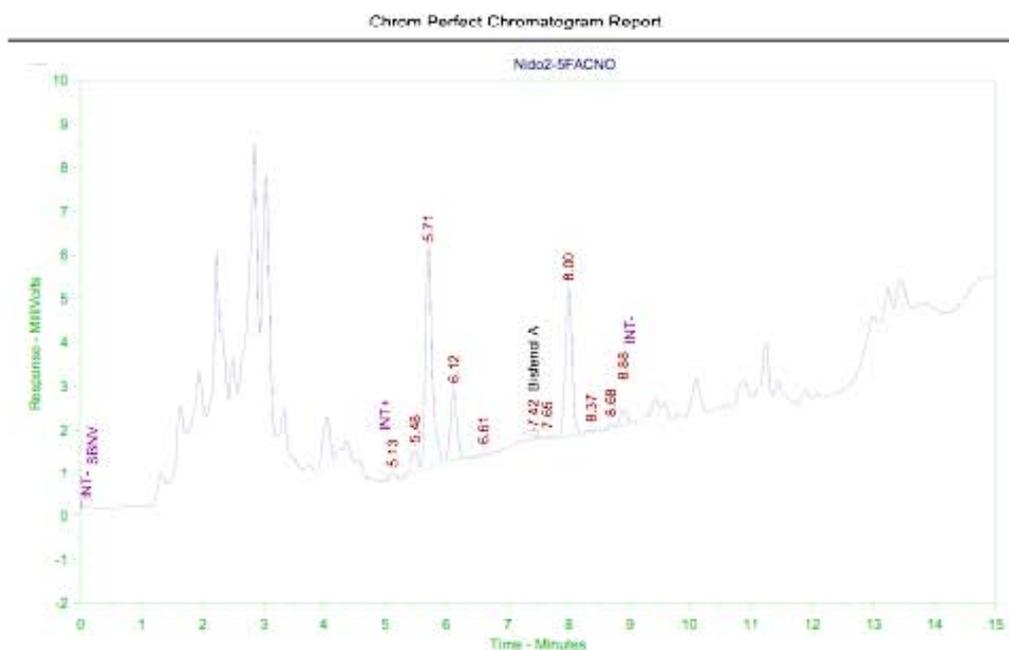
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.28		0.00	0.000	1222	2.397	BB	0.22
2	5.79		0.00	0.000	19228	37.715	BB	0.13
3	6.20		0.00	0.000	12165	23.861	BB	0.11
4	6.50		0.00	0.000	4474	8.775	BB	0.21
5	7.25		0.00	0.000	697	1.367	BB	0.18
6	7.49	Bisfenol A	0.15	100.000	935	1.833	BB	0.19
7	8.19		0.00	0.000	11200	21.970	BB	0.11
8	8.49		0.00	0.000	706	1.366	BB	0.18
9	8.89		0.00	0.000	356	0.697	BB	0.10

Total Area = 50981.6

Total Height = 6904.46

Total Amount = 0.146681

## Anexo 16. Cromatograma de la muestra 5 del nido 2.



Sample Name = Nido2-5FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0031.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 5:10:29PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

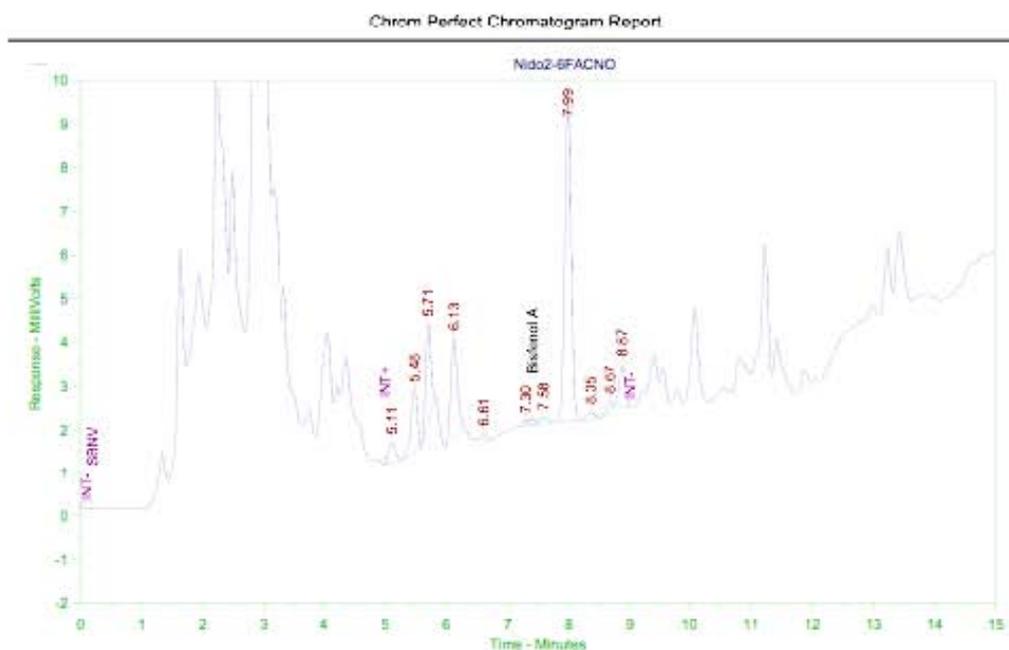
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.13		0.00	0.000	1138	1.294	BB	0.13
2	5.48		0.00	0.000	5073	5.770	BV	0.17
3	5.71		0.00	0.000	39107	44.485	VB	0.11
4	6.12		0.00	0.000	11823	13.448	BB	0.12
5	6.61		0.00	0.000	763	0.890	BB	0.21
6	7.42	Bisfenol A	0.14	100.000	583	0.663	BB	0.12
7	7.65		0.00	0.000	303	0.345	BB	0.17
8	8.00		0.00	0.000	25532	29.043	BB	0.12
9	8.37		0.00	0.000	478	0.544	BB	0.18
10	8.68		0.00	0.000	558	0.635	BB	0.13
11	8.88		0.00	0.000	2534	2.883	BB	0.12

Total Area = 87911.21

Total Height = 11437.16

Total Amount = 0.140276

Anexo 17. Cromatograma de la muestra 6 del nido 2.



Sample Name = Nido2-6FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0032.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/28/2013 5:45:59PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

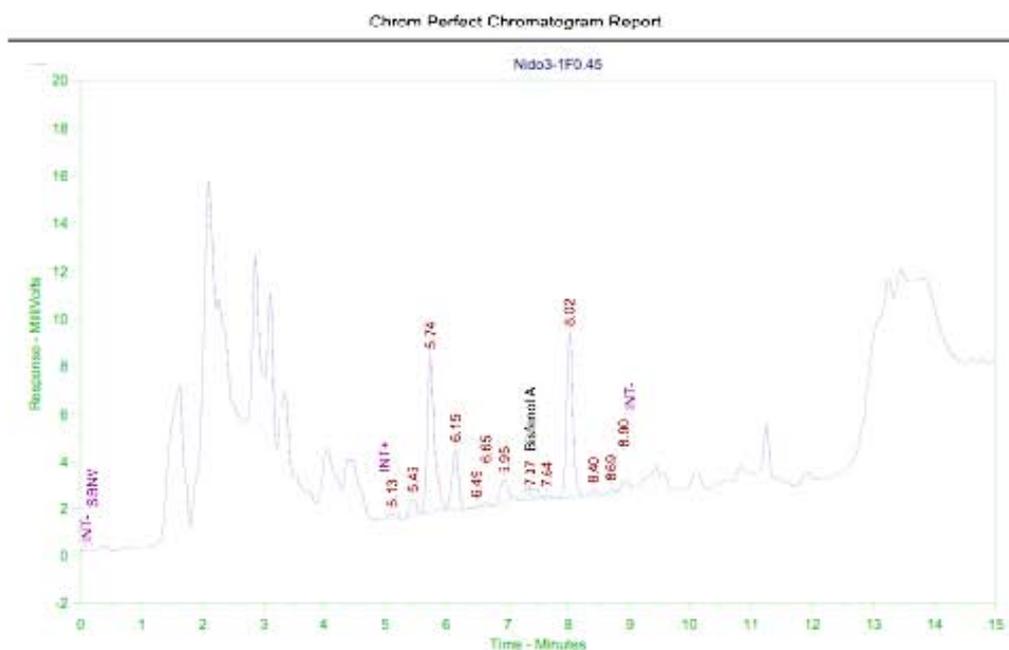
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.11	NT*	0.00	N/A	3472	3.147	BB	0.13
2	5.48		0.00	N/A	10262	9.299	BB	0.12
3	5.71		0.00	N/A	13978	12.666	BB	0.12
4	6.13		0.00	N/A	17095	15.491	BB	0.13
5	6.81		0.00	N/A	807	0.731	BB	0.11
6	7.30	Bisfenol A	0.00	N/A	752	0.682	BB	0.13
7	7.58		0.00	N/A	1230	1.115	BB	0.19
8	7.99		0.00	N/A	53691	48.652	BB	0.11
9	8.35		0.00	N/A	1468	1.348	BB	0.21
10	8.67	NT*	0.00	N/A	1125	1.019	BB	0.12
11	8.87		0.00	N/A	6456	5.850	BB	0.11

Total Area = 110357.1

Total Height = 15506.0

Total Amount = 0

# Anexo 18. Cromatograma de la muestra 1 del nido 3.



Sample Name = Nido3-1F0.45

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\BisfenolA.0011.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\BisfenolA.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/21/2013 02:51PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

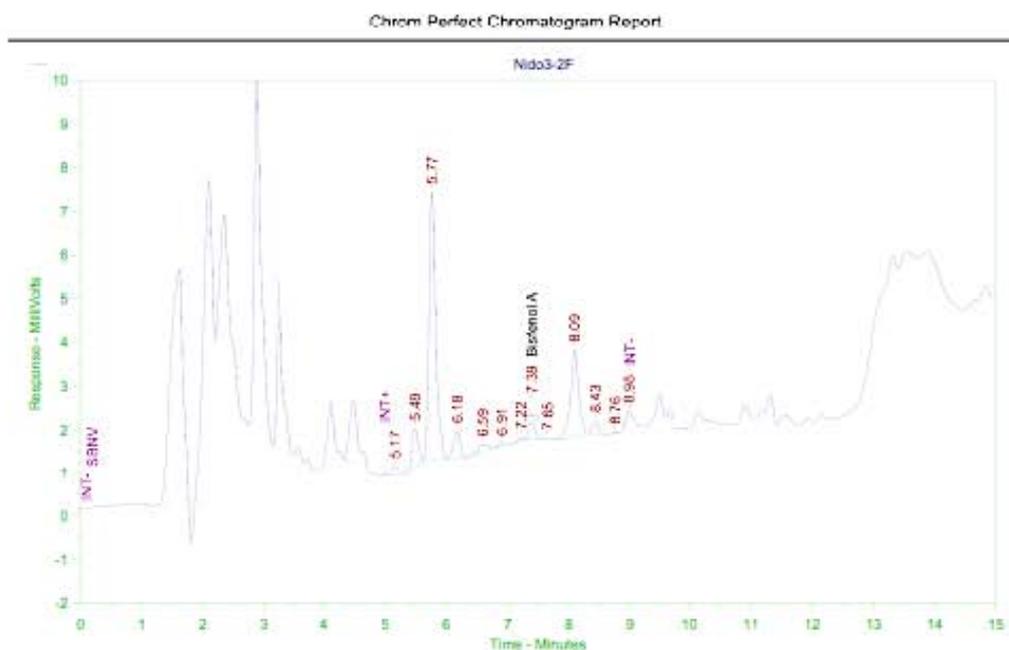
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.13		0.00	0.000	1558	1.060	BB	0.16
2	5.46		0.00	0.000	5743	3.908	BB	0.16
3	5.74		0.00	0.000	53142	36.159	BB	0.12
4	6.15		0.00	0.000	18890	12.853	BB	0.11
5	6.49		0.00	0.000	403	0.274	BB	0.12
6	6.65		0.00	0.000	958	0.652	BB	0.09
7	6.95		0.00	0.000	8118	5.524	BB	0.18
9	7.37	Bisfenol A	0.16	100.000	1628	1.108	BB	0.12
10	7.64		0.00	0.000	1517	1.032	BB	0.17
11	8.02		0.00	0.000	49670	33.796	BB	0.11
12	8.40		0.00	0.000	1690	1.150	BB	0.13
13	8.69		0.00	0.000	1012	0.688	BB	0.13
14	8.90		0.00	0.000	2640	1.796	BB	0.14

Total Area = 146968.1

Total Height = 19302.7

Total Amount = 0.159321

# Anexo 19. Cromatograma de la muestra 2 del nido 3.



Sample Name = Nido3-2F

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0017.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A cal\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/22/2013 09:04PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

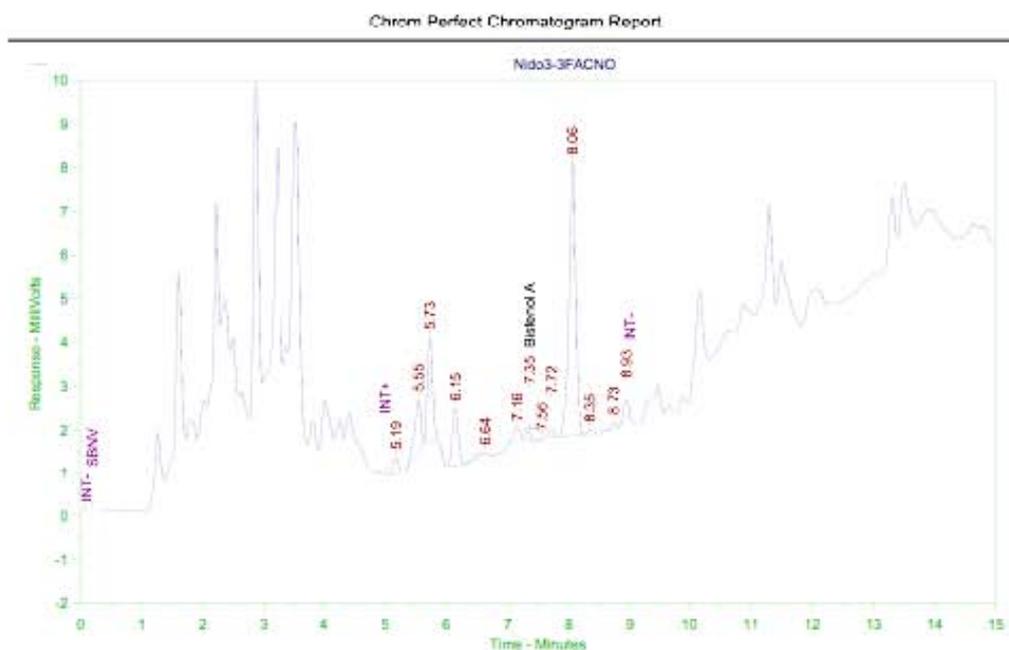
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.17		0.00	0.000	1905	2.155	BB	0.13
2	5.49		0.00	0.000	6781	7.671	BB	0.14
3	5.77		0.00	0.000	47242	53.437	BB	0.11
4	6.18		0.00	0.000	4743	5.365	BB	0.12
5	6.59		0.00	0.000	1842	2.083	BB	0.24
6	6.91		0.00	0.000	439	0.496	BB	0.15
7	7.22		0.00	0.000	412	0.466	BB	0.10
8	7.39	Bisfenol A	0.19	100.000	3156	3.570	BB	0.11
9	7.65		0.00	0.000	304	0.344	BB	0.14
10	8.09		0.00	0.000	18862	21.109	BB	0.14
11	8.43		0.00	0.000	2150	2.431	BB	0.11
12	8.76		0.00	0.000	121	0.137	BB	0.12
13	8.98		0.00	0.000	650	0.736	BB	0.08

Total Area = 88407.00

Total Height = 11119.00

Total Amount = 0.167161

Anexo 20. Cromatograma de la muestra 3 del nido 3.



Sample Name = Nido3-3FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0018.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/22/2013 5:13:50PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

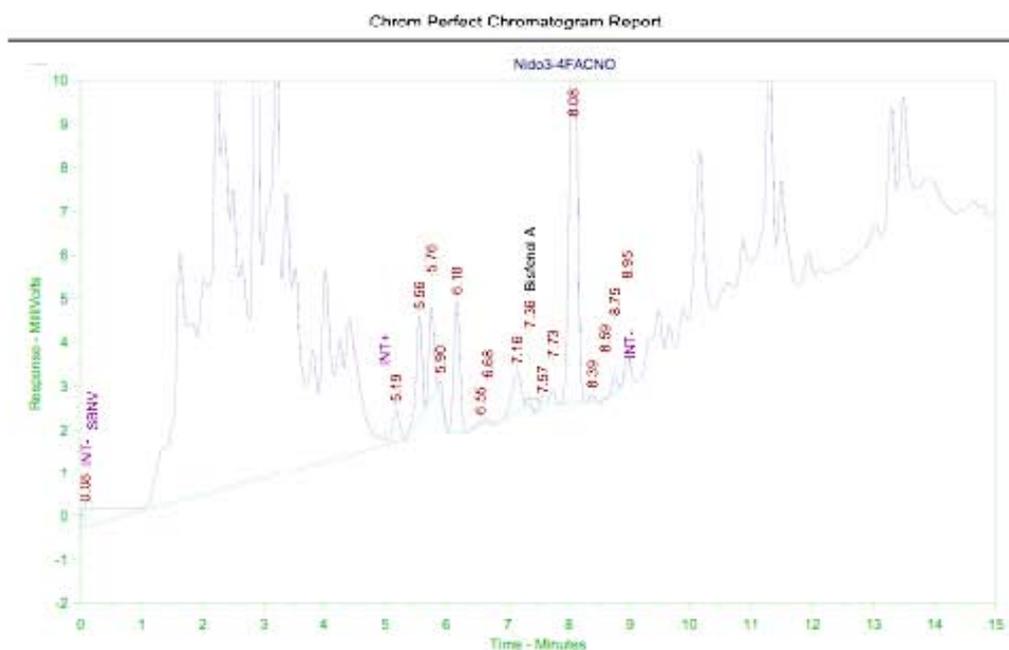
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.19		0.00	0.000	2684	2.922	BB	0.11
2	5.55		0.00	0.000	9128	9.939	BB	0.14
3	5.73		0.00	0.000	14058	15.307	BB	0.10
4	6.15		0.00	0.000	9024	9.826	BB	0.11
5	6.64		0.00	0.000	772	0.840	BB	0.19
6	7.16		0.00	0.000	2356	2.566	BB	0.14
7	7.35	Bisfenol A	0.15	100.000	979	1.066	BB	0.10
8	7.56		0.00	0.000	90	0.098	BB	0.08
9	7.72		0.00	0.000	1141	1.243	BB	0.11
10	8.06		0.00	0.000	47550	51.773	BB	0.11
11	8.35		0.00	0.000	664	0.723	BB	0.11
12	8.73		0.00	0.000	844	0.919	BB	0.12
13	8.93		0.00	0.000	2552	2.779	BB	0.11

Total Area = 91842.4

Total Height = 12926.0

Total Amount = 0.147493

## Anexo 21. Cromatograma de la muestra 4 del nido 3.



Sample Name = Nido3-4FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bifenil Mayo2013\Bisfenol A.0019.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/22/2013 04:45PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

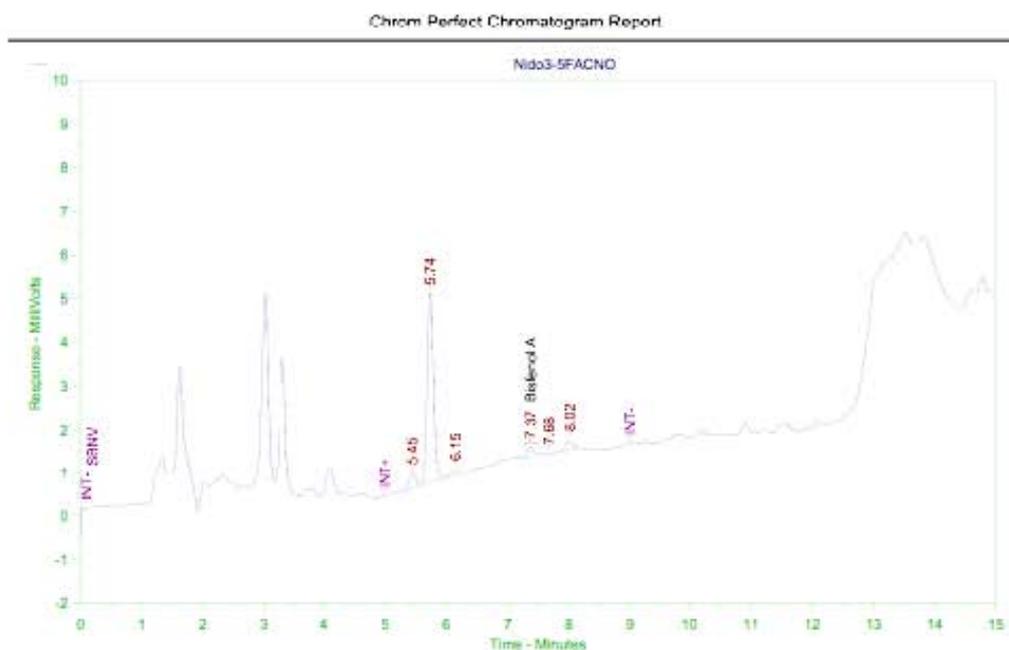
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	0.08		0.00	0.000	2332	1.345	BV	0.09
2	5.19		0.00	0.000	5460	3.148	VB	0.11
3	5.56		0.00	0.000	15362	8.867	BB	0.12
4	5.76		0.00	0.000	11312	6.521	BB	0.10
5	5.90		0.00	0.000	1842	1.062	BB	0.10
6	6.18		0.00	0.000	20692	11.929	BB	0.11
7	6.55		0.00	0.000	277	0.159	BB	0.11
8	6.68		0.00	0.000	641	0.369	BB	0.11
9	7.16		0.00	0.000	9371	5.402	BB	0.19
10	7.36	Bisfenol A	0.14	100.000	364	0.210	BB	0.08
11	7.57		0.00	0.000	707	0.407	BB	0.12
12	7.73		0.00	0.000	1904	1.098	BB	0.11
13	8.08		0.00	0.000	97098	55.976	BB	0.11
14	8.39		0.00	0.000	851	0.491	BB	0.12
15	8.59		0.00	0.000	211	0.122	BB	0.09
16	8.75		0.00	0.000	2428	1.399	BB	0.11
17	8.95		0.00	0.000	2592	1.484	BB	0.10

Total Area = 173461

Total Height = 24369.0

Total Amount = 0.13629

Anexo 22. Cromatograma de la muestra 5 del nido 3.



Sample Name = Nido3-5FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0020.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/22/2013 8:35:51PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

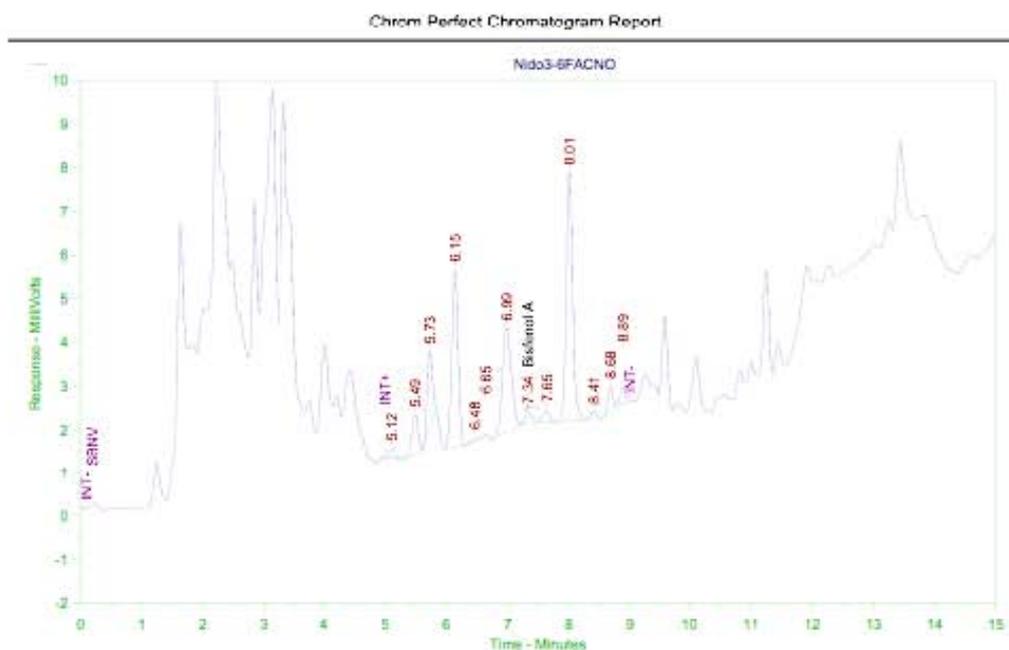
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.45		0.00	0.000	2866	7.262	BV	0.14
2	5.74		0.00	0.000	31865	80.243	VB	0.11
3	6.15		0.00	0.000	1113	2.820	BB	0.14
4	7.37	Bisfenol A	0.16	100.000	1780	4.512	BB	0.13
5	7.68		0.00	0.000	165	0.419	BB	0.16
6	8.02		0.00	0.000	1872	4.745	BB	0.15

Total Area = 39461.9:

Total Height = 5442.81:

Total Amount = 0.162093:

Anexo 23. Cromatograma de la muestra 6 del nido 3.



Sample Name = Nido3-6FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0021.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/22/2013 7:15:38PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

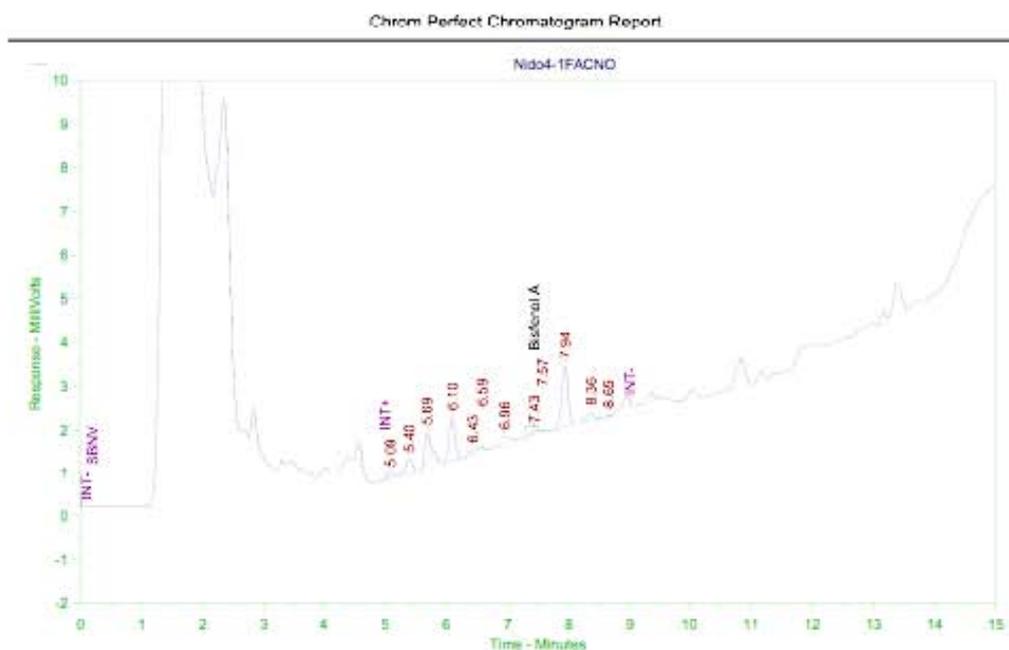
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.12		0.00	0.000	1558	1.242	BB	0.12
2	5.49		0.00	0.000	6693	5.335	BB	0.13
3	5.73		0.00	0.000	10344	8.246	BB	0.13
4	6.15		0.00	0.000	28972	23.096	BB	0.11
5	6.48		0.00	0.000	690	0.550	BB	0.16
6	6.65		0.00	0.000	643	0.513	BB	0.11
7	6.99		0.00	0.000	23877	19.034	BB	0.17
8	7.34	Bisfenol A	0.16	100.000	1818	1.449	BB	0.12
9	7.65		0.00	0.000	2310	1.841	BB	0.13
10	8.01		0.00	0.000	41799	33.321	BB	0.11
11	8.41		0.00	0.000	1242	0.990	BB	0.12
12	8.68		0.00	0.000	3184	2.538	BB	0.11
13	8.89		0.00	0.000	2315	1.846	BB	0.11

Total Area = 125443.4

Total Height = 16791.4

Total Amount = 0.162770

# Anexo 24. Cromatograma de la muestra 1 del nido 4.



Sample Name = Nido4-1FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0041.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/29/2013 7:18:43PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

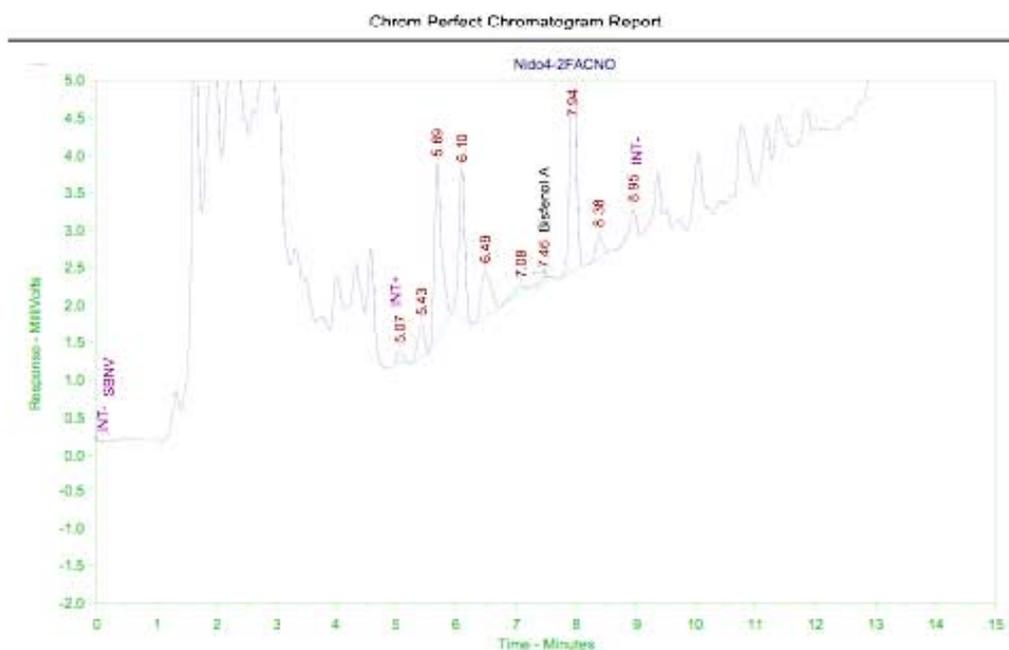
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.09		0.00	0.000	849	2.842	BV	0.19
2	5.40		0.00	0.000	3148	10.535	VB	0.15
3	5.89		0.00	0.000	3807	12.740	BB	0.15
4	6.10		0.00	0.000	6889	23.055	BB	0.11
5	6.43		0.00	0.000	362	1.211	BB	0.12
6	6.59		0.00	0.000	370	1.238	BB	0.10
7	6.86		0.00	0.000	2250	7.530	BB	0.33
8	7.43	Bisfenol A	0.14	100.000	479	1.603	BB	0.14
9	7.57		0.00	0.000	125	0.419	BB	0.08
10	7.94		0.00	0.000	9962	33.340	BB	0.12
11	8.36		0.00	0.000	1522	5.095	BB	0.17
12	8.65		0.00	0.000	118	0.394	BB	0.11

Total Area = 29679.96

Total Height = 4014.59

Total Amount = 0.138381

Anexo 25. Cromatograma de la muestra 2 del nido 4.



Sample Name = Nido4-2FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0042.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/29/2013 8:00:27 PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

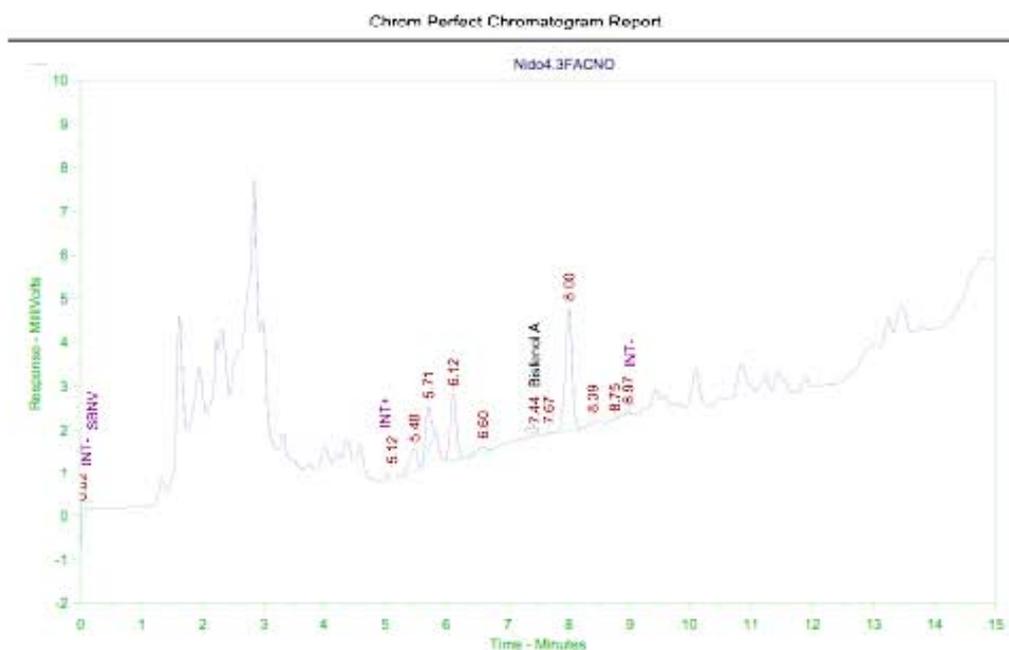
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.07		0.00	0.000	972	1.318	BB	0.12
2	5.43		0.00	0.000	3506	4.752	BB	0.14
3	5.89		0.00	0.000	19449	26.360	BB	0.14
4	6.10		0.00	0.000	13857	18.510	BB	0.11
5	6.49		0.00	0.000	6909	9.364	BB	0.23
6	7.08		0.00	0.000	1352	1.832	BB	0.31
7	7.46	Bisfenol A	0.14	100.000	817	0.836	BB	0.19
8	7.94		0.00	0.000	23335	31.628	BB	0.11
9	8.38		0.00	0.000	2466	3.342	BB	0.16
10	8.95		0.00	0.000	1518	2.058	BB	0.13

Total Area = 73781.01

Total Height = 9595.85

Total Amount = 0.140890

Anexo 26. Cromatograma de la muestra 3 del nido 4.



Sample Name = Nido4.3FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0044.RAW

Method File Name = C:\Metodos\B\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/30/2013 1:35:27PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

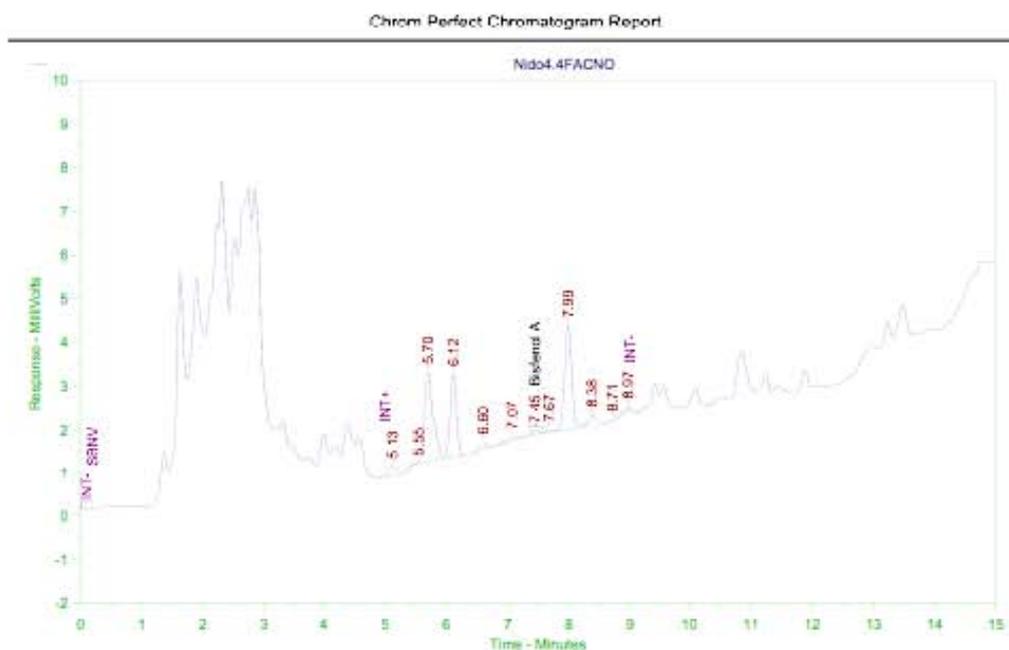
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	0.02		0.00	0.000	2376	4.660	BB	0.09
2	5.12		0.00	0.000	1413	2.772	BB	0.15
3	5.48		0.00	0.000	4617	9.057	BB	0.17
4	5.71		0.00	0.000	6625	12.996	BB	0.17
5	6.12		0.00	0.000	10439	20.478	BB	0.11
6	6.60		0.00	0.000	1760	3.452	BB	0.28
7	7.44	Bisfenol A	0.15	100.000	899	1.764	BB	0.20
8	7.67		0.00	0.000	197	0.386	BB	0.13
9	8.00		0.00	0.000	21485	42.147	BB	0.12
10	8.39		0.00	0.000	633	1.241	BB	0.15
11	8.75		0.00	0.000	197	0.386	BB	0.11
12	8.97		0.00	0.000	336	0.660	BB	0.15

Total Area = 50977.2

Total Height = 7147.271

Total Amount = 0.146031

Anexo 27. Cromatograma de la muestra 4 del nido 4.



Sample Name = Nido4.4FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0045.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1.CAL

Date Taken (end) = 5/30/2013 07:22PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

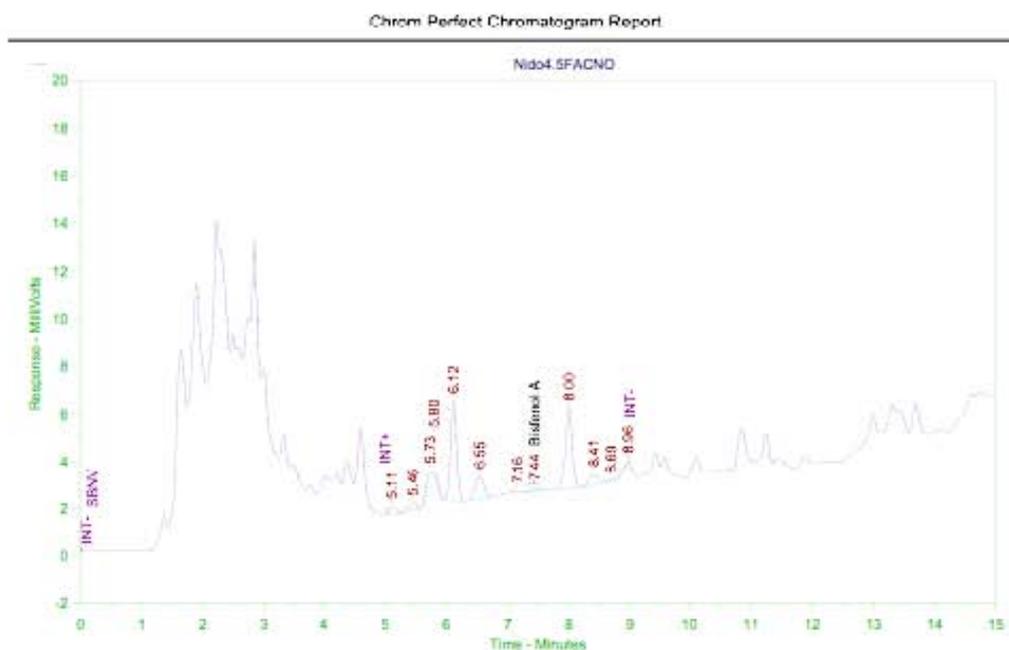
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.13		0.00	0.000	2040	3.318	BB	0.16
2	5.55		0.00	0.000	664	1.080	BB	0.16
3	5.70		0.00	0.000	19712	32.063	BB	0.14
4	6.12		0.00	0.000	13349	21.713	BB	0.11
5	6.60		0.00	0.000	1577	2.565	BB	0.21
6	7.07		0.00	0.000	1190	1.936	BB	0.28
7	7.45	Bisfenol A	0.14	100.000	727	1.183	BB	0.17
8	7.67		0.00	0.000	321	0.522	BB	0.15
9	7.99		0.00	0.000	16831	30.631	BB	0.12
10	8.38		0.00	0.000	2169	3.527	BB	0.16
11	8.71		0.00	0.000	197	0.320	BB	0.10
12	8.97		0.00	0.000	703	1.143	BB	0.14

Total Area = 61477.86

Total Height = 7324.061

Total Amount = 0.142901

Anexo 28. Cromatograma de la muestra 5 del nido 4.



Sample Name = Nido4.5FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0046.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/30/2013 2:40:26PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

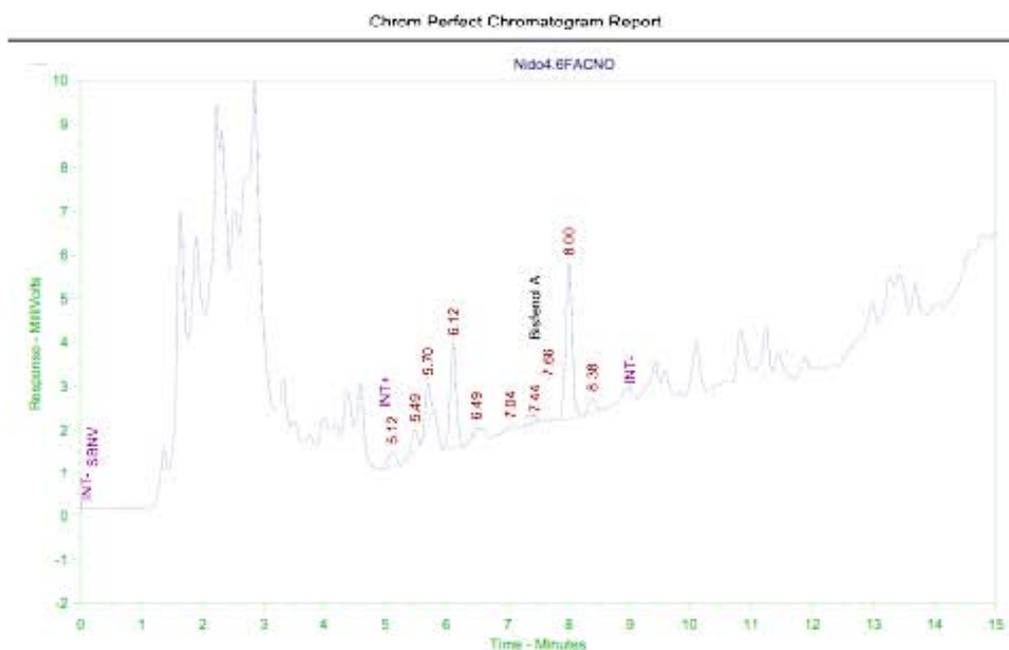
Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.11		0.00	0.000	2338	2.750	BB	0.13
2	5.46		0.00	0.000	3393	3.990	BB	0.19
3	5.73		0.00	0.000	2477	2.913	BB	0.10
4	5.80		0.00	0.000	1992	2.342	BB	0.11
5	6.12		0.00	0.000	29618	34.830	BB	0.11
6	6.55		0.00	0.000	9883	11.623	BB	0.17
7	7.16		0.00	0.000	378	0.444	BB	0.14
8	7.44	Bisfenol A	0.15	100.000	1119	1.316	BB	0.22
9	8.00		0.00	0.000	26910	31.528	BB	0.12
10	8.41		0.00	0.000	4682	5.506	BB	0.21
11	8.69		0.00	0.000	247	0.290	BB	0.11
12	8.96		0.00	0.000	2098	2.468	BB	0.13

Total Area = 85035.1;

Total Height = 10675.2;

Total Amount = 0.150047;

## Anexo 29. Cromatograma de la muestra 6 del nido 6.



Sample Name = Nido4.6FACNO

Instrument= HPLC

Heading 1 =

Heading 2 =

Raw File Name = C:\Info\Bisfenil Mayo2013\Bisfenol A.0047.RAW

Method File Name = C:\Metodos 8\Bisfenol A1\_B.MET

Calibration File Name = C:\Info\Bisfenol A.cali\Curva mayo1C.CAL

Date Taken (end) = 5/30/2013 14:16PM

Method Version = 1

Calibration Version = 1

Peak #	Ret. Time	Name	Amount	Amt %	Area	Area %	Type	Width
1	5.12		0.00	0.000	2530	4.240	BB	0.14
2	5.49		0.00	0.000	3538	5.929	BB	0.16
3	5.70		0.00	0.000	5700	9.553	BB	0.14
4	6.12		0.00	0.000	16776	28.118	BB	0.11
5	6.49		0.00	0.000	828	1.389	BB	0.12
6	7.04		0.00	0.000	768	1.287	BB	0.19
7	7.44	Bisfenol A	0.14	100.000	582	0.975	BB	0.21
8	7.66		0.00	0.000	236	0.395	BB	0.08
9	8.00		0.00	0.000	26129	43.794	BB	0.11
10	8.38		0.00	0.000	2577	4.319	BB	0.15

Total Area = 59663.8:

Total Height = 8312.48:

Total Amount = 0.140256

## Anexo 30. Análisis estadístico de la regresión logarítmica con la que se estimó la mortalidad de los embriones inoculados con Bisfenol A.

. tab hembra

Sexo	Freq.	Percent	Cum.
m	537	66.13	66.13
h	275	33.87	100.00
Total	812	100.00	

. tab tipo

tipo	Freq.	Percent	Cum.
control	184	22.66	22.66
EtOH	161	19.83	42.49
0.3	96	11.82	54.31
0.6	166	20.44	74.75
1.2	205	25.25	100.00
Total	812	100.00	

. tab muerto

resultado	Freq.	Percent	Cum.
vivo	406	50.00	50.00
muerto	406	50.00	100.00
Total	812	100.00	

. tab muerto hembra

Resultado	Sexo		Total
	m	h	
vivo	233	173	406
muerto	304	102	406
Total	537	275	812

. logit muerto hembra i.tipo

Iteration 0: log likelihood = -562.83551  
 Iteration 1: log likelihood = -482.20805  
 Iteration 2: log likelihood = -482.05624  
 Iteration 3: log likelihood = -482.05619

Logistic regression	Number of obs	=	812
	LR chi2(5)	=	161.56
	Prob > chi2	=	0.0000
Log likelihood = -482.05619	Pseudo R2	=	0.1435

Resultado	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
hembra	-.9024997	.167794	-5.38	0.000	-1.23137 - .5736295
tipo					
EtOH	.6553826	.2397906	2.73	0.006	.1854017 1.125364
0.3	1.210827	.2738923	4.42	0.000	.6740076 1.747646
0.6	1.352669	.2364449	5.72	0.000	.8892452 1.816092
1.2	2.490104	.2471942	10.07	0.000	2.005612 2.974596
_cons	-.8616722	.1786258	-4.82	0.000	-1.211772 -.511572

. logit, or

Logistic regression

Number of obs = 812  
LR chi2(5) = 161.56  
Prob > chi2 = 0.0000  
Pseudo R2 = 0.1435

Log likelihood = -482.05619

Resultado	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
hembra	.4055546	.0680496	-5.38	0.000	.2918924 .5634766
tipo					
EtOH	1.925879	.4618078	2.73	0.006	1.203702 3.081337
0.3	3.356258	.9192533	4.42	0.000	1.962085 5.741071
0.6	3.867733	.9145057	5.72	0.000	2.433292 6.147786
1.2	12.06253	2.981787	10.07	0.000	7.430643 19.58171
_cons	.4224551	.0754614	-4.82	0.000	.2976692 .5995523

Anexo 31. Experimento de aplicación de 0.3mg/huevo de BPA a embriones de Et 24, sacrificados en la Et 26, incubados a 20°C.

<b>°C</b>	<b>Dosis</b>	<b>n</b>	<b>Et</b>	<b>Resultados</b>
26	0.3	1	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	2	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	3	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	4	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	5	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	6	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	7	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	8	26	Ausencia de cambios aparentes.
26	0.3	9	26	Ausencia de cambios aparentes.

Anexo 32. Experimento de aplicación de 0.6mg/huevo de BPA a embriones de Et 24, sacrificados en la Et 26, incubados a 20°C:

°C	Dosis	n	Et	Resultados
26	0.6	1	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	2	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	3	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	4	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	5	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	6	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	7	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	8	26	Ausencia de cambios aparentes
26	0.6	9	26	Los canales medulares presentan una apariencia desorganizada.

Anexo 33. Experimento de aplicación de 1.2mg/huevo de BPA a embriones de Et 24, sacrificados en la Et 26, incubados a 20°C:

<b>°C</b>	<b>Dosis</b>	<b>n</b>	<b>Et</b>	<b>Resultados</b>
26	1.2	1	26	Ausencia de cambios aparentes
26	1.2	2	26	Ausencia de cambios aparentes
26	1.2	3	26	Ausencia de cambios aparentes
26	1.2	4	26	Ausencia de cambios aparentes
26	1.2	5	26	Los canales medulares presentan una apariencia desorganizada y el epitelio es columnar estratificado.
26	1.2	6	26	Los canales medulares presentan una apariencia desorganizada y el epitelio es columnar estratificado.
26	1.2	7	26	Los canales medulares presentan una apariencia desorganizada y el epitelio es columnar estratificado.
26	1.2	8	26	Los canales medulares presentan una apariencia desorganizada y el epitelio es columnar estratificado.
26	1.2	9	26	Ausencia de cambios aparentes

Anexo 34. Medidas de la corteza de las muestras 5,6,7 y 8, que presentaron un epitelio cúbico estratificado.

<b>Tratamiento mg BPA</b>	<b>Muestra</b>	<b>Corteza <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Corteza promedio controles <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Diferencia <math>\mu\text{m}</math></b>
1.2	5	30.55	14.28	16.27
1.2	6	30.09	14.28	15.81
1.2	7	36.11	14.28	21.83
1.2	8	40.49	14.28	26.21

Anexo 35. Análisis estadístico de la regresión lineal en el que se muestra que el aumento de grosor en el espitelio de las dosis sometidas a dosis de 1.2mg de Bisfenol A es significativo.

```
. reg grosor i.tipo
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =	36
Model	1091.82712	3	363.942372	F( 3, 32) =	5.62
Residual	2071.06408	32	64.7207524	Prob > F =	0.0033
				R-squared =	0.3452
				Adj R-squared =	0.2838
Total	3162.89119	35	90.3683199	Root MSE =	8.0449

grosor	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
tipo					
0.3	-.9166667	3.792412	-0.24	0.811	-8.641557 6.808224
0.6	2.082222	3.792412	0.55	0.587	-5.642668 9.807113
1.2	12.85667	3.792412	3.39	0.002	5.131776 20.58156
_cons	8.322222	2.68164	3.10	0.004	2.8599 13.78454