



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

**Estado de conservación de *Pseudacris
hypochondriaca* en la península de Baja
California, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Ambiental)**

P R E S E N T A

Edna Leticia González Bernal

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Gabriela Parra Olea

MÉXICO, D.F.

Junio, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada con no. de registro 189234 para realizar los estudios de maestría. A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca parcial otorgada durante los estudios de maestría. Al apoyo financiero para realizar el proyecto de investigación de maestría otorgado a través del Proyecto PAPIIT UNAM IN226605 a cargo de la Dra Gabriela Parra Olea.

Comité Tutorial

Dra. Gabriela Parra Olea

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Eduardo Morales Guillaumin

A mis papás, Martha Bernal Gallardo y Francisco González Soto
por todo su amor e impulso siempre.
A mis hermanos y sobrinos:
Paco, Issel, Hilda, Luis Fernando, Rodrigo, Juan José

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Parra por su apoyo en la realización de este proyecto. A los miembros del comité tutorial, Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Eduardo Morales Guillaumin por su ayuda y observaciones a lo largo del desarrollo del proyecto. A los miembros del jurado Dr. Oscar Flores Villela y M. en C. Guadalupe Poce Vélez por la revisión de la tesis y sus enriquecedores comentarios.

A Juan Carlos Windfield, Anny Peralta, Gabriel Barrios, Carlos Hernández, Vicente Rodríguez y Roberto Sosa por su ayuda en el trabajo de campo. A todos por lo que implicó, entre otros esfuerzos, pesar y medir cada "ranita" y en especial a Anny y JC por el esfuerzo extra de aquella noche de lluvia intensa.

A la Dra. Maria Aurora Armienta por permitirme realizar el trabajo de detección de metales pesados en su laboratorio. A Nora Cenicerros, Alejandra Aguayo y Olivia Cruz por su ayuda y paciencia. En especial a Erik Espinosa por su ayuda y guía a lo largo de la realización de los análisis.

A la Dra. Gonsebatt por permitirme realizar el análisis de micronúcleos en su laboratorio. A Patricia Guzmán por su ayuda en el reconocimiento y detección de MN y por compartir hooras sentadas al microscopio. A los compañeros del laboratorio, por su hospitalidad durante ese tiempo.

Al Dr. Alfonso Vázquez Botello por abrirme las puertas de su labotario sin conocerme, simplemente por confiar en el proyecto, para analizar plaguicidas organoclorados. A Lupita Poce Vélez por ser mi maestra en el área de contaminación y en el trabajo de laboratorio. Gracias por toda tu ayuda Lupita, siempre ha sido bueno contar contigo en todo. A Q.A. Enedina Chávez García, M. en C. Claudia García Ruelas y Gabriel por su ayuda en el procesamiento de las muestras, por su grato compañerismo y su buen humor. Al Dr. Gilberto Díaz González por permitirme analizar las muestras de plaguicidas en su laboratorio y por el entusiasmo que le imprime al trabajo

Al Dr. Ignacio Méndez y Dr. Jaime Zuñiga por su ayuda con los análisis estadísticos. Gracias por las asesorías, los ánimos y el interés en el trabajo

A mis compañeros y amigos del Instituto de Biología por el tiempo compartido. Ruth por tu alegría y amistad, Reino por las risas, Pati por aquellas tardes “extra” de laboratorio, Chino, Chiquín, Cristina, Norberto, Rodo, por las tardes (días, noches mañanas) en el cubículo, Tipi, Verito, Reina, Lis, Martín por lo sencillo de lo cotidiano y sus sonrisas. A Claudia Ballesteros por las clases. A Chío por siempre aligerar los trámites, por esa gran disposición a ayudar y por tu amistad.

A Daniel Pérez Castillo por tu ayuda con la tecnología, la música, el apoyo en todos los momentos, lo compartido y la capacidad de disfrutar lo sencillo. Gracias por todo este tiempo calaña.

Indice

I.	Introducción	1
II.	Antecedentes	5
III.	Marco teórico	7
A.	Contaminantes	7
1.	Plaguicidas organoclorados	8
2.	Metales pesados	9
B.	Efecto de los contaminantes en ADN: micronúcleos	10
C.	Desarrollo embrionario y formación de extremidades en anfibios	11
IV.	Hipótesis	14
V.	Objetivos	14
VI.	Métodos	15
A.	Trabajo de campo	15
1.	Zona de estudio	15
2.	Poblaciones por región y área natural protegida (ANP)	16
3.	Trabajo in situ	16
a.	Organismos	17
b.	Sedimentos	17
B.	Trabajo de laboratorio	18
1.	Determinación de plaguicidas organoclorados	18
a.	Sedimentos	18
b.	Tejidos	19
c.	Descripción del protocolo	19
1)	Extracción	19
2)	Cromatografía en columna	20
3)	Cromatografía de gases	20
2.	Determinación de metales pesados	20
3.	Cuantificación de micronúcleos	21
4.	Análisis de datos	21
a.	Malformaciones	21
b.	Micronúcleos	22
VII.	Resultados	23
A.	Trabajo de campo	23
B.	Trabajo de Laboratorio	25
1.	Plaguicidas organoclorados	25
a.	Sedimentos	25
b.	Tejidos	27
2.	Metales pesados	30
3.	Cuantificación de micronúcleos	31
4.	Análisis de datos	32
a.	Malformaciones y contaminantes	32
1)	Plaguicidas alicíclicos	32
2)	Plaguicidas aromáticos	33
3)	Plaguicidas ciclodiénicos	35
4)	Metales pesados	36
5)	Efecto sinérgico: plaguicidas organoclorados y metales pesados	38
b.	Micronúcleos	40
VIII.	Discusión	42

A.	Malformaciones y contaminantes.....	42
1.	Plaguicidas organoclorados.....	44
a.	Plaguicidas alicíclicos	44
b.	Plaguicidas aromáticos	46
c.	Plaguicidas Ciclodiénicos	47
d.	Sinergismo entre plaguicidas organoclorados y metales pesados.....	48
B.	Micronúcleos	49
C.	Otros aspectos	51
1.	Origen de los contaminantes	51
2.	Estrés ambiental y sistema inmune	52
3.	Introducción de especies exóticas	52
4.	Situación de <i>P. hypochondriaca</i>	52
IX.	Conclusiones	54
X.	Bibliografía.....	56
	Anexo 1. Patrones climáticos de la península de Baja California.....	67
	Anexo 2. Protocolo UNEP/IAEA (1982) para la extracción y purificación de plaguicidas organoclorados en sedimentos.	69
	Anexo 3 Malformaciones detectadas y micronúcleos.....	70
	Anexo 4. Concentración de plaguicidas organoclorados en las poblaciones visitadas.....	71

Indice de Figuras y Tablas

Figura 1. Sitios visitados en 2004 donde se encontraron poblaciones de <i>Pseudacris hypochondriaca</i>	6
Figura 2. Sitios donde se detectaron las poblaciones de <i>Pseudacris hypochondriaca</i> visitadas durante el desarrollo de este trabajo.....	23
Figura 3. Número de individuos revisados en cada sitio visitado.....	24
Figura 4. Concentración en partes por billón (ng/g ⁻¹) de plaguicidas de la familia de los alicíclicos.....	25
Figura 5. Concentración en partes por billón (ng/g ⁻¹) de plaguicidas de la familia de los aromáticos.....	26
Figura 6. Concentración en partes por billón (ng/g ⁻¹) de plaguicidas de la familia de los ciclodiénicos.....	27
Figura 7. Concentración en partes por billón (ng/g ⁻¹) de arsénico, plomo y zinc.....	30
Figura 8. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los alicíclicos.....	32
Figura 9. Concentración promedio de los componentes del hexaclorociclohexano en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	33
Figura 10. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los aromáticos.....	34
Figura 11. Concentración promedio de plaguicidas aromáticos (DDT, DDD y DDE) en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	34
Figura 12. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los ciclodiénicos.....	35
Figura 13. Concentración promedio de plaguicidas ciclodiénicos y sus compuestos secundarios en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	36
Figura 14. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de metales pesados (As, Pb, Zn).....	37
Figura 15. Concentración promedio de metales pesados (As, Pb y Zn) en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	37
Figura 16. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados (alicíclicos, aromáticos, ciclodiénicos) y metales pesados (As, Pb, Zn).....	38
Figura 17. Concentración promedio de plaguicidas organoclorados y metales pesados en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	39
Figura 18. Micronúcleos. Dendograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de compuestos primarios de plaguicidas organoclorados (alicíclicos, aromáticos, ciclodiénicos y metales pesados (As, Pb, Zn).....	40
Figura 19. Concentración promedio de plaguicidas primarios y metales pesados en las poblaciones que conforman cada conglomerado.....	41
Tabla 1. Sitios de muestreo.....	18
Tabla 2. Concentración de plaguicidas organoclorados en organismos sanos y malformados de <i>P. hypochondriaca</i>	29
Tabla 3. Número de micronúcleos, número de células revisadas y frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de individuos de <i>Pseudacris hypochondriaca</i>	31

Resumen

Durante los últimos años se ha dado un incremento en las frecuencias de malformaciones en anfibios en el mundo. Esta situación ha sido considerada como un indicador de deterioro ambiental y un factor más causante del declive de las poblaciones de anfibios. En la península de Baja California México se encontraron distintas poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca* con proporciones de malformaciones en individuos adultos que rebasan los límites naturales (0-2%). Ya que la inducción de malformaciones puede darse, entre otros factores, por interferencia de diversos químicos durante el desarrollo embrionario, se consideró que el grado de contaminación de los sitios donde se encuentran dichas poblaciones podría mantener una relación con el índice de malformaciones. Con el objetivo de probar dicha hipótesis se tomaron muestras de sedimentos para medir concentraciones de plaguicidas organoclorados, arsénico, plomo y zinc, compuestos que se consideran genotóxicos y algunos de ellos teratogénicos. Por otra parte, eventos de exposición crónica a estos compuestos se determinaron mediante la técnica de detección de micronúcleos en eritrocitos para lo cual se tomaron frotis de sangre. Los análisis de sedimentos revelaron presencia de plaguicidas organoclorados, arsénico, plomo y zinc en todas las poblaciones. Los resultados muestran que aquellas poblaciones con mayores porcentajes de malformaciones presentan mayores concentraciones de estos compuestos. Análisis de conglomerados y regresiones múltiples indican que el sinergismo entre plaguicidas de las familias de los alicíclicos y ciclodiénicos así como de arsénico, plomo y zinc explica significativamente el porcentaje de malformaciones. Además, en cuatro poblaciones se detectaron micronúcleos en eritrocitos lo cual señala que los organismos se encuentran expuestos a agentes genotóxicos presentes en el medio de manera crónica. Estos resultados señalan que *P. hypochondriaca* en la península de Baja California se encuentra en una situación vulnerable y que deben considerarse medidas para su conservación.

Abstract

During the last years it has been reported an increase in the frequency of malformations in amphibians around the world. These cases have been related to environmental damage and have been considered as another factor causing amphibian population declines. In the Baja California Península, México, we found several populations of *Pseudacris hypochondriaca* with higher than normal (0-2%) frequencies of malformations in adult frogs. Because it is known that chemical compounds can interfere with the embrionic development we considered that the degree of contamination of the sites where these populations were detected might maintain a relationship with the malformations frequencies. In the aim of proving this hypothesis, sediment samples were taken to detect compounds such as organochlorine pesticides, arsenic, lead and zinc, which are considered genotoxic and teratogenic. Chronic exposure events were determined by the micronuclei (MN) technique in blood cells. The sediment analysis revealed presence of organochlorine pesticides, arsenic, lead and zinc in all the populations. Our results show that populations with higher malformations frequencies present higher quantities of these compounds. A cluster analysis and a multiple regression analysis showed that the synergism between alicyclic and ciclodienic pesticides, arsenic, lead and zinc explained significantly the malformation index. In addition, in four populations micronuclei formation was detected. This fact indicates that there is a chronic exposure to genotoxic compounds present in the field. These results show that the populations of *P. hypochondriaca* at the Baja California peninsula are at risk and that conservation measures should be taken.

I. Introducción

El declive de las poblaciones de anfibios es un problema global que en los últimos años ha tomado gran importancia. Dentro de las posibles causas se encuentran diversos factores antropogénicos, climáticos y patogénicos que aumentan la tasa de mortalidad en huevos, larvas y adultos. Algunos de estos factores son: la destrucción del hábitat ocasionada por actividades humanas (Collins y Storfer 2003), el aumento en la incidencia de la radiación ultravioleta debido al deterioro de la capa de ozono (Blaustein *et al.* 2003), la introducción de especies exóticas, las cuales son potenciales depredadores, competidores o portadores de patógenos (Kiesecker *et al.* 2001) y enfermedades infecciosas como la quitridiomycosis y la saprolegniosis (Daszak *et al.* 2003, Pasmans *et al.* 2004). Aunado a esto, durante los últimos años también se ha observado un aumento en la incidencia de malformaciones en anfibios (Gardiner y Hoppe 1999, Hopkins *et al.* 2000, Meteyer *et al.* 2000, Sower *et al.* 2000). A pesar de que la existencia de individuos malformados en poblaciones silvestres es un fenómeno natural que ha sido reportado en la literatura por cerca de 300 años (Vallisneri 1733, Duméril 1865 en Ouellet 2000), las frecuencias de anomalías detectadas actualmente en diversos casos rebasan las proporciones consideradas naturales las cuales van del 0 al 2% (Ouellet 2000). Se ha hipotetizado que el número de especies en declive puede aumentar debido a la pérdida de individuos y poblaciones ocasionada por este fenómeno (Blaustein *et al.* 1997) ya que existen casos donde este índice ha rebasado el 30% (Gardiner y Hoppe 1999, Hopkins *et al.* 2000, Vandenlangenberg *et al.* 2003)

Las malformaciones en anfibios se han observado en renacuajos, individuos jóvenes y adultos. Aquellas presentes en renacuajos involucran principalmente los discos orales, la columna vertebral y ojos (Rowe *et al.* 1996, Hopkins *et al.* 2000). En cuanto a individuos jóvenes y adultos los miembros afectados principalmente son las extremidades, seguidos por ojos, mandíbulas y piel. Las malformaciones observadas en extremidades incluyen: ausencia o excedencia de dedos (ectrodactilia, polidactilia), dedos fusionados (sindactilia), ausencia de falanges (braquitactilia), ausencia de partes de extremidades (hemimelia o ectromelia), ausencia total y excedencia de miembros (amelia, polimelia), hiperextensiones de extremidades y triángulos óseos. En cuanto a los ojos, puede presentarse ausencia (anoftalmia) o reducción de los mismos (microftalmia) y ubicación anormal (ojo palatino). También se ha reportado ausencia de mandíbulas, patrones de piel alterados y absorción incompleta de cola (Guderyahn 2006).

Las malformaciones en anfibios pueden ser inducidas por factores genéticos y ambientales. Estos últimos pueden clasificarse como biológicos, físicos y químicos. Los factores biológicos incluyen la proliferación de parásitos que se enquistan en los primordios de las extremidades durante el desarrollo de las mismas, los físicos el aumento de la radiación ultravioleta debido al adelgazamiento de la capa de ozono y los químicos liberación de contaminantes al medio, lluvia ácida y niveles elevados de amonio en agua (Gilliland *et al.* 2001).

Dentro de los factores biológicos se ha demostrado que parásitos de la especie *Ribeiroia ordantrae* (Trematoda) son capaces de inducir malformaciones de tipo supernumerario principalmente en extremidades (polidactilia y polimelia). En diversas poblaciones de anfibios se ha encontrado que existe una relación entre la infestación de larvas de tremátodos de esta especie y el número de organismos que exhiben este tipo de malformaciones (Sessions *et al.* 1999). Este suceso además se ha probado experimentalmente mediante la infestación de renacuajos por larvas de tremátodos o cercarias, (Johnson *et al.* 1999, Johnson *et al.* 2001) y de manera artificial mediante la implantación de pequeños artefactos de resina de forma y tamaño similar al de los quistes de cercarias en individuos del género *Xenopus* y *Ambystoma*; en ambos casos se indujo la formación de miembros excedentes (Sessions y Ruth 1990).

En cuanto a los factores físicos, se ha demostrado en estudios de laboratorio que la exposición continua de embriones a radiación de tipo UV-B ocasiona miembros reducidos (ectromelia y ectrodactilia) en individuos adultos de manera bilateral, simétrica y con terminaciones redondeadas (Ankley *et al.* 1998, Ankley *et al.* 2002). A pesar de dichos resultados, no existe evidencia en la naturaleza de que la radiación ultravioleta cause malformaciones en anfibios (Blaustein y Johnson 2003). Además, aunque la mayoría de las anomalías detectadas en campo implican truncamientos de las extremidades, el grado de bilateralidad observado en dichos casos es mucho menor al detectado en experimentos de laboratorio (Gardiner y Hoppe 1999, Ankley *et al.* 2002).

Por otra parte, se ha reportado que una variedad de agentes químicos como: herbicidas, fungicidas, insecticidas, fertilizantes y algunos metales pesados, incluso en concentraciones traza, tienen efectos tóxicos y teratogénicos en los anfibios (Bridges *et al.* 2002, Bridges *et al.* 2004, Cooke 1972, Greulich y Pflugmacher 2003, Harris *et al.* 2000, La Clair *et al.* 1998).

Además se ha demostrado que distintas condiciones ambientales como incidencia de radiación solar y características del agua como carbón orgánico disuelto, dureza, pH y temperatura pueden influir en la toxicidad de los mismos y cambiar la forma en que interfieren con el desarrollo de los anfibios (Fort *et al.* 1999a, Freda *et al.* 1990, La Clair *et al.* 1998). Casos de afectación por metales pesados incluyen a renacuajos de la especie *Rana catesbeiana* en Carolina del Sur E.U. donde se detectaron deformidades orales que se relacionaron con la contaminación producida por arsénico, bario, cadmio, cromo y selenio resultantes de la quema de carbón. Análisis de tejidos de los individuos malformados mostraron presencia de estos compuestos (Rowe *et al.* 1996, 1998). También se ha determinado en trabajos de laboratorio que el DDT, plaguicida organoclorado, ocasiona cambios conductuales, afectaciones en el patrón de nado y malformaciones de la columna vertebral en renacuajos (Cooke 1972). En relación a anomalías morfológicas en adultos, se ha detectado que el uso de distintos plaguicidas se encuentra correlacionado con malformaciones de extremidades en algunos sitios de Canadá donde se observó que los organismos en pozas aledañas a campos de cultivo tratados químicamente presentaban una alta incidencia de reducción de miembros en comparación a aquellos presentes en pozas rodeadas de suelos no cultivados (Ouellet *et al.* 1997). Además este tipo de malformaciones fueron reproducibles en estudios de laboratorio mediante la exposición de larvas de *Xenopus laevis* a agua y sedimentos extraídos de pozas en las cuales había una alta incidencia de individuos con malformaciones (Fort *et al.* 1999a).

El caso de la contaminación ha resultado más complejo de lo que parecía ya que existen compuestos que pueden ser transportados a grandes distancias atmosféricamente lo que sugiere que contaminantes esparcidos localmente pueden actuar a una escala mayor (Gilliland *et al.* 2001). Por este medio, distintos compuestos, tienen el potencial de afectar a anfibios en ambientes remotos y relativamente poco alterados y se ha observado que puede existir una relación entre este suceso y el declive de poblaciones de anfibios en sitios con cierto grado de conservación como parques nacionales (Daly *et al.* 2007, Datta *et al.* 1998). Aunado a lo anterior se ha citado que aún niveles bajos de contaminación ocasionados por depósito atmosférico son potencialmente dañinos para los anfibios (Blaustein *et al.* 2003).

De manera general, los factores principales causantes de malformaciones se encuentran identificados y en algunos casos entendidos. Sin embargo, diversos estudios apuntan a que más que un solo factor causante de malformaciones, el sinergismo de varios puede ser el que este actuando (ACAP 2005, Fort *et al.* 1999b, Harris *et al.* 2000, Hayes *et al.* 2006, Relyea 2004).

Diversos estudios de laboratorio han evaluado el efecto de distintos agentes sobre los anfibios. Sin embargo, en la mayoría se evalúan uno o dos componentes diferentes y en el caso de los químicos a concentraciones por lo regular letales (Bridges *et al.* 2002, Bridges y Boone 2003, Schuytema y Nebeker 1999). En contraparte, en los ecosistemas, los anfibios se encuentran expuestos a una variedad mayor de factores y en el caso de la contaminación a sustancias algunas veces en concentraciones más bajas a las que se han experimentado en laboratorio. Ante estos hechos, resulta necesario evaluar y entender los posibles sinergismos que se dan en la naturaleza y la posible capacidad de los mismos para inducir malformaciones.

Dada la situación de las poblaciones de anfibios a nivel mundial, resulta indispensable comenzar a realizar estudios formales que permitan esclarecer que factores pueden estar influyendo en el declive de anfibios en México y tener bases para tomar decisiones sobre la conservación de los mismos.

II. Antecedentes

Pseudacris hypochondriaca (Baird y Girard 1852) es una especie perteneciente a la familia Hylidae que se distribuye desde Nevada y el sur de California, E.U., hasta la punta de la península de Baja California, México (Recuero *et al.* 2006). Esta especie se encuentra asociada a cuerpos de agua y utiliza principalmente la vegetación aledaña a éstos como refugio. En la península de Baja California se encuentra asociada a oasis, arroyos y cuerpos de agua semipermanente. En épocas secas se refugia debajo de piedras, troncos o suelo. Es una especie de hábitos principalmente nocturnos (Grismer 2002). En el país no se cuenta con estudios sobre el estatus de sus poblaciones, sin embargo, existen informes anecdóticos sobre individuos malformados de esta especie en dicha región.

Durante un trabajo de recolección de anfibios en 10 sitios a lo largo de la península de Baja California (Figura 1) realizado en abril de 2004, se encontró que 5 de dichos sitios presentaron individuos de *Pseudacris hypochondriaca* con anomalías morfológicas. Dichas malformaciones se caracterizaron principalmente por ausencia de dedos en las patas traseras (ectrodactilia), ausencia de ojos (anofthalmia) y protuberancias en la epidermis. De 39 individuos recolectados, once presentaron al menos alguna anomalía lo que corresponde al 28% (Parra-Olea comunicación personal).

Por otra parte, la península de Baja California presenta actividad minera y agrícola de importancia en diversos sitios (www.sagarpa.gob.mx, CONANP 2000). Tomando en cuenta esta situación, el tipo de malformaciones detectadas y lo registrado en la literatura (Ouellet *et al.* 1997) se ha considerado que podría existir una relación entre la presencia de contaminantes de distintos tipos y la frecuencia de malformaciones en individuos de *Pseudacris hypochondriaca*.

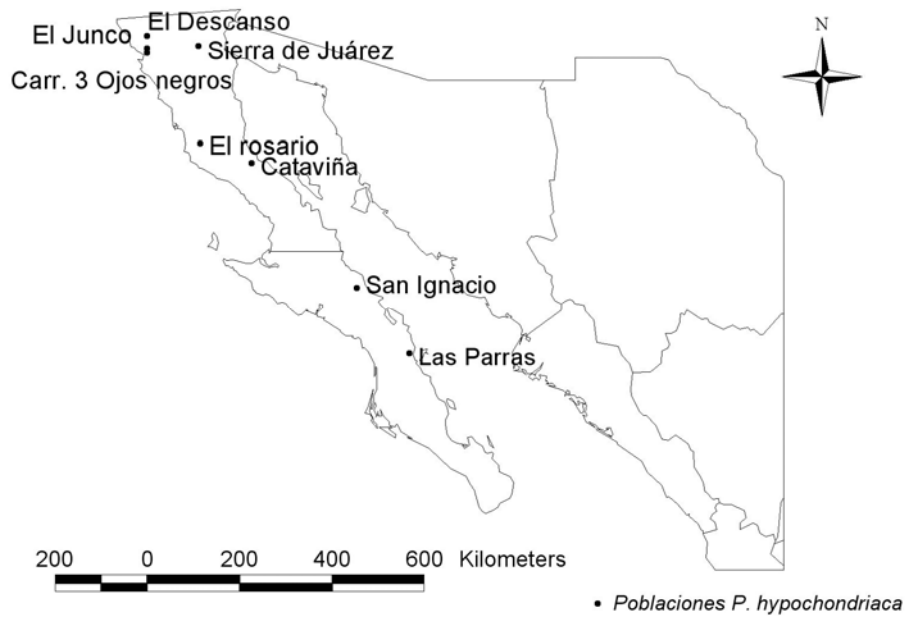


Figura 1. Sitios visitados en 2004 donde se encontraron poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca*. Se encontraron organismos malformados provenientes de cinco de estos sitios.

III. Marco teórico

A. Contaminantes

Todos los organismos se encuentran expuestos a distintas sustancias del medio que pueden resultar tóxicas. Los efectos de estas sustancias, cuando los hay, pueden ser variados y afectar diferentes niveles biológicos, como moléculas, células, organismos, comunidades y ecosistemas. Muchos de los efectos de estos compuestos y el riesgo a la salud provocados por los mismos dependen de las condiciones de exposición y del sistema biológico como tal, es decir de su condición, su capacidad reguladora y susceptibilidad. Las condiciones de exposición abarcan las características fisicoquímicas de la sustancia como tal, la concentración de la misma y la forma, ruta, frecuencia y duración de exposición. Cabe mencionar que solo la proporción biodisponible de la sustancia es decir, la cantidad que finalmente interactúa con el organismo, es de relevancia toxicológica.

Por sus características biológicas, los anfibios son un grupo blanco de muchos contaminantes, de hecho son considerados como importantes indicadores de la salud ambiental. Entre estas características se encuentran: un ciclo reproductivo bifásico, piel altamente permeable y huevos sin cascarón que están expuestos directamente al suelo, agua y luz solar y que por ende pueden absorber sustancias tóxicas presentes en los mismos (Venturino *et al.* 2003). Al estar en contacto con el agua como larvas y con el suelo en la etapa adulta, muchos anfibios se encuentran expuestos a factores de estrés acuáticos y terrestres (Blaustein *et al.* 2003). De hecho se ha llegado a considerar, que algunos anfibios pueden estar en mayor riesgo que otros vertebrados acuáticos pues éstos prefieren sitios de anidación en hábitats acuáticos que por lo regular son poco profundos, lénticos o cuerpos de agua temporales donde los contaminantes pueden llegar a acumularse sin una dilución sustancial.

A continuación, se presenta una descripción general de los contaminantes con los que se trabajó en este estudio: plaguicidas organoclorados y metales pesados.

1. Plaguicidas organoclorados

Los plaguicidas organoclorados son en su mayoría insecticidas de amplio espectro, muy estables químicamente y por lo tanto muy persistentes en el ambiente. Todos contienen cloro, carbono e hidrógeno y algunos también oxígeno y azufre (Diario Oficial de la Federación 1991). Se caracterizan por contar con una elevada toxicidad crónica y por ser lipofílicos por lo que presentan una alta tendencia a acumularse en los tejidos particularmente ricos en grasas. Son elevadamente persistentes en el suelo y los alimentos por lo que participan en procesos de biomagnificación en las redes tróficas. Debido a estas características son considerados como contaminantes orgánicos persistentes (COPs).

Si se considera la estructura química, los plaguicidas organoclorados pueden clasificarse en tres grupos:

- Hidrocarburos alicíclicos, cuyo principal representante es el hexaclorociclohexano o HCH del cual sólo el isómero gamma o lindano tiene poderosas propiedades insecticidas.

Hidrocarburos aromáticos, cuyo compuesto más sobresaliente es el dicloro-difenil-tricloroetano o DDT. Este compuesto puede transformarse en dos derivados o compuestos de degradación, el DDD (dicloro-difenil-dicloroetano) y el p,p'DDE o DDE (dicloro-difenil-etano), el cual carece de propiedades insecticidas pero es más estable y persistente (Albert 1990).

- Hidrocarburos ciclodiénicos, algunos de los más importantes representantes son: el aldrín el cual en presencia de peróxidos, en el ambiente y en los organismos, se oxida para transformarse en su epóxido dieldrín, que es más tóxico y persistente. El endrín ubicado en este grupo, es el insecticida de mayor toxicidad aguda.

La necesidad de mejorar la productividad agrícola, promovida por el crecimiento poblacional humano, ha incrementado el uso de plaguicidas en el mundo, especialmente en regiones tropicales donde las plagas pueden sobrevivir adecuadamente (Nyangababo *et al.* 2005). Este uso ha ocasionado problemas de presencia de contaminantes tóxicos aún a bajas concentraciones (menores a ng/g^{-1}) en agua, suelo y aire los cuales a su vez tienen un impacto en la biota al ser

por lo regular tóxicos para organismos no objetivo. (Ouellet 2000). Aunado a esto, debido a su relativa estabilidad química y biológica, residuos de estos plaguicidas pueden persistir en los ecosistemas por varios años (Nyangababo *et al.* 2005). En general, los sedimentos de los cuerpos de agua son considerados como los reservorios finales de plaguicidas. La llegada de contaminantes a los sedimentos puede darse por distintas vías como: aplicación directa, depósito de aplicaciones aéreas, precipitación, deslave, descargas industriales y derrames accidentales. A partir de los sedimentos los plaguicidas se mueven a la atmósfera, al agua y a los organismos vivos (Edwards 1973). Esta redistribución puede darse por distintos procesos como: adsorción, resuspensión de partículas, cambios en pH y la actividad de macro invertebrados bénticos. Al estar los contaminantes presentes en los sedimentos, éstos constituyen una fuente de sustancias tóxicas que pueden estar disponibles para distintos organismos pero en especial para aquellos asociados a los sedimentos (Goldberg, 1975).

Los plaguicidas organoclorados fueron utilizados a nivel global en la década de los 70's; sin embargo, en la actualidad su aplicación está prohibida o restringida en muchos países debido a su alta toxicidad, su persistencia en el ambiente y sus graves efectos ambientales a largo plazo. A pesar de dichos efectos y restricciones, muchos de ellos como el lindano, DDT y aldrín, por su bajo costo y amplio espectro de acción, son utilizados aún en la agricultura y campañas sanitarias en México (CICOPLAFEST 2003).

2. Metales pesados

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados existen en el medio ambiente de manera natural y pueden considerarse ubicuos al menos en concentraciones traza. El ciclo global de los metales, es continuamente alimentado por la erosión de rocas y erupciones volcánicas e involucra un flujo balanceado de ellos entre la geosfera, la hidrosfera y la atmósfera. Sin embargo, también ha existido una liberación al medio de metales pesados provocada por actividades humanas especialmente por aquellas de carácter industrial, agrícola, por emisiones resultantes del uso de materia prima en explotaciones mineras y por la combustión de materiales fósiles (Linder y Grillitsch 2000). La liberación de metales por esta vía rebasa a la liberación ocasionada por procesos naturales. Dado que los metales pesados son de origen natural, algunos se encuentran involucrados en distintas vías metabólicas y son considerados como esenciales para la vida, sin embargo, todos pueden ser tóxicos arriba de ciertas concentraciones. Además,

éstos pueden estar activos en su forma elemental o en una forma química combinada, como compuestos orgánicos o inorgánicos (Philip 2001). Al igual que los compuestos organoclorados, los metales pesados tienden a acumularse en los organismos vivos por lo que participan en procesos de biomagnificación.

B. Efecto de los contaminantes en ADN: micronúcleos.

La inducción de malformaciones puede darse tanto por interferencias en los procesos del desarrollo embrionario como por alteraciones en el material genético. Se ha documentado que una gran variedad de químicos naturales y sintéticos pueden inducir cambios a estos dos niveles. En cuanto a las alteraciones a nivel de ADN, se sabe que dependiendo de la naturaleza del defecto y el tiempo de su ocurrencia éstas pueden causar cambios heredables (mutaciones) o defectos de desarrollo (teratogénesis).

Cuando en presencia de agentes genotóxicos no hay muerte celular o en la célula no se da una reparación del daño antes de heredarlo a la célula hija, puede provocarse una mutación permanente por replicación de un ADN dañado. Cuando la apropiada combinación de mutaciones acumuladas se da en un tipo celular se puede producir un fenotipo transformado. Así, algunas mutaciones son responsables de desórdenes de fertilidad, enfermedades hereditarias, cáncer y malformaciones.

La inestabilidad genómica, la cual se refiere a un desequilibrio entre las reacciones que alteran al ADN y las que lo reparan, puede inducir a inestabilidad cromosómica. De esta manera, la inestabilidad genómica pueden inducir anormalidades a nivel de cariotipo, tales como: traslocaciones, inversiones, deleciones o amplificaciones. Cabe mencionar que la estabilidad genómica puede alterarse por estrés oxidativo y que algunos compuestos clorados como los plaguicidas son inductores del mismo (Piña-Guzmán *et al.* 2006).

La alteración cromosómica es un cambio que resulta en una anormalidad visible del cromosoma. Estas alteraciones se dan por reparación fallida de fragmentos cromosómicos, recombinación o segregación errónea durante la mitosis o meiosis. (Strachan, 1999). Existen dos tipos de aberraciones: 1) alteraciones de la estructura que se refiere al rompimiento y reunión de los cromosomas que origina deleciones, duplicaciones, inversiones y traslocaciones. (Gardner,

1998) y 2) alteraciones del número (Salamanca, 1988) de cromosomas como: poliploidias, aneuploidías y mixoploidías.

En los anfibios, como en otros organismos eucariontes, las alteraciones genómicas pueden evaluarse mediante la detección de micronúcleos, los cuales se derivan de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no son incorporados al núcleo durante la división celular. Así, éstos se reconocen como núcleos miniaturizados en el citoplasma de células post mitóticas (Barni *et al.* 2007). Los micronúcleos pueden ser de origen clastogénico cuando son causados por la fragmentación de ADN o de origen aneugénico, cuando son causados por la alteración del aparato mitótico. La exposición a compuestos genotóxicos da lugar a un aumento en el número de células con micronúcleos, por lo que la detección de aberraciones cromosómicas ha sido utilizada frecuentemente para identificar exposición a agentes mutagénicos en distintos organismos y relacionar la frecuencia de los mismos con niveles de contaminación (Gauthier *et al.* 2004, Kalantzi *et al.* 2004, Lajmanovich *et al.* 2005, Sienra *et al.* 2003, Song *et al.* 2006). En el caso de los anfibios, esta técnica ha sido utilizada satisfactoriamente en diversas especies para determinar efectos de distintos agentes mutagénicos que se encuentran presentes en el medio. Tal es el caso del endosulfán en *Hyla pulchella* o la atrazina en *Pleurodeles waltl* entre otros (Barni *et al.* 2007, Fernández *et al.* 1993, Lajmanovich *et al.* 2005, Wirz *et al.* 2005).

Dada la capacidad teratogénica y clastogénica de los contaminantes antes mencionados, durante este estudio también se hizo una revisión de la formación de micronúcleos en eritrocitos de individuos de *P. hypochondriaca*.

C. Desarrollo embrionario y formación de extremidades en anfibios

Como se mencionó, la inducción de malformaciones puede darse por interferencias de sustancias químicas en los procesos del desarrollo embrionario. La exposición a compuestos teratogénicos durante este proceso, dependiendo entre otras variables de la composición genética del individuo, de la duración de la exposición y de la etapa del desarrollo en la que se da esta exposición puede generar individuos malformados.

En cuanto al desarrollo embrionario de *Pseudacris hypochondriaca* se sabe que el tiempo de la fase de transición de huevo a renacuajo dura aproximadamente una semana mientras que la metamorfosis puede durar hasta 75 días (Grismer 2002). El desarrollo embrionario en los anfibios es en general similar al desarrollo de otros vertebrados. Un proceso iniciado por la fecundación que da lugar a un cigoto que cuenta con el ADN del óvulo y el espermatozoide. Este cigoto comienza una etapa de división celular seguida de la diferenciación celular dividida en tres etapas: blastulación, gastrulación y organogénesis. Durante la blastulación, por medio de la segmentación se forma la blástula. Durante la gastrulación, se da una reestructuración celular y el embrión adquiere tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo y finalmente durante la organogénesis se dan los cambios que permiten que las capas embrionarias se transformen en los diferentes órganos que conforman un organismo (Gilbert 2000). Finalizando este proceso el desarrollo del organismo se habrá culminado. La diferencia de los anfibios, al menos aquellos de desarrollo indirecto, con otros vertebrados es que al término de esta etapa se tendrán individuos en etapa larvaria, en el caso de los anuros, renacuajos. Estos organismos se encuentran adaptados para desarrollar una vida acuática y permanecerán en este estadio, dependiendo de la especie, por días o meses. Los renacuajos son organismos herbívoros y adaptados para el nado que darán lugar a un organismo adulto terrestre y carnívoro. La etapa de transición entre estos dos modos de vida es la metamorfosis. Durante ésta, se dan cambios importantes en la estructura de casi todos los órganos. En esta fase, diversos genes y hormonas asociadas al desarrollo embrionario se reactivan y desencadenan los cambios que permiten la formación de un tetrápodo adaptado a la vida terrestre (Brown y Cai 2007). Debido a que las malformaciones detectadas en este estudio se encontraron principalmente en las extremidades, los cambios que permiten el desarrollo de las patas resultan importantes de considerar ya que dichas anomalías pueden relacionarse con interferencias durante esa etapa.

El patrón de las extremidades es controlado por interacciones complejas entre varios genes como los Hox, Shh, Msx, Gli-3, Alx4 miembros del factor de transformación del crecimiento (TGF- β), de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) (Mannaert et al. 2006). Las reglas morfogenéticas para la formación de las extremidades parecen ser las mismas en todos los tetrápodos. Éstas surgen en la llamada región de la extremidad, cuya posición está relacionada con la expresión del gen Hoxc6. El desarrollo de las extremidades comienza con la proliferación de las células del mesénquima de la placa lateral del mesodermo y las somitas. Estas células se acumulan debajo del tejido epidérmico y crean el brote de la extremidad. El ácido retinoico parece ser crítico en la iniciación del

crecimiento de los brotes. Se ha sugerido que un gradiente de ácido retinoico a lo largo del eje antero-posterior puede activar ciertos genes homeóticos en células particulares y especificarlas para quedar incluidas en las extremidades. La especificidad de la ubicación de las patas, anterior o posterior, está determinada por los factores de transcripción Tbx5 y Tbx4 respectivamente. Conforme las células del mesénquima llegan a la región de la extremidad secretan factores (FGF10) que inducen la formación de un engrosamiento del ectodermo en la parte más distal llamado cresta ectodérmica apical (AER). El crecimiento del brote de la extremidad se da por la proliferación de las células del mesénquima debajo de la cresta ectodérmica apical, esta región de división celular se conoce como zona de progreso. El estado mitótico de la zona de progreso se mantiene por interacciones entre proteínas FGF de esta zona y de la AER. La secreción de FGF10 por las células del mesénquima inducen la AER y mantienen su expresión y a su vez, el FGF8 secretado por la AER mantiene la actividad mitótica de las células del mesénquima de la zona de progreso. Por otra parte la AER también dirige el crecimiento próximo-distal de la extremidad (Gilbert 2000). El tamaño de la AER está regulado por procesos de apoptosis así, su función se realiza de manera precisa durante todo el desarrollo de la extremidad. El incremento de células apoptóticas en la AER resulta en un truncamiento parcial ó completo de la extremidad mientras que la eliminación de la AER genera el truncamiento de la extremidad. La apoptosis también está involucrada en la remoción de los espacios entre los dígitos y uniones. Entre las señales que regulan la apoptosis en la extremidad está la perteneciente a la de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). La eliminación de algunas de estas proteínas resulta en la inhibición de la muerte celular en el interdígito, generando sindactilias (Abarca-Buis *et al.* 2005).

En cuanto a la especificación del tipo de estructura formada a lo largo del eje, ésta se da por la expresión de los genes Hox. El segundo rol de estos genes es determinar si las células del mesénquima se convierten en stylopodos (húmero y fémur dado por Hoxa-9 y Hoxd-9), zeugopodos (radio, cúbito, tibia y fíbula determinado por los genes Hoxa-10, Hoxd-10, Hoxa-11, Hoxd-11) o autopodos (metacarpo y dígitos determinado por Hoxd-11, Hoxd-12, Hoxd-13 y Hoxa-13). Se cree que la pérdida evolutiva del quinto dígito en los anfibios se debe a la desaparición del gen Hoxd-12 (Mannaert *et al.* 2006).

IV. Hipótesis

Las altas frecuencias de individuos malformados de la especie *Pseudacris hypochondriaca* en la península de Baja California se deben a la presencia de compuestos químicos en el ambiente capaces de inducir en conjunto alteraciones en el desarrollo. Así, el sinergismo entre distintos compuestos con capacidades teratogénicas, como plaguicidas organoclorados y metales pesados, debería explicar significativamente los altos índices de malformaciones.

V. Objetivos

Objetivo General

- Determinar la incidencia de individuos malformados en doce poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca* en la península de Baja California y establecer los factores que potencialmente son causantes de éstas.

Objetivos específicos

- Cuantificar la frecuencia de individuos de *Pseudacris hypochondriaca* con malformaciones en las doce poblaciones muestreadas,
- Determinar la presencia de plaguicidas organoclorados y metales pesados en sedimentos de doce localidades de la península de Baja California.
- Determinar la relación entre la presencia de contaminantes y la proporción de malformaciones detectada en las doce poblaciones muestreadas
- Determinar la formación de micronúcleos en eritrocitos de individuos de cuatro poblaciones.

VI. Métodos

A. Trabajo de campo

1. Zona de estudio

La península de Baja California se encuentra situada entre los 32°30' latitud N y 117° longitud O en su parte noroeste y entre los 23° latitud N y 110° longitud O en su parte más sureña. Tiene aproximadamente 1300 km de largo con un área de cerca de 143,400 km². Se encuentra bordeada al oeste por el Océano Pacífico y al este por el Mar de Cortés. En general, es árida, presentando temperaturas medias altas y baja precipitación (detalles de clima en Anexo 1). Es de topografía accidentada, presenta una serie de montañas que van de norte a sur casi ininterrumpidamente. Cuenta con ocho regiones fitogeográficas: California, Vizcaíno, Costa central del Golfo, Magdalena, Tropical árido, Sierra la Laguna, Bosque de coníferas de Baja California, Valle del bajo Colorado. Actualmente en la península existen 12 áreas naturales protegidas, de las cuales cinco se encuentran catalogadas como reservas de la biosfera, cinco como parques nacionales y dos como áreas de protección de flora y fauna (www.conanp.gob.mx). Durante este estudio se trabajó tres de las regiones fitogeográficas que componen la península y dentro o en el límite de tres áreas naturales protegidas.

Las regiones fitogeográficas en las que se realizó la investigación son:

Vizcaíno.- región árida que ocupa la tercera parte del centro oeste de Baja California. La influencia marina del océano pacífico llega a esta región, sin embargo, recibe poco aporte de lluvias de invierno y verano. En su mayoría se encuentra compuesta por especies desérticas. En esta región se encuentran las localidades San Ignacio, Cataviña, La Bocana y San Ignacito.

Magdalena.- esta región se encuentra al oeste de la Sierra de Guadalupe y Sierra la Giganta por lo que se encuentra expuesta a las laderas desérticas de estas sierras y al desagüe de las mismas. Su clima se encuentra influenciado durante el otoño por la corriente cálida de Davidson y el resto del año por la corriente fría de California. Presenta neblinas matutinas aunque la

precipitación anual es baja e impredecible debido al efecto de las sierras. En esta región se encuentran las localidades San Javier y Arroyo la Zorra.

Sierra la Laguna.- esta región ocupa las zonas elevadas de la Sierra la Laguna. Por su posición geográfica y altitud, el clima es variado presentando sitios secos y húmedos. Debido a la elevación, presenta tormentas de verano siendo la región de Baja California Sur que recibe la mayor precipitación anual (hasta 700 mm). Presenta selva baja en las tierras bajas y bosques de pino-encino en las partes altas. En esta región se encuentra la localidad Sierra la Laguna (Grismer 2002).

2. Poblaciones por región y área natural protegida (ANP)

Diez de las 12 poblaciones evaluadas se encuentran dentro o en los límites de alguna área natural protegida. Estas áreas son:

Reserva de la Biósfera Sierra la Laguna.- dentro de esta área se encuentra la población Sierra la Laguna.

Reserva de la Biósfera El Vizcaíno.- en los límites de esta área se encuentran las poblaciones: San Ignacio a, San Ignacio c1 y San Ignacio c2.

Parque Nacional Valle de los Cirios.- dentro de esta área se encuentran las poblaciones: Cataviña 1b, Cataviña 2b, Bocana 1, Bocana 2, San Ignacito y El chorruto.

3. Trabajo in situ.

Se realizaron dos salidas a campo durante el año 2005 en los meses de febrero y septiembre. Durante el mes de febrero se visitaron siete poblaciones (Tabla 1A) mientras que en septiembre se dirigió la búsqueda a las zonas donde se detectó el mayor porcentaje de malformaciones en el primer muestreo (Tabla 1B).

a. Organismos

En cada sitio, cuatro personas buscaron individuos de *Pseudacris hypochondriaca* por un tiempo aproximado de cinco horas siguiendo la técnica de relevamiento por encuentros visuales (Heyer *et al.* 1994). Los individuos encontrados se mantuvieron en bolsas de plástico marcadas hasta la llegada al campamento. Cada individuo se revisó minuciosamente con el fin de ubicar anormalidades y estimar el índice de malformaciones por población. Se tomaron datos de peso, longitud, estado de desarrollo y sexo de los mismos. Todos los organismos malformados, así como algunos sanos con el fin de ser utilizados como control, se recolectaron para determinar presencia de plaguicidas organoclorados y formación de micronúcleos. A cada organismo recolectado se le extrajeron vísceras, cuerpos grasos, piel y músculo. Los tejidos se transportaron en nitrógeno líquido. Los organismos que no se recolectaron se liberaron en el mismo sitio donde se encontraron.

b. Sedimentos

Para realizar el análisis de plaguicidas organoclorados (alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos) y metales pesados (arsénico, cadmio, plomo y zinc) se tomaron muestras de sedimentos superficiales (cinco centímetros de profundidad) de las 12 poblaciones visitadas. Las muestras utilizadas para determinar plaguicidas organoclorados se recolectaron con palas de metal y se almacenaron en recipientes de vidrio previamente tratados con hexano. Las muestras utilizadas para determinar metales pesados se extrajeron con palas de plástico y se almacenaron en bolsas de plástico lavadas con una solución de ácido clorhídrico al 10% por 24 horas. El transporte de las mismas se realizó en hielo.

Tabla 1. Sitios de muestreo. A. Sitios visitados durante febrero de 2005. B. Sitios visitados durante septiembre de 2005.

A. Sitios visitados en el primer muestreo	Georreferencia lat N, long W (grados)	B. Sitios visitados en el segundo muestreo	Georreferencia lat N, long W (grados)
Sierra la Laguna (BCS)	23.7N 109.766W	San Ignacio a (BCS)	27.2983N -112.8977W
Todos Santos (BCS)	23.4525N -110.390W	San Ignacio carr (BCS)	27.2983N -112.9053W
San Javier (BCS)	25.8597N -111.543W	San Ignacito (BC)	29.6585N -114.6382W
Arroyo la Zorra (BCS)	25.9346N -111.544W	Bocana (BC)	29.6781N -114.8924W
Las Parras (BCS)	25.9775N -111.432W	El chorrito (BC)	29.7198N -114.7256W
San Ignacio a (BCS)	27.2983N -112.897W	Cataviña (BC)	29.7323N -114.7216W
Cataviña (B.C.)	29.7323N -114.721W		

B. Trabajo de laboratorio

1. Determinación de plaguicidas organoclorados

a. Sedimentos

El trabajo correspondiente a la detección de plaguicidas organoclorados en sedimentos se realizó en el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM. Todas las muestras se secaron en estufa, se molieron y se tamizaron en un tamiz de 2 mm. de diámetro. Para la extracción y purificación de los plaguicidas organoclorados en sedimentos se utilizó el protocolo propuesto por UNEP/IAEA (1982) (Anexo 2). El análisis de las fracciones se realizó en el laboratorio de análisis instrumental de la UAM-Xochimilco.

b. Tejidos.

El trabajo correspondiente a la detección de plaguicidas organoclorados en tejidos se realizó en el Laboratorio de Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM. El análisis de tejidos solo abarcó las poblaciones visitadas durante el segundo muestreo y éste se hizo a partir de las vísceras, cuerpos grasos, piel y músculo recolectados. Debido al poco tejido obtenido, las determinaciones no se pudieron realizar individualmente por lo que se hicieron a nivel poblacional divididas en dos subgrupos: individuos sanos e individuos malformados. Para la extracción y purificación de los plaguicidas organoclorados en organismos se empleó el protocolo de la UNEP/FAO/IAEA (1986) modificado por Díaz-González y Botello (1989). El análisis de las fracciones se realizó en el laboratorio de análisis instrumental de la UAM-Xochimilco.

c. Descripción del protocolo

El protocolo empleado cuenta con tres pasos generales: extracción, cromatografía en columna y cromatografía de gases. Durante el proceso de extracción, se separan los compuestos organoclorados de los sedimentos y tejidos. El extracto obtenido contiene tanto plaguicidas organoclorados como PCB's. Ambos tipos de compuestos se separan durante la cromatografía en columna. Así, al final de ésta, se tienen dos concentrados diferentes uno con los plaguicidas y otro con los PCB's. Las fracciones de estos compuestos se identifican a través de la cromatografía de gases.

1) Extracción

Las muestras de sedimentos (5 g.) y de tejidos (3 g.) se colocaron en un filtro de celulosa previamente lavado con hexano y se sometieron a un proceso de extracción con 250 ml. de hexano por ocho horas en un aparato Soxhlet. El extracto obtenido se concentró a 10 ml. en un rotoevaporador a una temperatura menor a 30°C. En el caso del extracto de las muestras de tejidos, los lípidos además se hidrolizaron con ácido sulfúrico.

2) Cromatografía en columna

Los extractos tanto de tejidos como de sedimentos se filtraron por columnas empacadas con 13 g. de florisil activado a 400°C durante 24 hrs. y desactivado al 1.25% con agua desionizada. Sobre cada una de las emulsiones se agregaron 2 g. de sulfato de sodio anhidro. La fracción I para tejido (PCBs) se eluyó con hexano y la fracción II (plaguicidas) con una mezcla de éter etílico en hexano al 25%. Para sedimentos la fracción I se eluyó con hexano y la fracción II con una mezcla de hexano y éter etílico (9:1) seguida de una mezcla de hexano en éter etílico (8:2). Las dos fracciones se concentraron mediante rotoevaporación.

3) Cromatografía de gases

El análisis de las fracciones se realizó en el laboratorio de análisis instrumental de la UAM-Xochimilco. Éste se hizo con un cromatógrafo de gases Agilent (Hewlett Packard) modelo 6890 con detector de captura de electrones (ECD) bajo el siguiente programa de temperatura de horno:

Inicio : 90 °C por 2 minutos

Velocidades de calentamiento:

1^a : 30°Cmin⁻¹ hasta alcanzar 180 °C

2^a : 1°Cmin⁻¹ hasta alcanzar 200 °C

3^a : 10°Cmin⁻¹ hasta alcanzar 300 °C

Isoterma: 300°C por 6 minutos.

Se utilizó Helio como gas acarreador y una columna capilar HP-5 de 30m de largo por 0.25mm de diámetro interno y 0.25µm de grosor de capa.

2. Determinación de metales pesados

La determinación de metales pesados en sedimentos se realizó en el laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica UNAM. El secado del sedimento se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente éstos se molieron manualmente en un mortero de ágata y se tamizaron

con un tamiz de 2 mm. Se siguió el protocolo de extracción para determinar presencia de metales pesados biodisponibles (Armienta *et al.* 2001), el cual se describe a continuación:

- Pesar un gramo de sedimento
- Agregar 10 ml. de ácido clorhídrico (HCl) y 30 ml. de ácido nítrico (HNO₃)
- Calentar con agitador a 90°C hasta obtener un volumen líquido de aproximadamente 5 mililitros.
- La solución obtenida una vez enfriada se filtra utilizando filtros Wathman No. 1 y se afora a 50 ml. con agua desionizada.

Las muestras se analizaron con un equipo de Absorción Atómica modelo AAnalyst 100 marca Perkin Elmer y por horno de grafito modelo HGA 850 de la misma marca.

3. Cuantificación de micronúcleos

La evaluación de genotoxicidad en organismos de *P. hypochondriaca*, se realizó mediante la prueba de micronúcleos. La cuantificación de los mismos se realizó en eritrocitos. Con este fin, se extrajo sangre de 33 organismos de cuatro poblaciones (Bocana 1, Bocana 2, San Ignacio C1 y San Ignacio C2), con la cual se realizaron frotis. Las muestras se secaron al aire y se fijaron con etanol absoluto, posteriormente se tiñeron utilizando la tinción de giemsa. Cada frotis se revisó en un microscopio óptico con un aumento de 1000x utilizando aceite de inmersión. Por cada organismo se revisaron 5000 células. Para el análisis de los datos se calculó la frecuencia de células micronucleadas/ 1000. Este análisis se realizó en el laboratorio de Toxicología Ambiental del Instituto de Biomédicas UNAM.

4. Análisis de datos

a. Malformaciones

Para realizar los distintos análisis estadísticos los datos correspondientes a frecuencias de malformaciones se transformaron utilizando la transformación de Bliss (Arco cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción). Esta transformación se realizó con el fin de mejorar la

distribución de los valores. La elección de la misma se basó en que es recomendable cuando se trabaja con proporciones debido a que no afecta las colas de la distribución. Los valores de las concentraciones de los plaguicidas y metales pesados se estandarizaron con el fin de convertir todas las variables a una escala similar lo cual es recomendable cuando se van a realizar análisis multivariados. En especial, en el análisis de conglomerados, la estandarización es útil ya que las medidas de distancia son sensibles a la diferencia de escalas o de magnitudes hechas entre variables. Con ésta se evita que variables con gran dispersión tengan un mayor efecto en la similitud (Quinn y Keough 2002).

Para evaluar el efecto sinérgico de los contaminantes en el porcentaje de malformaciones de cada población se realizaron regresiones múltiples con el programa estadístico S-PLUS 2000. La normalidad de cada modelo se evaluó a través de los residuales con la prueba de Shapiro-Wilk. Dicho efecto se analizó primero por familias de plaguicidas (alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos) y metales pesados separadamente, posteriormente en conjunto. Dados los pocos grados de libertad debido al tamaño muestral y con el fin de evitar el fenómeno de multicolinealidad en los datos, el efecto sinérgico de los plaguicidas de las distintas familias y los metales pesados se evaluó también mediante el análisis de conglomerados (jerárquico aglomerativo). La comparación de los conglomerados formados y su validez en la explicación de la proporción de malformaciones se evaluó mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa JMP 5.01.

b. Micronúcleos

El análisis de los datos de genotoxicidad (micronúcleos) se realizó mediante regresiones múltiples y análisis de conglomerados. Los datos de frecuencias se transformaron utilizando la transformación de Bliss (Arco cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción) y los valores de las concentraciones de los plaguicidas y metales pesados se estandarizaron para realizar cada análisis.

VII. Resultados

A. Trabajo de campo

Se revisaron 12 poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca* a lo largo de la península de Baja California (Figura 2). En ambos muestreos se detectaron poblaciones con porcentajes de malformaciones por arriba de los límites considerados naturales (2%) (Ouellet 2000) lo que confirma la presencia de estos casos como un fenómeno persistente más que aleatorio. La frecuencia de individuos malformados varió entre sitios y entre ambos muestreos. En tres poblaciones las frecuencias rebasaron solamente en un 0.2% y 1.4% el límite considerado natural (0%-2%), mientras que en siete poblaciones, al menos en un muestreo, el porcentaje de malformaciones rebasó en mayor proporción el 2%, siendo los casos más drásticos aquellos donde se rebasó por un 23%. Solamente en dos poblaciones se detectaron frecuencias naturales (Figura 3).

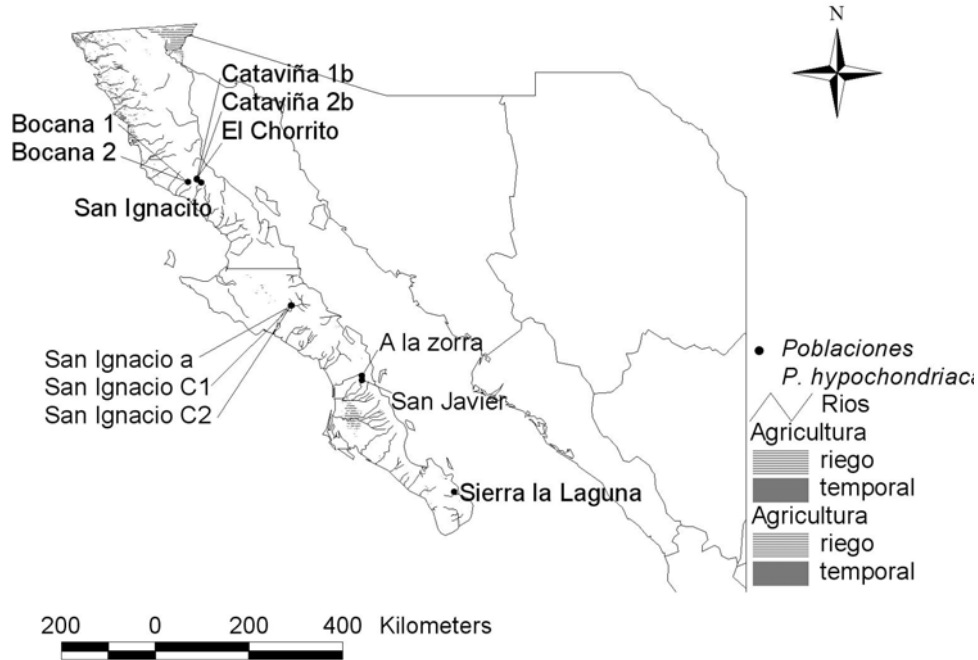


Figura 2. Sitios donde se detectaron las poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca* visitadas durante el desarrollo de este trabajo.

En total se encontraron 885 individuos de los cuales 63 presentaron malformaciones (7.11 %). Los miembros afectados fueron: extremidades, dedos y ojos. Las malformaciones detectadas fueron: ausencia parcial o total de extremidades (ectromelia), réplica de dedos (polidactilia), reducción de dedos (braquidactilia), ausencia de dedos (ectrodactilia), dedos fusionados (sindactilia), ausencia de ojos (anoftalmia), reducción de ojos (microftalmia) y alargamiento de miembros (Anexo 3). Algunos individuos presentaron más de un tipo de malformación, por lo que en total se detectaron 13 casos de ectromelia (20%), 40 de braquidactilia (63%), 22 de ectrodactilia (35 %), 6 de sindactilia (9.5%), 1 de anoftalmia (1.5%), 2 de microftalmia (3.17 %) y 1 de polidactilia (1.5 %). $N_{\text{anomalías}}=85$.

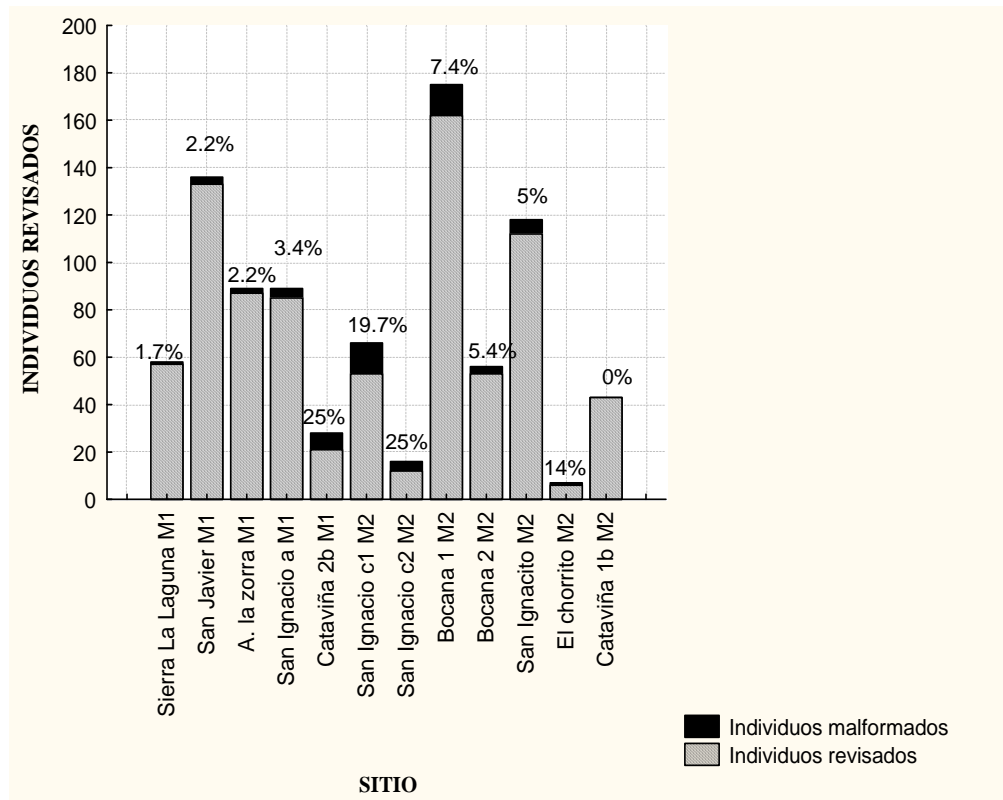


Figura 3. Número de individuos revisados en cada sitio visitado. En negro se muestra la proporción de individuos malformados encontrados en cada población. M1 = muestreo 1. M2 = muestreo 2.

B. Trabajo de Laboratorio

1. Plaguicidas organoclorados

a. Sedimentos

En las 12 poblaciones visitadas se encontraron plaguicidas organoclorados de las familias de alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos. El tipo de plaguicida y la concentración de los mismos varió entre sitios. En algunos casos las concentraciones rebasan aquellas reportadas como causantes de daños al bentos y los límites de calidad de sedimentos establecidos por el ministerio de ambiente de Canadá (2002) y la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) (Figuras 4, 5 y 6 Anexo 4). Además se detectaron concentraciones positivas en compuestos primarios lo que señala una reciente aplicación o transporte de los mismos. Al detectarse también compuestos secundarios se infiere que el uso o presencia de los compuestos primarios en el lugar es un suceso antiguo.

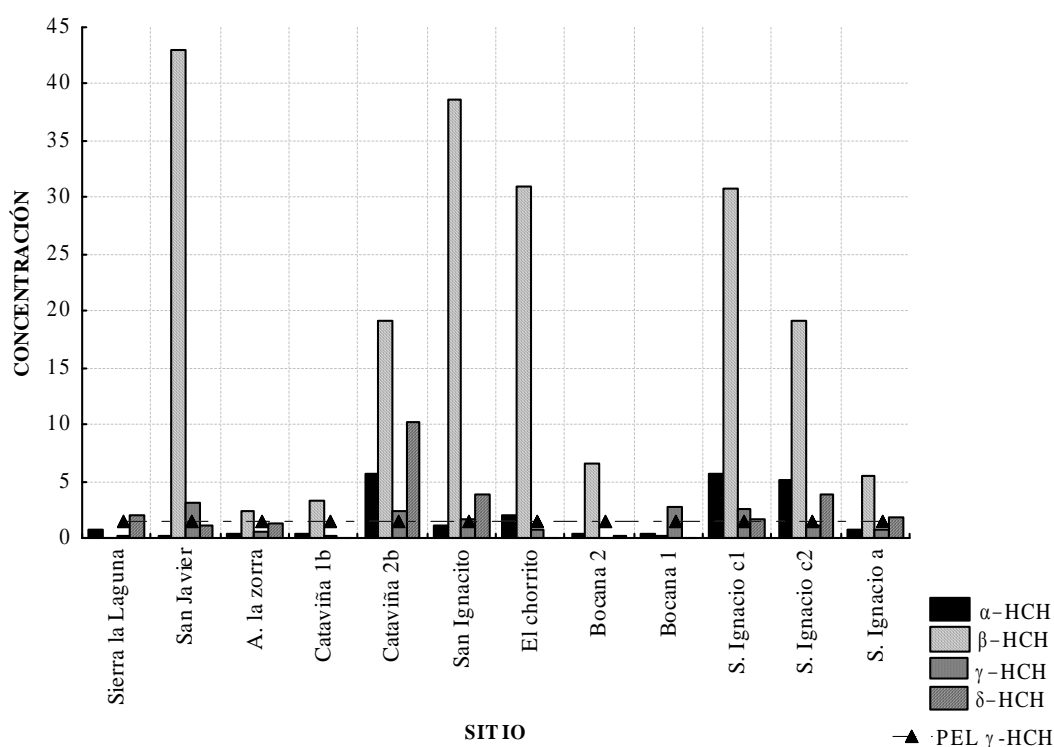


Figura 4. Concentración en partes por billón (ng/g^{-1}) de plaguicidas de la familia de los alicíclicos (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH) a lo largo de 12 poblaciones de *P. hypochondriaca* en la península de Baja California. PEL: Niveles con probables efectos a vida acuática establecidos por el Ministerio Ambiental de Canadá (Canadian Council of Ministers of the Environment 2002).

Las concentraciones por familias de plaguicidas muestran que la familia de los alicíclicos se encuentra presente en las 12 poblaciones, siendo el sitio Cataviña 2b el que presentó mayor concentración de α -HCH y δ HCH y San Javier de β -HCH y γ -HCH (Figura 4). Los compuestos de la familia de los aromáticos se encuentran en cantidades mayores en las poblaciones de la zona de la Bocana y San Ignacio (Figuras 5). La concentración de plaguicidas ciclodiénicos es mayor en las poblaciones de las zonas de Cataviña, La Bocana y San Ignacio (Figura 6). Los datos de los distintos compuestos pueden consultarse en el Anexo 4.

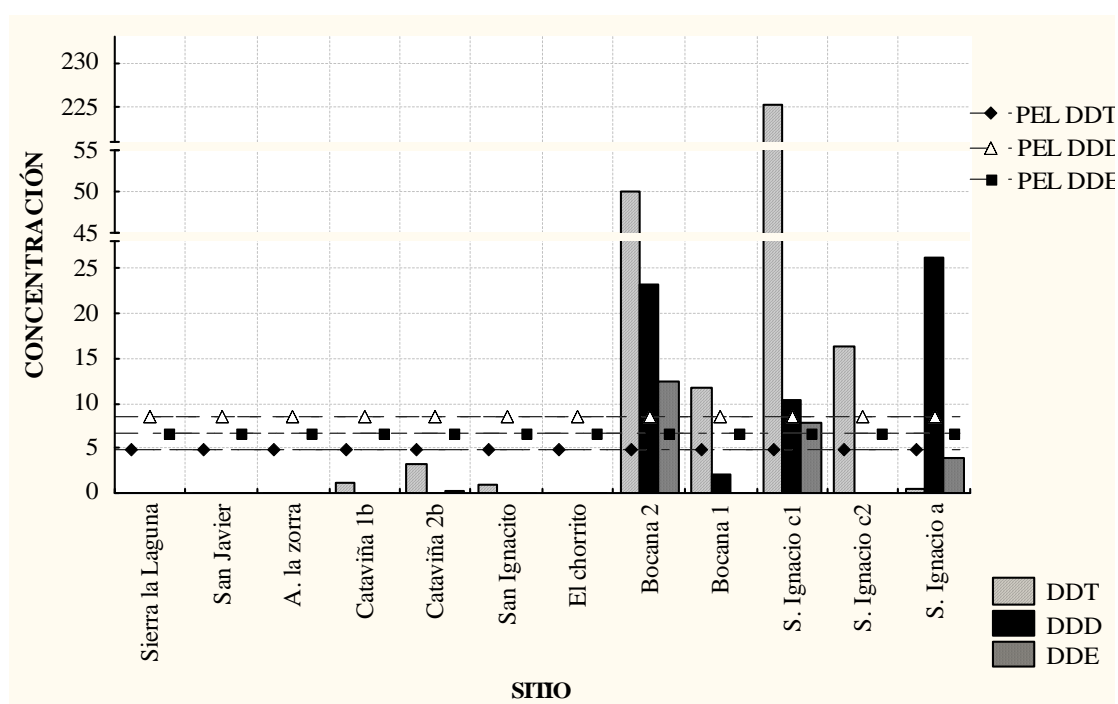


Figura 5. Concentración en partes por billón (ng/g^{-1}) de plaguicidas de la familia de los aromáticos (DDT, DDD, DDE) en muestras de sedimentos de 12 poblaciones de *P. hypochondriaca* en la península de Baja California. PEL: Niveles para cada compuesto con probables efectos a vida acuática establecidos por el Ministerio Ambiental de Canadá (Canadian Council of Ministers of the Environment 2002).

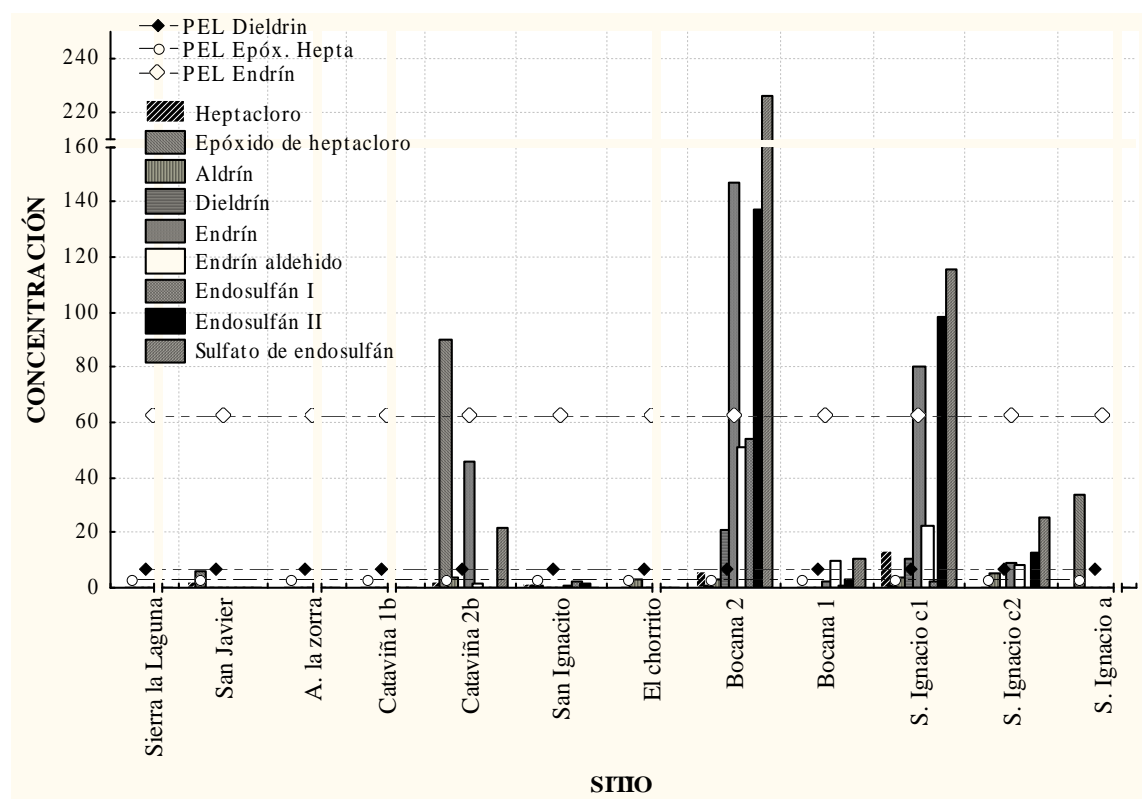


Figura 6. Concentración en partes por billón (ng/g^{-1}) de plaguicidas de la familia de los ciclodiénicos en muestras de sedimentos de 12 poblaciones de *P. hypochondriaca* en la península de Baja California. Niveles con probables efectos a vida acuática establecidos por el Ministerio Ambiental de Canadá (Canadian Council of Ministers of the Environment 2002) para cada compuesto

b. Tejidos

Se detectó bioacumulación de plaguicidas en distintos tejidos (músculo, hígado, estómago, intestino, corazón, cuerpos grasos) de individuos de *P. hypochondriaca*. Esta detección solo se pudo realizar en las muestras del segundo muestreo y en ciertos sitios ya que el tejido disponible no fue suficiente. Cabe señalar que en ninguna población, el peso seco obtenido fue el necesario establecido por el protocolo seguido; por lo que las concentraciones obtenidas de los distintos plaguicidas resultan cuestionables. Por estos motivos no se pudieron analizar los datos estadísticamente. Sin embargo, este análisis refleja datos interesantes sobre la diferencia de concentraciones totales de plaguicidas entre individuos sanos y malformados. En cuatro poblaciones, San Ignacio c1, San Ignacio c2, Bocana 1 y El chorrillo, los individuos malformados mostraron mayor concentración de plaguicidas organoclorados que los organismos sanos (Tabla 2). Las concentraciones de plaguicidas particulares difieren entre los sitios, el único plaguicida

que se presenta en las cuatro poblaciones y mantiene esta relación, mayor concentración en individuos malformados que en sanos, es el epóxido de heptacloro. Estas cuatro poblaciones muestran porcentajes de malformaciones considerados no naturales ($>2\%$).

Tabla 2. Concentración de plaguicidas organoclorados en organismos sanos y malformados de *P. hypochondriaca* en (ng g⁻¹). En todas las poblaciones se obtuvo menos del peso seco necesario (3 gm.) para el método de análisis empleado por lo que, las concentraciones reales podrían ser mayores a las detectadas. En las poblaciones San Ignacio c1, San Ignacio c2, Bocana 1 y El chorrillo, los individuos malformados mostraron mayor concentración total de plaguicidas organoclorados que los organismos sanos. Durante el segundo muestreo en la zona de Cataviña solo se encontraron organismos sanos por lo que no se pudo realizar la comparación con individuos malformados. S = sanos, M= malformados. N.D. valor < 0.01 ng g⁻¹

	El chorrito S	El chorrito M	Cataviña S	San Ignacio c1 S	San Ignacio c1 M	San Ignacio c2 S	San Ignacio c2 M	Bocana1 S	Bocana1 M	Bocana2 S	Bocana2 M	San Ignacio S	San Ignacio M
Alfa-HCH	N.D.	N.D.	N.D.	1.017	3.551	0.809	N.D.	N.D.	1.698	N.D.	N.D.	1.474	N.D.
Beta-HCH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.575	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Gamma-HCH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.814	N.D.	N.D.	0.673	N.D.
Delta-HCH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	3.485	N.D.	N.D.	3.975	N.D.
p, p'-DDT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.013	N.D.	N.D.	6.763	N.D.
p, p'-DDD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	13.530	N.D.	N.D.	5.950	N.D.
p, p'-DDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	15.180	N.D.	N.D.	2.071	N.D.
Heptacloro	N.D.	N.D.	N.D.	5.876	3.899	N.D.	2.414	N.D.	27.982	N.D.	N.D.	16.433	N.D.
Epóxido de heptacloro	N.D.	N.D.	N.D.	8.175	16.604	6.365	6.375	N.D.	93.604	11.970	N.D.	3.486	35.572
Aldrín	N.D.	N.D.	N.D.	4.266	N.D.	N.D.	3.615	N.D.	1.849	N.D.	N.D.	6.079	N.D.
Dieldrín	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	10.639	5.720	2.548	N.D.	17.773	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Endrín	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	28.584	N.D.	N.D.	7.872	N.D.
Endrín aldehído	N.D.	N.D.	N.D.	2.480	2.789	N.D.	N.D.	N.D.	8.757	N.D.	N.D.	4.223	N.D.
Endosulfán I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.821	N.D.	N.D.	7.653	N.D.
Endosulfán II	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.480	N.D.	N.D.	N.D.	51.771
Sulfato de endosulfán	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.543	N.D.	N.D.	9.220	N.D.
ΣOCs	-	-	-	21.81	37.48	12.89	14.95	-	241.69	11.97	-	75.87	87.34
Peso seco de tejido analizado	0.17 gm.	0.014 gm.	0.140 gm.	1.068 gm.	2.241 gm.	0.267 gm.	0.882 gm.	0.039 gm.	0.127 gms	0.267 gm.	0.066 gm.	0.233 gm.	0.155 gm.

2. Metales pesados

Se detectó presencia de arsénico (As) en nueve poblaciones y de plomo (Pb) y zinc (Zn) en todas las poblaciones aunque la concentración de los mismos varió entre sitios (Figura 7). Las poblaciones que presentaron mayor concentración, en orden descendiente, de arsénico fueron: Bocana 1, Bocana 2, San Ignacio c2, Cataviña 2b y San Ignacio c1; de plomo: San Ignacio c2, San Ignacito, Cataviña 2b, Bocana 1, Bocana 2 y Sierra La Laguna y de zinc: San Ignacio c1, San Ignacito, Bocana 2, Bocana 1 y Cataviña 2b. En ningún lugar se detectó cadmio (Cd). Cabe mencionar que éste puede estar presente en concentraciones menores a las detectables (0.01ng/g^{-1}) bajo el método empleado en este estudio.

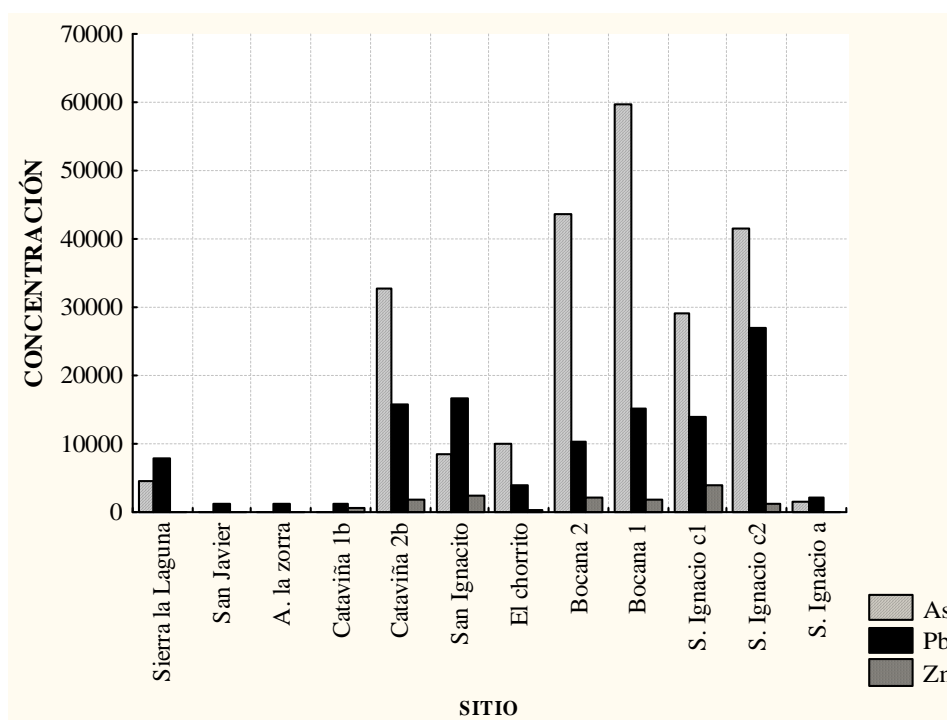


Figura 7. Concentración en partes por billón (ng/g^{-1}) de arsénico, plomo y zinc en muestras de sedimentos de 12 poblaciones revisadas en febrero y septiembre de 2005. Aquellas con mayor concentración de estos compuestos presentan altas proporciones de malformaciones.

3. Cuantificación de micronúcleos

Se determinó formación de micronúcleos en eritrocitos de individuos de las zonas de San Ignacio y La Bocana. El promedio de la frecuencia en 1000 células por sitio fue el siguiente: Bocana 1: 0.472 Bocana 2: 0.335, S. Ignacio c1: 0.438 y S. Ignacio c2: 0.327. Los datos correspondientes a cada organismo pueden consultarse en la tabla 3.

Tabla 3. Número de micronúcleos, número de células revisadas y frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de individuos de *Pseudacris hypochondriaca* en las zonas de la Bocana y San Ignacio.

Localidad	Muestra	Núm de MN	Células revisadas	Frecuencia de MN
Bocana 1	EGB 105	3	5163	0.58105752
Bocana 1	EGB 108	3	5137	0.58399844
Bocana 1	EGB 109	2	7020	0.28490028
Bocana 1	EGB 110	3	5086	0.5898545
Bocana 1	EGB 111	1	5027	0.1989258
Bocana 1	EGB 112	3	5032	0.59618442
Bocana 2	EGB 113	0	5186	0
Bocana 2	EGB 114	0	5116	0
Bocana 2	EGB 115	1	5059	0.19766752
Bocana 2	EGB 116	3	5022	0.59737157
Bocana 2	EGB 117	2	5093	0.39269586
Bocana 2	EGB 118	4	5161	0.7750436
Bocana 2	EGB 140	2	5213	0.38365624
S Ignacio c1	EGB 123	7	5059	1.38367266
S Ignacio c1	EGB 124	0	5133	0
S Ignacio c1	EGB 125	1	5044	0.19825535
S Ignacio c1	EGB 126	3	5058	0.59311981
S Ignacio c1	EGB 127	6	5012	1.1971269
S Ignacio c1	EGB 130	2	5225	0.38277512
S Ignacio c1	EGB 132	4	5440	0.73529412
S Ignacio c1	EGB 133	2	6057	0.33019647
S Ignacio c1	EGB 134	1	5051	0.1979806
S Ignacio c1	EGB 135	2	7040	0.28409091
S Ignacio c1	EGB 136	0	5062	0
S Ignacio c1	EGB 137	1	5042	0.19833399
S Ignacio c1	EGB 138	1	5027	0.1989258
S Ignacio c2	EGB 100	0	8204	0
S Ignacio c2	EGB 101	0	5043	0
S Ignacio c2	EGB 102	3	7120	0.42134831
S Ignacio c2	EGB 119	3	5056	0.59335443
S Ignacio c2	EGB 120	6	7032	0.85324232
S Ignacio c2	EGB 121	0	5079	0
S Ignacio c2	EGB 122	3	7142	0.42005041

4. Análisis de datos

a. Malformaciones y contaminantes

1) Plaguicidas alicíclicos

El análisis aglomerativo de conglomerados formado a partir de la concentración de plaguicidas alicíclicos, muestra la formación de dos conglomerados (Figura 8). El conglomerado 2 se encuentra conformado por las poblaciones que presentan las frecuencias de malformaciones más altas. Estas poblaciones son: Cataviña 2b, San Ignacio C1 y San Ignacio C2 cada una con un 25, 20 y 25% de malformaciones respectivamente. El conglomerado 1 lo forman el resto de las poblaciones. Al analizar la relación que mantiene este arreglo con la concentración de plaguicidas se observó que las poblaciones del conglomerado 2 tienen en común una mayor concentración de los cuatro estereoisómeros del hexaclorociclohexano (α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ HCH) (Figura 9). El análisis de varianza (ANOVA) realizado considerando la proporción de malformaciones como variable dependiente y los conglomerados como variable independiente muestra que las medias de la proporción de malformaciones, 0.18 para el conglomerado 1 y 0.5 para el conglomerado 2, son estadísticamente significativas ($R^2 = 0.67$, $p < 0.01$).

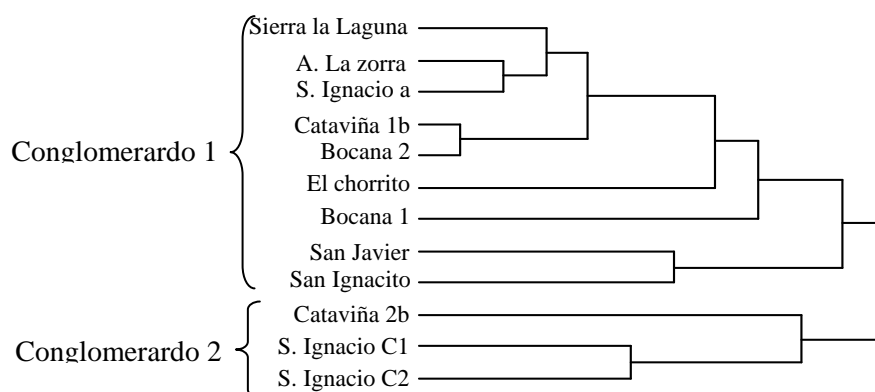


Figura 8. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los alicíclicos (α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ HCH).

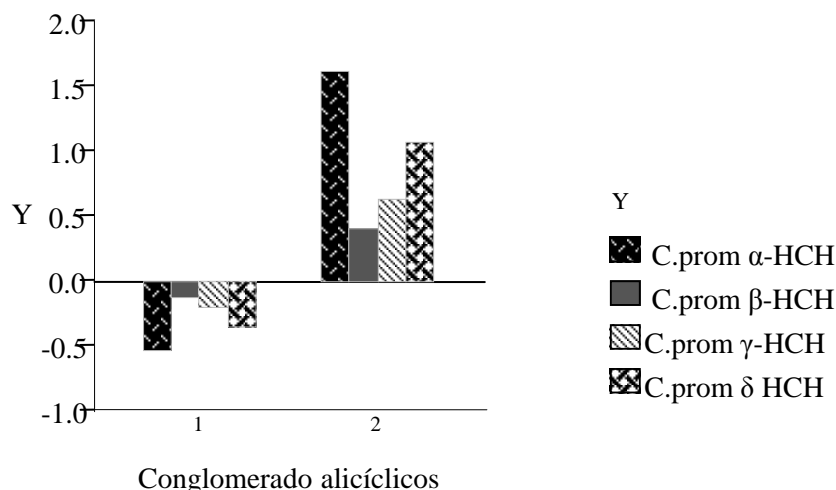


Figura 9. Concentración promedio de los componentes del hexaclorociclohexano en las poblaciones que conforman cada conglomerado. Se observa que las poblaciones que conforman el conglomerado 2 presentan mayor concentración de dichos compuestos. Los valores negativos se observan debido a la estandarización de los datos.

Al analizar el efecto sinérgico de los componentes del hexaclorociclohexano mediante una regresión múltiple, se observa una relación significativa entre la proporción de malformaciones y la concentración del esteroisómero α -HCH. La concentración de α -HCH explica en un 79% la proporción de malformaciones observadas en las distintas poblaciones ($R^2 = .79$ F $p < 0.05$). La prueba de Shapiro-Wilk muestra que los residuos de la variable dependiente no rechazan el supuesto de normalidad.

2) Plaguicidas aromáticos

En contraste a lo obtenido con el HCH, al analizar de la misma manera los datos correspondientes a plaguicidas aromáticos (DDT, DDD, DDE) la formación de los grupos no muestra ninguna relación con la proporción de malformaciones (Figura 10) a pesar de que las poblaciones que forman el conglomerado 2 tienen mayor concentración del DDT y sus derivados (Figura 11). El análisis de varianza (ANOVA) muestra que no hay diferencias ($p > 0.05$) entre la proporción de malformaciones de los conglomerados (0.25 para el conglomerado 1 y 0.29 para el conglomerado 2).

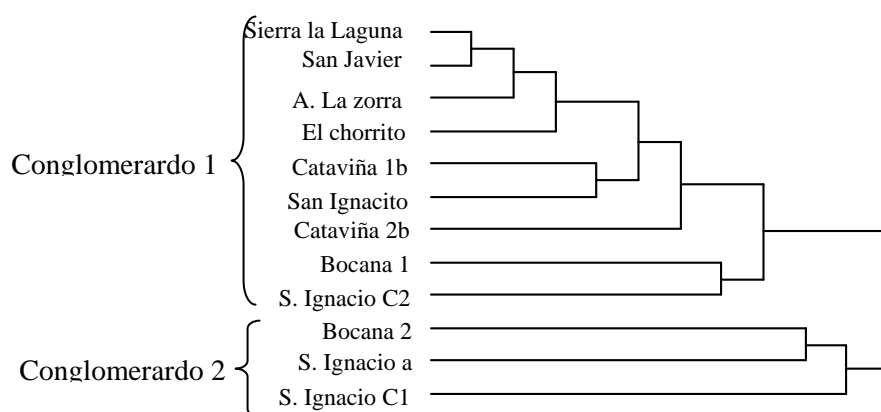


Figura 10. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los aromáticos (DDT, DDD, DDE).

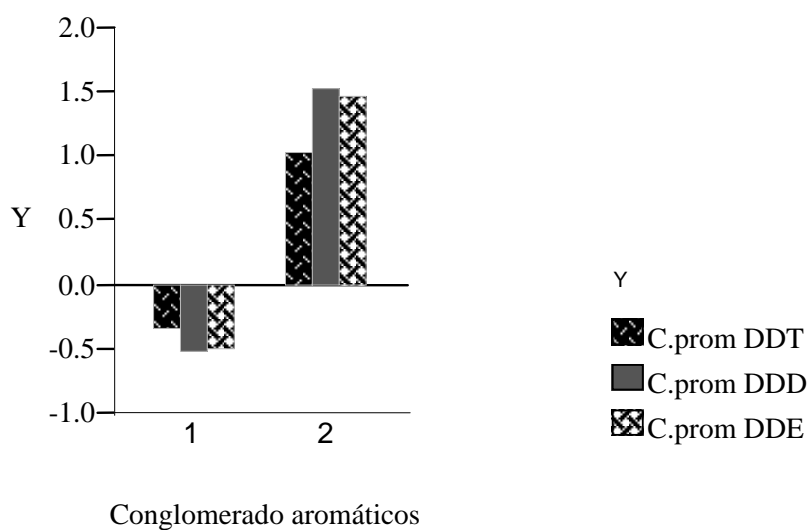


Figura 11. Concentración promedio de plaguicidas aromáticos (DDT, DDD y DDE) en las poblaciones que conforman cada conglomerado. Se observa que las poblaciones que conforman el conglomerado 2 presentan mayor concentración de dichos compuestos; sin embargo, los grupos encontrados no mantienen ninguna relación con la proporción de malformaciones detectada en cada población. Los valores negativos se observan debido a la estandarización de los datos.

Por otra parte, el análisis de regresión múltiple realizado, muestra que no existe una relación significativa de la presencia de estos compuestos con la proporción de malformaciones

($R^2=0.17$ $p > 0.05$). El análisis de los residuos de la variable dependiente mediante la prueba de Shapiro-Wilk muestra que el modelo no viola la normalidad.

3) Plaguicidas ciclodiénicos

Al analizar la proporción de malformaciones por la presencia de plaguicidas ciclodiénicos se observa la formación de dos conglomerados. El conglomerado 1 con 10 poblaciones y el conglomerado 2 con dos de las poblaciones con índices de malformaciones altos (Figura 12) siendo éstas las que presentan mayor concentración de dichos plaguicidas (Figura 13). El análisis de varianza (ANOVA) muestra que el promedio del porcentaje de malformaciones (0.25 y 0.34 para el conglomerado 1 y 2 respectivamente) no se encuentra explicado por la presencia en conjunto de estos compuestos ($p>0.05$).

Por otro lado, el análisis de regresión múltiple muestra que el epóxido de heptacloro, el aldrín, el endrín aldehído, el endosulfán I y el sulfato de endosulfán se relacionan significativamente con la proporción de malformaciones explicando un 91% de las mismas ($R^2 = .91$, $p < 0.01$). La prueba de Shapiro-Wilk muestra que los residuos de la variable dependiente no rechazan el supuesto de normalidad.

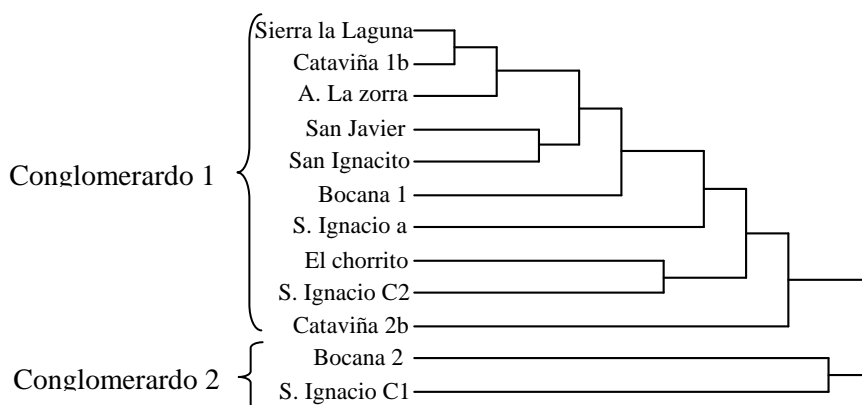


Figura 12. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados de la familia de los ciclodiénicos (Heptacloro, Epóxido de heptacloro, aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, Endosulfán I, Endosulfán II, Sulfato de Endosulfán).

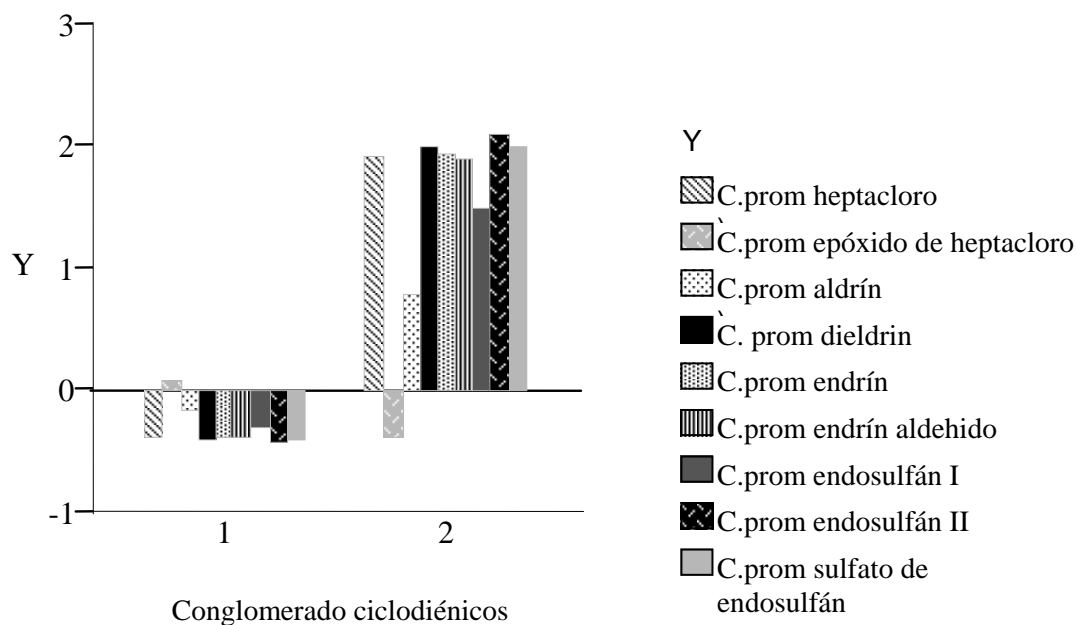


Figura 13. Concentración promedio de plaguicidas ciclodiélicos y sus compuestos secundarios en las poblaciones que conforman cada conglomerado. Se observa que las poblaciones del conglomerado 2 presentan mayor concentración de dichos compuestos. Los valores negativos se observan debido a la estandarización de los datos.

4) Metales pesados

El arreglo de conglomerados obtenido a partir de la presencia de arsénico, plomo y zinc en los distintos sitios es el que mejor agrupa a las poblaciones con respecto al índice de malformaciones. Todas las poblaciones con índices por debajo del 5% a excepción del sitio “El chorrillo”, quedan incluidas en el grupo 1, mientras que las poblaciones con índices mayores quedan en el conglomerado 2 (Figura 14). Las concentraciones de los metales son mayores en las poblaciones del grupo 2 (Figura 15) y las diferencias entre las medias de las proporciones de malformaciones, 0.15 y 0.37 para el conglomerado 1 y 2 respectivamente, fueron significativas ($p < 0.05$).

Al analizar el efecto sinérgico del arsénico, plomo y zinc mediante una regresión múltiple, se observa una relación significativa entre la proporción de malformaciones y la concentración del plomo. La concentración de plomo explica en un 55% la proporción de malformaciones

observadas en las distintas poblaciones ($R^2 = .55$ F $p < 0.01$). La prueba de Shapiro Wilk muestra que los residuos de la variable dependiente no rechazan la normalidad.

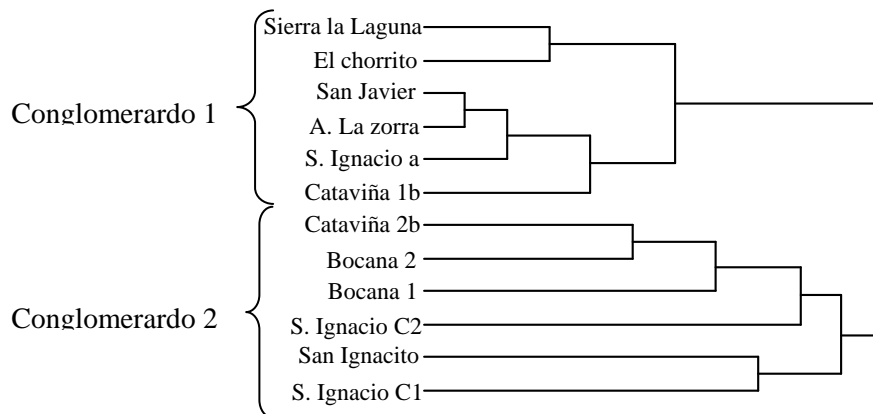


Figura 14. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de metales pesados (As, Pb, Zn).

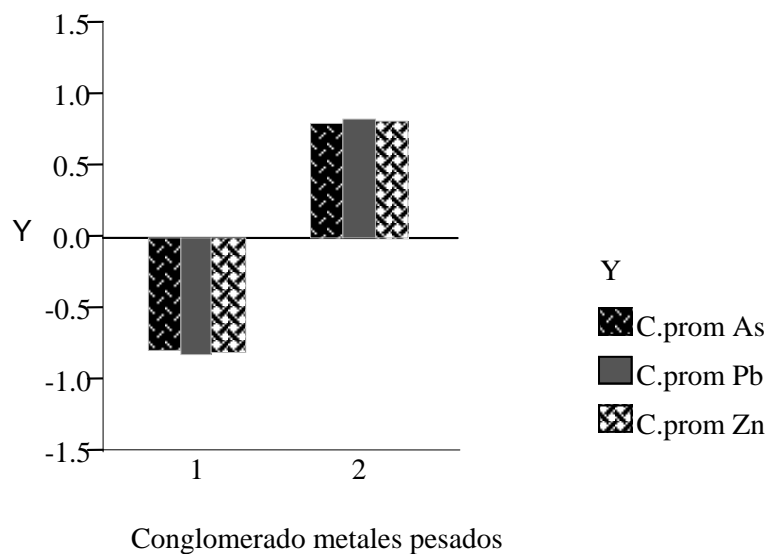


Figura 15. Concentración promedio de metales pesados (As, Pb y Zn) en las poblaciones que conforman cada conglomerado. Se observa que las poblaciones del conglomerado 2 presentan mayor concentración de dichos compuestos. Los valores negativos se observan debido a la estandarización de los datos.

5) Efecto sinérgico: plaguicidas organoclorados y metales pesados

Con el fin de evaluar el efecto sinérgico de los distintos compuestos se realizó un análisis de conglomerados con todos los plaguicidas detectados y los metales pesados. Al analizar la proporción de malformaciones por la presencia de dichos compuestos se puede observar la formación de cuatro conglomerados. Los conglomerados 1 y 2 se encuentran formados por las poblaciones con menores índices de malformaciones a excepción de los sitios “El chorrillo” y “San Ignacio”. Los conglomerados 3 y 4 lo conforman las poblaciones con proporciones de malformaciones por arriba de las naturales (Figura 16). Se puede observar que las poblaciones con mayores índices de malformaciones (conglomerado 3 y 4) presentan mayor concentración de estos compuesto (Figura 17).

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que el promedio del porcentaje de malformaciones (0.11, 0.23, 0.44 y 0.34 para el conglomerado 1, 2, 3 y 4 respectivamente) se encuentra explicado por la presencia en conjunto de estos compuestos ($p = 0.05$) lo que sugiere un posible sinergismo entre éstos.

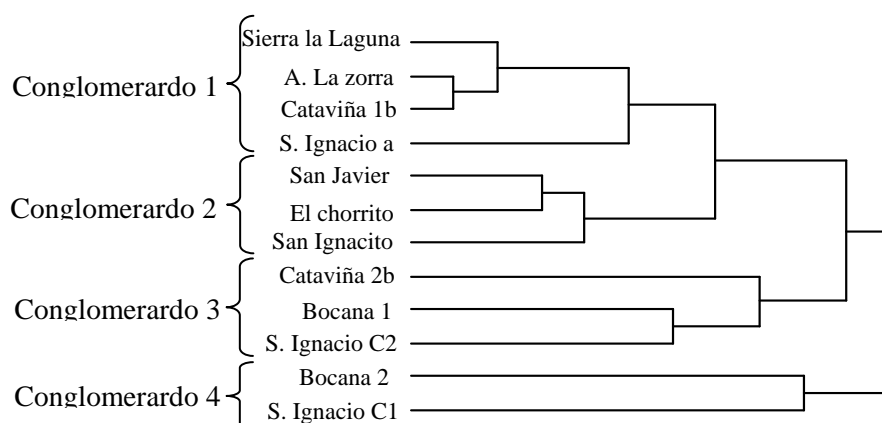
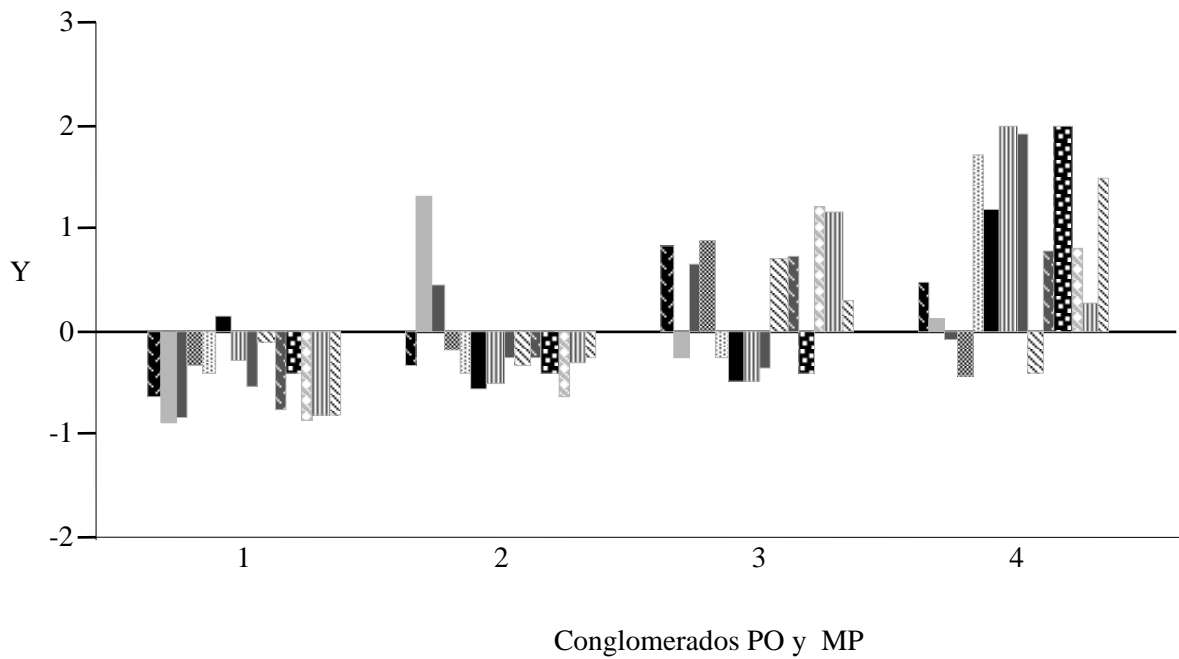


Figura 16. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de plaguicidas organoclorados (alicíclicos, aromáticos, ciclodiénicos) y metales pesados (As, Pb, Zn).



Y















-  C.prom α-HCH
-  C.prom β-HCH
-  C.prom γ-HCH)
-  C.prom δ HCH
-  C.prom DDT
-  C.prom DDD)
-  C.prom DDE
-  C.prom heptacloro
-  C.prom epox. hepta
-  C.prom aldrín
-  C.prom dieldrin
-  C.prom As
-  C.prom Pb
-  C.prom Zn

Figura 17. Concentración promedio de plaguicidas organoclorados y metales pesados en las poblaciones que conforman cada conglomerado. Se observa que las poblaciones del conglomerado 3 y 4 presentan mayor concentración de dichos compuestos. Los valores negativos se observan debido a la estandarización de los datos.

b. Micronúcleos

Al analizar el promedio de la frecuencia de micronúcleos por la presencia de plaguicidas organoclorados y metales pesados mediante el análisis aglomerativo jerárquico de conglomerados, se puede observar que se forman dos conglomerados (Figura 18). Sin embargo, este arreglo no presenta ninguna relación consistente con la frecuencia de micronúcleos detectada en cada población ni con la presencia de los distintos contaminantes (Figura 19). El análisis de varianza (ANOVA) muestra que la diferencia entre las medias de las frecuencias de los micronúcleos para cada conglomerado resulta no significativa ($p > 0.05$). La falta de consistencia en este análisis puede deberse a la baja cantidad de poblaciones revisadas sin embargo, la formación de micronúcleos en dichas poblaciones es un evento real. La presencia de este bioindicador en eritrocitos puede estar asociado a agentes genotóxicos en el ambiente como se refleja en el análisis de regresión múltiple.

Al analizar si la interacción entre los distintos compuestos explica la frecuencia de micronúcleos con una regresión múltiple se observa una relación significativa entre dicha frecuencia y la presencia de lindano (γ -HCH), y el estereoisómero δ -HCH. La concentración de estos alicíclicos explica en un 99% las frecuencias de micronúcleos observadas en dichas poblaciones ($R^2 = .99$ $p < 0.05$). La prueba de Shapiro-Wilk muestra que el modelo no rechaza el supuesto de normalidad. Estos resultados sugieren que el lindano en conjunto con el estereoisómero delta HCH puede ser un inductor de clastogénesis en individuos de *P. hypochondriaca*.

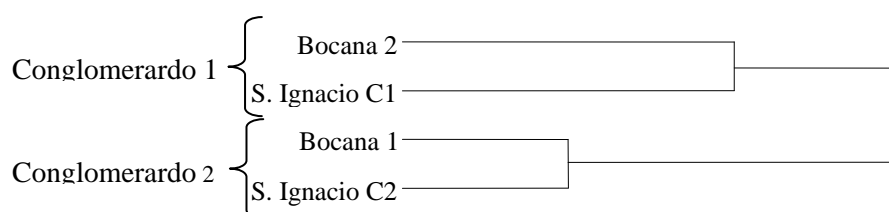


Figura 18. Dendrograma obtenido del análisis jerárquico aglomerativo de conglomerados a partir de la concentración de compuestos primarios de plaguicidas organoclorados (alicíclicos, aromáticos, ciclodiénicos y metales pesados (As, Pb, Zn). La agrupación no muestra relación con la frecuencia de micronúcleos detectada en cada población.

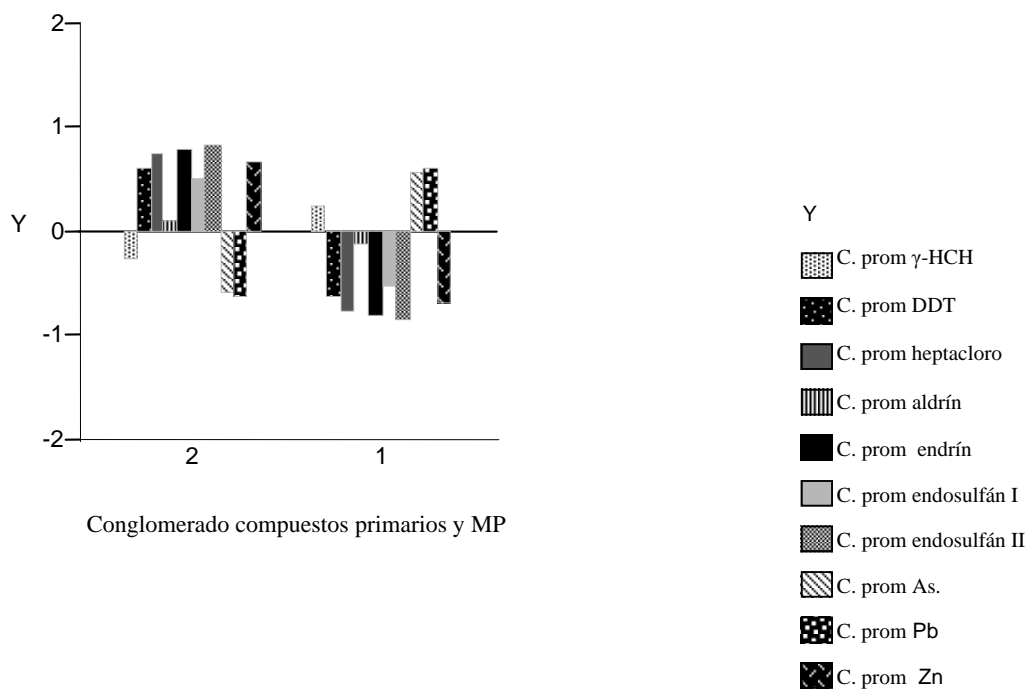


Figura 19. Concentración promedio de plaguicidas primarios y metales pesados en las poblaciones que conforman cada conglomerado. La presencia de contaminantes no muestra ninguna relación con el arreglo. No se define una asociación con la frecuencia de micronúcleos.

VIII. Discusión

A. Malformaciones y contaminantes

Uno de los factores asociados al declive de anfibios es el aumento de la incidencia de malformaciones en poblaciones silvestres de anfibios. Las malformaciones han sido relacionadas con eventos de muertes masivas y disminuciones en poblaciones (Blaustein y Johnson 2003). En general, éstas pueden afectar negativamente a los individuos al interferir con el nado, el movimiento terrestre, la adquisición de alimento, la reproducción, al aumentar la vulnerabilidad a depredadores y parásitos o al alterar funciones fisiológicas si se presentan en órganos (Blaustein y Johnson 2003, Hopkins *et al.* 2000, Johnson *et al.* 1999). Por estos motivos, las malformaciones pueden alterar la tasa de reclutamiento a nivel poblacional.

En la península de Baja California, se encontraron 10 de 12 poblaciones de *Pseudacris hypochondriaca* con frecuencias de malformaciones mayores a las consideradas naturales. Estos casos pudieron corroborarse en distintas épocas del año durante los meses de febrero y septiembre lo cual, confirma que la presencia de individuos malformados en proporciones anormales es un evento persistente. La mayoría de las malformaciones detectadas fueron en extremidades, dada esta consistencia, es probable que el factor inductor sea el mismo en todas las poblaciones y por ende ambiental. Existe un acuerdo general de que a pesar de la variación en los tipos de malformaciones en anfibios en el mundo, éstas representan anomalías congénitas inducidas por factores ambientales. Ya que el mismo tipo de malformaciones se han encontrado en áreas de amplio rango, resulta improbable que una alteración genética haya surgido independientemente en ocasiones y especies múltiples. Se ha señalado además que dada la conservación de los mecanismos que controlan el desarrollo de las extremidades en vertebrados es probable que haya uno o más agentes ambientales que interfieren con el funcionamiento normal de los procesos de desarrollo (Meteyer *et al.* 2000).

Los anfibios, como otros organismos, se encuentran expuestos a una mezcla de contaminantes cuyos efectos resultan complejos. La contaminación química ocasionada por la aplicación de plaguicidas, sigue siendo un factor considerado como contribuyente a las disminuciones de las poblaciones de anfibios. Debido a sus preferencias de hábitat, se considera que los anfibios pueden ser más vulnerables que otros organismos acuáticos a los efectos tóxicos

de dichos compuestos, ya que al habitar cuerpos de agua lénticos o temporales se encuentran expuestos a contaminantes poco diluidos (Daly *et al.* 2007, Stuart *et al.* 2004, Sparling *et al.* 2001). Por otra parte, se ha documentado una estrecha relación entre el uso de plaguicidas y la frecuencia de malformaciones en extremidades de anuros (Ouellet *et al.* 1997). Individuos de las especies *Rana clamitans*, *Rana pipiens*, *Bufo americanus* y *Rana catesbeiana*, en pozas aledañas a campos de cultivo tratados con plaguicidas presentan una alta incidencia de reducción de miembros en comparación a aquellos presentes en pozas rodeadas de suelos no cultivados y por ende no contaminados. Se sugiere que los compuestos utilizados en la agricultura podrían ser inductores de anomalías morfológicas (Ouellet *et al.* 1997), sin embargo; en dicho estudio no se identifican los plaguicidas presentes.

Pseudacris hypochondriaca es una especie que en Baja California habita en oasis, arroyos intermitentes y pozas de agua temporales formadas a partir de lluvia o de agua transportada por aseQUIAS. Prefiere cuerpos de agua lénticos y poco profundos para habitar y reproducirse, por lo que mantiene un estrecho contacto con el agua y los sedimentos en todas las etapas de desarrollo. Así, las vías de exposición a contaminantes en esta especie resultan variadas. Es sabido que los sedimentos son el reservorio final de diversos contaminantes y que la reincorporación de estas sustancias al ecosistema se ve promovida, entre otros factores, por la actividad de organismos acuáticos asociados a los mismos (Edwards 1973, Goldberg, 1975). Especialmente en la etapa larval, el contacto con los sedimentos es más intenso; los renacuajos realizan la búsqueda y obtención de alimento en los mismos. Durante estas actividades, además de ingerir sedimentos, pueden remover y dispersar los compuestos presentes en éstos hacia el agua. Al habitar cuerpos de agua poco profundos, la exposición a diversos contaminantes en la columna de agua puede aumentar. Así, es probable que esta sea la etapa de mayor contacto directo con distintos compuestos. Sin embargo, cabe mencionar que se ha documentado que compuestos lipofílicos, como los organoclorados, atraviesan fácilmente la membrana protectora de los huevos. Dichos compuestos además, son capaces de difundirse en las membranas plasmáticas (Venturino *et al.* 2003) por lo que la exposición a los mismos durante esta etapa también resulta significativa. Durante la fase adulta, además del contacto con agua y sedimentos aledaños a los cuerpos de agua, otra vía de exposición a contaminantes la representan los organismos de los que se alimentan. Al ser los adultos carnívoros, adquieren y acumulan los compuestos que a su vez los organismos de los que se alimentan han acumulado. Los procesos de bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas organoclorados se encuentran documentados (Datta *et al.* 1998, Guilliland *et al.* 2001).

1. Plaguicidas organoclorados

Debido a su uso constante en la agricultura, industria y actividades sanitarias durante los últimos años, los plaguicidas organoclorados se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Desde su descubrimiento en 1939, el uso de estos compuestos se duplicaba cada 10 años tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Se estima que para la década de los 80's alrededor de 600,000 toneladas de plaguicidas se exportaban anualmente a países en vías de desarrollo de las cuales 50,000 se utilizaron en campañas de salud pública. Actualmente, a pesar de que varios de estos compuestos se encuentran prohibidos en países desarrollados aún se producen en éstos para su exportación a países en vías de desarrollo (Dich *et al.* 1997). La prohibición del uso de estos compuestos orgánicos persistentes radica en su alta toxicidad para la mayoría de los organismos. Se ha demostrado que tienen efectos mutagénicos, teratogénicos y a nivel de sistemas metabólicos como la reproducción en distintos organismos (Davidson *et al.* 2002, Donohoe *et al.* 2000, Hayes *et al.* 2006).

Los efectos que dichos compuestos tienen en los anfibios pueden ser letales o subletales. Entre los efectos subletales se encuentran las malformaciones (Venturino *et al.* 2003). La detección de individuos malformados de *P. hypochondriaca* en ambos muestreos en proporciones por arriba de los límites considerados naturales (2%) confirma la presencia de malformaciones como un fenómeno persistente más que aleatorio en poblaciones de la península de Baja California. Resulta probable que la exposición a los factores inductores de malformaciones sea constante. En ambos muestreos además se detectaron plaguicidas organoclorados y metales pesados. La presencia de algunos de ellos, como los alicíclicos, arsénico, plomo y zinc, se da en los sitios con mayores porcentajes de malformaciones. Las concentraciones, en algunos casos, rebasan aquellas establecidas como seguras para el medio y la vida silvestre por otros países (Anexo 4).

a. Plaguicidas alicíclicos

Al evaluar la relación de los componentes del hexaclorociclohexano con el índice de malformaciones se observó una diferencia entre lo obtenido a partir del método de regresión

múltiple y el análisis de conglomerados. El modelo del análisis de regresión múltiple, en contraste al de conglomerados, lo conforma únicamente el α -HCH. Cabe mencionar, que esto puede deberse a la fuerte correlación que existe entre el α -HCH y la proporción de malformaciones fenómeno que puede “enmascarar” estadísticamente el efecto que tienen los otros componentes. Al ser α -HCH un isómero que forma parte del hexaclorociclohexano y no un compuesto secundario, su presencia en el medio está asociada a la presencia de los otros estereoisómeros por lo que no debe ignorarse el efecto que en conjunto pueden ocasionar. Este efecto se ve reflejado de una manera significativa en el análisis de conglomerados que muestra que las poblaciones con mayor índice de malformaciones, tienen en común la presencia de los 4 estereoisómeros en mayor concentración en comparación a las poblaciones de menor índice de malformaciones.

El hexaclorociclohexano (HCH) es un compuesto sintético que existe en ocho isómeros, cuyos nombres se refieren a la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura del químico. Los isómeros analizados en este estudio son α -HCH, β -HCH, δ -HCH, y γ -HCH, éste último llamado comúnmente lindano. El HCH se descompone en los organismos en otras sustancias como clorofenoles, los cuales tienen propiedades tóxicas. En exposiciones agudas el γ -HCH es el isómero más tóxico seguido de α -, δ -, y β -HCH mientras que en exposiciones crónicas β -HCH es el más tóxico seguido de α -, γ -, y δ -HCH. La alta toxicidad de β -HCH probablemente se debe a su mayor vida media en el organismo y por la acumulación del mismo en el tiempo (Toxprofiles 2003). El HCH tiene efectos fetotóxicos, embriotóxicos (Hassoun y Stohs 1996b), clastogénicos (Kumar *et al.* 1995) y es inductor de cáncer en mamíferos. En un estudio con ratones expuestos a 45 mg/kg/día de cada isómero se demostró que la exposición individual a β -HCH, γ -HCH o δ -HCH no provocó cáncer hepatocelular, sin embargo, cuando los organismos se expusieron a la mezcla pareada con el isómero α -HCH se detectó este padecimiento. Este caso sugiere que el α -HCH puede ser un inductor de cáncer en presencia de otros isómeros o individualmente (Ito *et al.* 1973). Estos datos apoyan lo encontrado en el análisis de conglomerados. Considerando que tanto el cáncer como diversos efectos embriotóxicos pueden inducirse por estrés oxidativo promovido por distintos compuestos, entre ellos, los clorados; resulta importante tomar en cuenta que dada la composición del HCH la exposición al α -HCH, β -HCH, δ -HCH, y γ -HCH en el ambiente se da en conjunto. Así, el efecto de los mismos es a través de un sinergismo y por ende de mayor impacto. El efecto sinérgico del lindano por la interacción con otros compuestos se encuentra documentado (Saxena *et al.* 1986, Chadwick y Freal 1972b).

El HCH es un insecticida utilizado en el tratamiento de sarna, piojos y otros ectoparásitos tanto en humanos como en animales por lo que su aplicación ha sido tanto doméstica como agrícola (Budavari *et al.* 1989). En México, su uso aún es autorizado (CICOPLAFEST 1998).

b. Plaguicidas aromáticos

En contraste a lo obtenido con el hexaclorociclohexano, la presencia de plaguicidas aromáticos (DDT, DDD, DDE) no mantiene ninguna relación con la proporción de malformaciones. A pesar de la consistencia entre ambos análisis, estos resultados no descartan la posibilidad de que el DDT pueda estar ocasionando malformaciones en individuos de *P. hypochondriaca* puesto que se ha documentado que este compuesto es inductor de malformaciones en espina dorsal y mandíbulas de renacuajos así como causante de daños neurológicos y conductuales en esa etapa del desarrollo (Cooke 1970, 1972, 1973 Osborn *et al.* 1981). Debido a que este estudio se basó únicamente en medir el porcentaje de malformaciones en individuos adultos, el efecto que el DDT puede estar teniendo en la etapa larval se encuentra ignorado.

Por otro lado, durante el segundo muestreo realizado se notó una alteración en la proporción de sexos a lo largo de todas las poblaciones visitadas. De diez individuos revisados durante septiembre de 2005, nueve fueron hembras. Esta situación sugiere que en la zona se pueden estar dando procesos de disrupción endócrina. Se sabe que distintos plaguicidas organoclorados, como el DDT, son disruptores endócrinos (ToxProfiles 2003). Otros de los efectos conocidos de este compuesto en anfibios son: retraso de la metamorfosis, hiperactividad y movimientos descoordinados en renacuajos (Cooke 1970, 1972, 1973).

Debe considerarse además, que en la naturaleza la exposición a plaguicidas y otros compuestos es en conjunto lo que puede ocasionar que los efectos de dichas sustancias resulten, en algunos casos, aditivos. Por ejemplo, se ha observado que el DDT en conjunto con el dieldrín ocasiona alargamiento anormal de hígado en ratones en contraste a cuando cada uno de estos compuestos se administra individualmente (Walker *et al.* 1972). Por otro lado, se ha documentado que existe una relación entre la aplicación de DDT y disminuciones en poblaciones de *Rana temporaria* y *Bufo bufo* en Inglaterra y que estos anfibios tienden a acumular más este compuesto en comparación a peces y caracoles (Cooke 1973).

Se sabe además que el DDT tiene el potencial de alterar acciones hormonales por lo que es capaz de inducir alteraciones en el desarrollo y la reproducción. De todos los isómeros, el DDT tiene mayores propiedades estrogénicas mientras que el DDE tiene propiedades antiandrogénicas. Las hormonas influyen en el crecimiento, diferenciación y funcionamiento de distintos tejidos incluyendo los órganos reproductores, por lo tanto, el mimetizar o antagonizar los efectos de hormonas puede afectar potencialmente distintos órganos y sistemas, especialmente si la exposición a estos compuestos se da en la etapa del desarrollo. En consecuencia, niveles bajos de hormonas externas o xenobióticos pueden inducir efectos severos en el desarrollo de órganos reproductivos.

El DDT es un insecticida de amplio espectro que se usó ampliamente debido a su efectividad, su alta persistencia, baja toxicidad hacia mamíferos y bajo costo (Metcalf 1989). Se ha utilizado para el control de malaria, tifus, dengue y otras enfermedades transmitidas por mosquitos así como en la agricultura. A pesar de que se han demostrado los efectos adversos que este compuesto y los secundarios tienen en la vida silvestre, en México, se sigue usando en campañas federales (CICOPLAFEST 1998).

c. Plaguicidas Ciclodiénicos

Si bien al evaluar la relación entre los plaguicidas ciclodiénicos y el porcentaje de malformaciones mediante el análisis de conglomerados no se observa ninguna relación, los resultados obtenidos a partir de la regresión múltiple muestran que este grupo de plaguicidas puede ser un importante inductor de malformaciones. Los efectos biológicos negativos que estos compuestos tienen además se encuentran documentados. Se ha observado que varios de estos compuestos tienen efectos genotóxicos y embriotóxicos en distintos organismos. El aldrín, dieldrín, endrín y endosulfán se han asociado a la inducción de malformaciones en costillas, membranas de las patas y homóplatos de ratones y hamsters (Kavlock *et al.* 1985, Ottolenghi *et al.* 1974). El endrín además es capaz de causar rupturas de cadenas de ADN en ratas (Hassoun *et al.* 1993) así como el heptacloro y su compuesto secundario epóxido de heptacloro, en plantas y hamsters (Sandhu *et al.* 1989, NTP 1987). El dieldrin afecta el desarrollo en larvas de *Bufo arenarum*, induciendo torceduras de cuerpo (Gauna *et al.* 1991) y el endosulfán puede alterar la distribución de células primordiales germinales durante el desarrollo del pez zebra (Willey y Krone 2001).

La utilización de estos compuestos ha sido principalmente en actividades agrícolas y en el combate de plagas domésticas. En México, a excepción del heptacloro, su uso está aún autorizado (CICOPLAFEST 1998).

d. Sinergismo entre plaguicidas organoclorados y metales pesados

La evaluación del sinergismo entre contaminantes mediante el análisis de conglomerados muestra que aunque no todas las poblaciones con mayor porcentaje de malformaciones quedan formando un conglomerado, las poblaciones con proporciones de malformaciones más altas que las naturales quedan separadas de aquellas con porcentajes más bajos que el límite considerado natural. Esta separación se encuentra basada en la concentración de plaguicidas organoclorados y metales pesados. Así, las poblaciones con índices superiores a los considerados naturales tienen en común mayor concentración de dichos compuestos y por ende mayor posibilidad de un sinergismo entre ellos y efectos negativos en los individuos.

Por otra parte, la detección tanto de compuestos primarios como secundarios de distintos plaguicidas, señala que la presencia de los mismos en el medio es constante. Los resultados de este trabajo confirman una estrecha relación entre la concentración de plaguicidas organoclorados así como arsénico, plomo y zinc y la presencia de altos índices de malformaciones en distintas poblaciones. A pesar de que se distinguen relaciones diferentes entre la concentración de plaguicidas organoclorados de distintas familias (alicíclicos, aromáticos y ciclodiénicos) y metales pesados con la proporción de malformaciones en individuos de *P. hypochondriaca*, debe considerarse que en el medio, los organismos se encuentran expuestos al conjunto de dichos compuestos. Así, los efectos que éstos tienen, pueden ser aditivos o darse a través de sinergismos. Al evaluar dicho sinergismo, puede notarse que la combinación de metales pesados y plaguicidas explica significativamente las proporciones de malformaciones. El efecto sinérgico de estos contaminantes se ha probado; tal es el caso del estereoisómero α -HCH sin la presencia del cual, los isómeros β -HCH, γ -HCH y δ HCH no son capaces de inducir cáncer en ratones (Ito *et al.* 1973). También se ha documentado que si el lindano interactúa con el cadmio, causa efectos embriotóxicos y teratogénicos en fetos de ratas a dosis que individualmente ninguno de estos compuestos podría causar (Saxena *et al.* 1986) y que la

interacción con otros compuestos organoclorados como el DDT altera el metabolismo del mismo (Chadwick y Freal 1972b).

Los efectos genotóxicos y embriotóxicos de algunos de estos compuestos, así como alteraciones en sistemas reproductivos se encuentran documentados en anfibios y otros vertebrados (Hassoun y Stohs 1996, Ito *et al.* 1973, Kumar *et al.* 1995, Saxena *et al.* 1986, Schuytema *et al.* 1991, Wessel *et al.* 2007) El detectar procesos de bioacumulación de plaguicidas en tejidos muestra además que los organismos de varias poblaciones han estado expuestos a estos compuestos de manera continua. En cuatro poblaciones se pudo notar que los organismos malformados mostraron mayor acumulación de plaguicidas en comparación a los sanos de los mismos sitios (Tabla 2). En otras palabras, una acumulación diferencial a lo largo del ciclo de vida. Es posible que las diferencias individuales en el funcionamiento del sistema de detoxificación provoque la interferencia diferencial de compuestos genotóxicos durante el desarrollo embrionario, así aquellos organismos con sistemas de detoxificación menos eficientes pueden quedar expuestos a mayores cantidades de compuestos interiormente y por ende desarrollar malformaciones.

B. Micronúcleos

Durante el desarrollo embrionario temprano distintos contaminantes pueden afectar la transcripción nuclear alterando la regulación de la expresión génica y por ende afectando diversas respuestas (Venturino *et al.* 2003) La forma de acción de estos compuestos, sobre todo en el desarrollo de malformaciones, aún está en investigación; sin embargo, uno de los mecanismos propuestos es el estrés oxidativo. Se ha observado que compuestos como metales y plaguicidas, entre otros, son capaces de interactuar con membranas plasmáticas y ADN mediante reacciones de óxido-reducción, alterando así el equilibrio de la relación entre oxidantes y antioxidantes y ocasionando estrés oxidativo. El ADN, al ser polianiónico, promueve la infiltración y adherencia de cationes metálicos que causan la formación de radicales libres. El estrés oxidativo ha sido postulado como uno de los principales fenómenos inductores de genotoxicidad, embriotoxicidad, enfermedades degenerativas y cáncer en distintos organismos (Piña-Guzmán *et al.* 2006, Valavanidis *et al.* 2006). Los compuestos clorados mantienen una estrecha relación con el estrés oxidativo, causante de alteraciones a nivel genético y por ende

posibles inductores de alteraciones en la información del mismo (Calviello *et al.* 2006, Wessel *et al.* 2007).

Entre los bioindicadores utilizados para detectar daños en cromosomas se encuentran los micronúcleos. En un estudio realizado con la especie *Rana esculenta* se comparó la formación de micronúcleos en eritrocitos de organismos de sitios contaminados contra organismos de sitios no contaminados. Los sitios contaminados presentaron cadmio, mercurio, plomo, heptacloro y epóxido de heptacloro. Los organismos presentes en estos sitios mostraron mayor cantidad de células micronucleadas. Este incremento indica que los contaminantes pueden estar induciendo efectos genotóxicos (Barni *et al.* 2007). En la península de Baja California se detectaron cuatro poblaciones de *P. hypochondriaca* en donde los individuos presentaron micronúcleos en sangre. Si bien, no se pudieron obtener datos de este biomarcador en todas las poblaciones, la asociación entre la presencia de ciertos contaminantes (γ -HCH y δ -HCH) y la de micronúcleos, señala que en las poblaciones donde éstos se encuentran presentes, podría haber incidencia de micronúcleos. La capacidad del HCH de alterar el ADN y producir, entre otros efectos, micronúcleos se ha observado en células humanas. Este compuesto indujo aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos humanos *in vitro* y micronúcleos en médula ósea *in vivo* (Rupa *et al.* 1989). En estudios realizados con células humanas de seno y próstata se ha observado que el lindano (γ -HCH) es el mayor inductor de micronúcleos en comparación con los isómeros α -HCH y β -HCH (Kalantzi *et al.* 2004).

La detección de micronúcleos en células somáticas de *Pseudacris hypochondriaca* señala la exposición reciente a compuestos genotóxicos. Estos datos en conjunto con concentraciones positivas tanto de plaguicidas primarios y sus derivados secundarios en sedimentos señalan la presencia continua de compuestos genotóxicos en el medio y por ende la exposición a los mismos durante las distintas etapas de desarrollo, en otras palabras, una exposición crónica a químicos genotóxicos. Estas sustancias pueden interferir con el desarrollo alterando la regulación de la expresión génica, así, es posible que el origen de las malformaciones observadas este en la exposición a estas sustancias durante el desarrollo embrionario y la metamorfosis en el caso de las malformaciones de extremidades en individuos adultos.

El desarrollo de malformaciones en los anfibios de estos sitios es la manifestación macroscópica de alteraciones en el ADN, a nivel genómico o cromosómico, inducido por cambios en el ambiente. Resulta importante considerar además que tanto la detección de

micronúcleos como de malformaciones señala que la exposición crónica a estos compuestos tiene efectos subletales en la salud de los organismos. Estos efectos aumentan la vulnerabilidad de los mismos a otros factores de riesgo, por ejemplo, los cambios en el ambiente representan situaciones de estrés que alteran el sistema inmune y aumentan la susceptibilidad a enfermedades y parásitos (Blaustein y Johnson 2003, Kiesecker 2002).

C. Otros aspectos

1. Origen de los contaminantes

En cuanto al origen de los contaminantes detectados, solamente en la zona de San Ignacio donde se encuentran las poblaciones San Ignacio a, San Ignacio c1 y San Ignacio c2 se pudieron detectar algunos campos de cultivo. A través de mapas satelitales disponibles en el programa Google Earth, fue posible observar áreas agrícolas aproximadamente a 20 y 24 kms río arriba. Estos campos se encuentran al lado del cauce de los arroyos temporales que alimentan el oasis de San Ignacio por lo que los plaguicidas pueden estar llegando a éste por medio de arrastre. A excepción de este caso es probable que los distintos compuestos lleguen a los sitios evaluados por medio de transporte atmosférico. Las zonas aledañas a las otras poblaciones con altos índices de malformaciones no presentan actividad agrícola (Figura 2, observación personal e imágenes satelitales) por lo que se puede decir que al menos en el caso de los plaguicidas, éstos no han llegado a los sitios por medio de arrastre. Dada la distancia entre dichas poblaciones y los sitios de cultivo, así como los patrones ambientales de la península (Anexo 1), es posible que se este dando un transporte atmosférico de los mismos. El transporte atmosférico de plaguicidas organoclorados se encuentra documentado y ha sido asociado a muertes masivas y extinciones locales de anfibios (Daly *et al.* 2007, Gilliland *et al.* 2001, ToxProfiles 2003). Recientemente se ha probado que zonas de alto valor biológico en Costa Rica se encuentran contaminadas con plaguicidas acarreados atmosféricamente desde campos de cultivo (Daly *et al.* 2007) Algunas poblaciones de *P. hypochondriaca* con altas concentraciones de plaguicidas y proporciones de malformaciones (La Bocana y Cataviña) se encuentran dentro del área natural protegida Parque Nacional Valle de los Cirios. También en la zona de la Reserva de la Biosfera Sierra la Laguna se detectaron, aunque en menor concentración, plaguicidas organoclorados. Estos datos señalan

cierta ineficiencia en las estrategias de conservación. En otras palabras, la conservación del hábitat es necesaria más no suficiente para proteger a los anfibios de los factores que les afectan.

2. Estrés ambiental y sistema inmune

Como se mencionó, el estrés ambiental puede tener efectos negativos en el sistema inmune de anfibios. Durante los últimos años se ha documentado un aumento en la manifestación de enfermedades emergentes en distintas poblaciones de anfibios (Daszk *et al.* 2003). Es probable que la proliferación de estas enfermedades se encuentre asociada a factores de estrés ambiental. Algunos autores sugieren que el fenómeno de las enfermedades emergentes puede ser un indicador de inmunodepresión inducida por cambios ambientales (Carey *et al.* 1999). Los biomarcadores, como malformaciones y micronúcleos, son considerados indicadores tempranos de deterioro en ecosistemas causado entre otras cosas por contaminación, ya que su manifestación ocurre antes de que se den daños irreversibles en los mismos (Venturino *et al.* 2003).

3. Introducción de especies exóticas

Entre otros factores de estrés detectados en este estudio se encuentra la introducción de especies exóticas en algunas poblaciones, en específico aquellas de la zona de San Ignacio. En estos sitios, la dinámica depredador-presa se encuentra alterada debido a la introducción y proliferación de individuos de *Rana catesbeiana*. Se sabe que esta especie es un fuerte depredador de anfibios de menor tamaño. Por otro lado, durante el segundo muestreo, se observó que esta especie está desplazando a individuos de *P. hypochondriaca* de las zonas aledañas al oasis.

4. Situación de *P. hypochondriaca*

La situación de las poblaciones de *P. hypochondriaca* en la península de Baja California es crítica, especialmente en las zonas de Cataviña, Bocana y San Ignacio. La relación entre la

presencia de malformaciones y la concentración de contaminantes, así como la detección de efectos genotóxicos muestra un deterioro en la calidad ambiental de la zona. A pesar de que varias de las poblaciones evaluadas se encuentran en áreas naturales protegidas, la detección de estos casos así como los eventos de presión ambiental mencionados, introducción de especies exóticas, desproporción del ratio sexual y posible estrés inmunológico, indica un riesgo de disminución en el tamaño de sus poblaciones. De ser así, los efectos negativos de dicha situación ocasionarían consecuencias no solo a nivel poblacional si no a nivel de ecosistema. *P. hypochondriaca* no se encuentra protegida bajo ninguna categoría de conservación y en gran parte de su distribución en la península de Baja California se encuentra asociada a oasis con aislamiento extensivo. Esta situación la hace más vulnerable a alteraciones en el ambiente. Por estos motivos resulta necesario evaluar las estrategias de conservación tomadas no solo para esta especie, si no para las otras especies de anfibios que se encuentran en los mismos sitios.

Los anfibios juegan un papel doble en los ecosistemas actuando como depredadores de diversos insectos y a su vez como presas de otros vertebrados como reptiles, aves y mamíferos. Debido a esta importante función en los ecosistemas, un declive en sus poblaciones puede causar disminuciones o extinciones en distintas poblaciones animales y por consiguiente en los distintos ecosistemas que habitan (Gilliland *et al.* 2001).

IX. Conclusiones

- La presencia de individuos malformados de la especie *Pseudacris hypochondriaca* en la península de Baja California es un fenómeno persistente.
- En las poblaciones donde se encontraron individuos malformados en altas proporciones también se detectaron altas concentraciones de contaminantes como plaguicidas organoclorados y metales pesados.
- Se documenta una relación significativa entre la concentración de compuestos organoclorados, principalmente de las familias de los alicíclicos y ciclodiénicos, con el porcentaje de malformaciones.
- El sinergismo entre plaguicidas de distintas familias y metales pesados explica la proporción de malformaciones. Los compuestos involucrados en este sinergismo son: α -HCH, aldrín, arsénico, plomo y zinc.
- La detección de formación de micronúcleos en eritrocitos de individuos de cuatro poblaciones así como la existencia de compuestos primarios y derivados de plaguicidas señala una presencia constante en el medio de compuestos genotóxicos.
- La exposición crónica a compuestos genotóxicos señala que los individuos de *P. hypochondriaca* han estado en contacto con estos químicos durante las distintas etapas de su ciclo de vida. Las malformaciones observadas pueden deberse a la interferencia de estos genotóxicos con el desarrollo embrionario.
- Se documenta una desproporción en el radio sexual en distintas poblaciones de *P. hypochondriaca*, hecho que sugiere la existencia de procesos de disrupción endócrina.

Recomendaciones

- Es necesario reconsiderar el estatus de conservación de *P. hypochondriaca* en México. La situación que enfrentan las poblaciones principalmente del centro y norte de la península es crítica.
- Se requieren estudios de laboratorio que evalúen efectos sub-letales del sinergismo de un mayor número de compuestos. La mayoría de los estudios de laboratorio que evalúan el efecto de contaminantes en organismos se basan en uno o dos compuestos a dosis letales medias.

X. Bibliografía

- Abarca-Buis, Rios-Flores y Chimal-Monroy 2005. Control molecular de la apoptosis durante la morfogénesis de la extremidad. *Mensaje Bioquímico*. Vol XXIX:95-107.
- ACAP. 2005. Amphibian Conservation Summit. IUCN/SSC Global Amphibian Specialist Group and Declining Amphibian Populations Task Force
- Albert, A. L. 1990. Los plaguicidas y sus efectos en el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo. México.
- Ankley G.T., Tietge J. E., DeFoe D.L., Hjensen K.M., Holcombe G.W., Durhan E.J. y A. Diamond. 1998. Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environ Toxicol Chem* 17:2530-2542.
- Ankley G.T., Diamond S.A., Tietge J. E., Holcombe G.W., Jensen K.M., Defoe D.L. y Peterson R. 2002. Assessment of the Risk of Solar Ultraviolet Radiation to Amphibians. I. Dose-Dependent Induction of Hindlimb malformations in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) *Environ. Sci. Technol.* 36:2853-2858.
- Armienta M. A. Morton O., Rodríguez R., Cruz O., Aguayo A. y Cenicerros N. 2001. Chromium in a Tannery Wastewater Irrigated Area, León Valley, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:189-195
- Barni S., Boncompagni E., Grosso A. y Bertone V. 2007. *Rana ssk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology* 81: 45-54
- Blaustein A. R. y Johnson P. T. J. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Front. Ecol. Environ.* 1:87-94.

-
- Blaustein, A.R., Kiesecker J.M., Chivers D.P y Anthony R.G. 1997. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Science* 94:13735-13737.
- Blaustein A. R., Romansic J. M, Kiesecker J. M. y Hatch A.C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distribution*. 9:123-140
- Bridges C.M., Dwyer F.J., Hardesty D.K. y Whites D.W. 2002. Comparative contaminant toxicity: are amphibian larvae more sensitive than fish? *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69:562-569.
- Bridges C.M. y Boone M.D. 2003. The interactive effects of UV-B and insecticide exposure on tadpole survival, growth and development. *Biological Conservation*. 113: 49–54
- Bridges, C., Little E., Gardiner D., Petty J. y Huckins J.. 2004. Assessing the toxicity and teratogenicity of pond water in North-Central Minnesota to amphibians. *Environmental Science and Pollution Research* 11:233-239.
- Brown D.D. y Cai L. 2007. Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*. 306:20-33.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, et al., eds. 1989. *The Merck index*. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc., 866-867 en *ToxProfiles*. 2003. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane
- Calviello G., Piccioni E., Boninsegna A., Tedesco B., Maggiano N., Serini S., Wolf F. I. y Palozza P. 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 211:87-96.
- Canadian Council of Ministers of the Environment. 2002. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

-
- Carey C., Cohen N. y Rollins-Smith L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 459-472.
- CICOPLAFEST. 1998. Manual de la Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. México.
- Collins J. P. y Storfer A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*. 9: 89-98.
- Cooke AS. 1970. The effect of p,p'-DDT on tadpoles of the common frog (*Rana temporaria*). *Environ Pollut* 1:57-71.
- Cooke AS. 1972. The effects of DDT, dieldrin and 2,4-D on amphibian spawn and tadpoles. *Environ Pollut* 3:51-68.
- Cooke A. S. 1973. The effects of DDT, when used as a mosquito larvicide, on tadpoles of the frog *Rana temporaria*. *Environ. Pollut*. 5 : 259-273.
- Daly G.L., Lei Y. D., Teixeira C., Muir C.G., Castillo L. E. y Wania F. 2007. Accumulation of Current-Use Pesticides in Neotropical Montane Forests. *Environ. Sci. Technol*. 41:1118-1123.
- Datta S., Hansen L., McConnell L., Baker J., LeNoir J., y Seiber N. 1998. Pesticides and PCB contaminants in fish and tadpoles from the Kaweah river basin, California. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 60:829-836.
- Daszak P., Cunningham A. A. y Hyatt A. D. y Hyatt A.D. 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*. 9:141-150.
- Díaz-González G. y Botello A.V. 1989. Comparación de dos técnicas analíticas para la determinación de plaguicidas organoclorados en organismos. V congreso de Química Analítica. Zac.

-
- Dich J., Hoar S. Z., Hanberg A. y Hans-Olov A. 1997. Pesticides and Cancer. *Cancer Causes and Control*. 8:420-443.
- Donohoe R.M., Yamamoto J. T., Richer K. E. y J. F. Quinn. 2000. Exposure factor and toxicity data for California wildlife: data availability and sources of uncertainty for ecological risk assessments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 64:834-841.
- Edwards C. A. 1973. Pesticide residues in soil and water. En Edwards 1973. *Environmental Pollution by pesticides*. Plenum press. U.S.A.
- Fernández M., L'Haridon J., Gauthier L. y Zoll-Moreux C. 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assesment. *Mutation Research*. 292:83-99.
- Fort D.J., Rogers R.L., Copely H.F., Bruning L.A., Stover E.L., Helgen J.C. y Buckhart J.B. 1999a. Effects of pond water, sediment, and sediment extracts from Minnesota and Vermont, USA, on early development and metamorphosis of *Xenopus*. *Environ Toxicol Chem* 18:2305-2315.
- Fort D.J., Rogers R., Copley H. F., Bruning L.A., Stover E. L., Helgen J.C. y Burkhart J.G. 1999b. Progress toward identifying causes of maldevelopment induced in *Xenopus* by pond water and sediment extracts from minnesota, USA. *Environ Toxicol Chem*. 18: 2316–2324.
- Gardiner D.M. y Hoppe D.M. 1999. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *J Exp Zool* 284: 207-216.
- Gauna, L., Caballero De Castro, M. Chifflet De Llamas M. y Pechen De D'angelo, A.M. 1991. Effects of dieldrin treatment on physiological and biochemical aspects of the toad embryonic development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 46: 633-640.
- Gauthier L., Tardy E., Mouchet F., Marty J. 2004. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus assay) and detoxifying activity (EROD induction) in the River Dadou

-
- (France), using the amphibian *Xenopus laevis*. *Science of the Total Environment*. 323: 47–61
- Gilbert S. F. 2000. *Developmental Biology*, 6th Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. E.U.
- Gilliland C.D., Summer C. L., Gilliland M.G, Kannan K., Villeneuve D.L, Coady K. K., Muzzall P., Mehne C. y Giesy J. P.. 2001. Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and metals in water, sediment, and green frogs from southwestern Michigan. *Chemosphere* 44:327-339.
- Goldberg E.D. 1975. Synthetic organohalides in the sea. *Proc Royal Soc London B* 189:277-289.
- Greulich K. y Pflugmacher S.. 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65:329-336.
- Grismer L. 2002. *Amphibians and Reptiles of Baja California, Including Its Pacific Islands and the islands in the sea of Cortés*. University of California Press. E.U.
- Guderyahn L. 2006. *Nationwide Assessment of Morphological Abnormalities Observed in Amphibians Collected from United States National Wildlife Refuges*. U. S. Fish and Wildlife Service.
- Harris M. L., Chora L., Bishop A. y Bogart P. 2000. Species-and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens* and *Bufo americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:263-270.
- Hassoun E, Bagchi M, Bagchi D. 1993. Comparative studies on lipid peroxidation and DNA-single strand breaks induced by lindane, DDT, chlordane and endrin in rats. *Comp Biochem Physiol* 104C(3):427-431 en *ToxProfiles*. 2003. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for endrin.
- Hassoun EA y Stohs SJ. 1996. Comparative teratological studies on TCDD, endrin, and lindane in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Comp Biochem Physiol* 113C(3):393-398.

Hayes T.B., Case P., Chui S., Chung D., Haefele C., Haston K., Lee M., Mai V. P., Marjuoa Y., Parker J., y Tsui M. 2006. Pesticide mixtures, Endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect.* 114:40-50

Heyer W. R., M. A. Donnelly, R. W. McDiarmid, L. C. Hayek y M. S. Foster. 1994. *Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica.* Smithsonian Institution Press.

Hopkins W. A., Congdon J. y Ray J. K. 2000. Incidence and impact of axial malformations in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*) developing in sites polluted by a coal-burning power plant. *Environ. Tox. Chem.* 19:862-868.

Ito N, Nagasaki H y Arai M. 1973. Histologic and ultrastructural studies on the hepatocarcinogenicity of benzene hexachloride in mice. *J Natl Cancer Inst* 51:817-826.

Johnson P.T.J., Lunde K.B., Ritchie E.G. y Launer A.E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284: 802-804.

Kalantzi O. I., Hewitt R., Ford K.J., Cooper L., Alcock R., Thomas G., Morris J. A. McMillan T., Jones K. C. y Martin F. L. 2004. Low dose induction of micronuclei by lindane. *Carcinogenesis.* 25:613-622.

Kavlock RJ, Chemoff N, Rogers EH. 1985. The effect of acute maternal toxicity on fetal development in the mouse. *Teratogenesis Carcinogen Mutagen* 5:3-13.

Kiesecker J. M., Blaustein A. R. y Miller C. L. 2001. Transfer of a pathogen from fish to amphibians. *Conservation Biology.* 15 (4): 1064-1070.

Kiesecker J. M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99:9900-9904

Kumar D, Khan PK, Sinha SP. 1995. Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides. *Food Chem Toxicol* 33:309-314.

-
- La Clair J.J., Bantle J. A. y Dumont J. 1998. Photoproducts and metabolites of a common insect growth regulator produce developmental deformities in *Xenopus*. *Environ. Sci. Tech.* 32:1453-1461.
- Lajmanovich R.C., Cabagna M, Peltzer P.M., Stringhini G.A., Attademo A.M. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research.* 587:67-72.
- Linder G. y Grillitsch B. 2000. Ecotoxicology of Metals. En Sparling, D.W., G. Linder, and C.A. Bishop (Eds.). *Ecotoxicology fo Amphibians and Reptiles*. Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC) Press, Pensacola, Florida. E.U.
- Mannaert A., Roelants K., Bossuyt F. y Leyns L. 2006. A PCR survey for posterior Hox genes in amphipians. *Molecular Phylogenetics and Evolutions.* 38:449-458.
- Metcalf PJ. 1989. Organolead compounds in the atmosphere. *Analyt. Proc.* 26:134-136.
- Meteyer C. U., Loeffler I.K., Fallon J.F., Converse K.A., Green E., Helgen J.C., Kersten S., Levey R., Eaton-Poole L. y Burkhart J.G. 2000. Hind limb malromations in free-living Northern Leopard Frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62:151-171.
- NTP. 1990. National Toxicology Program: Review of Current DHHS, DOE and EPA research related to toxicology. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Service. NTP-90-153 en ToxProfiles. 2003. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for heptachlor/heptachlor epoxide.
- Nyangababo J. T., Henry L. y Omutange E. 2005. Organochlorine Pesticide Contamination in Surface Water, Sediment, and Air Precipitation of Lake Victoria Basin, East Africa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75:960-967.
- Osborn D, Cooke A.S. y Freestone S. 1981. Histology of a teratogenic effect of DDT on *Rana temporaria* tadpoles. *Environ. Pollut.* 25:305-319

-
- Ottolenghi AD, Haseman JK, Suggs F. 1974. Teratogenic effects of aldrin, dieldrin, and endrin in hamsters and mice. *Teratology* 9:11-16.
- Ouellet, M. 2000. Amphibian deformities: current state of knowledge. En Sparling, D.W., G. Linder, and C.A. Bishop (Eds.). *Ecotoxicology fo Amphibians and Reptiles*. Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC) Press, Pensacola, Florida. E.U.
- Ouellet M., Bonin J., Rodrigue J., DesGranges J-L., y Lair S. 1997. Hind-limb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J. Wildl Dis* 33:95-104.
- Pasmans F., P. Zwart, A. D. Hyatt. 2004. Chytridiomycosis in the Central American bolitoglossine salamander (*Bolitoglossa dofleini*). *The Veterinary Record*. enero: 153
- Philip R. B. 2001. *Ecosystems and human health. Toxicology and environmental hazards*. Lewis publishers. Second Ed. E.U. 328 pp
- Piña-Guzmán B., Solís-Heredia M.J., Rojas-García A.E., Uiróstegui-Acosta M. y Quintanilla-Vega B. 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 216:216-224.
- Quin G.P. y Keough M.J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press. Reino Unido.
- Recuero E., Martínez-Solano I., Parra-Olea G., García-París M. 2006. Phylogeography of *Pseudacris regilla* (Anura:Hylidae) in western North America, with a proposal for a new taxonomic rearrangement. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:293-304.
- Relyea R.A. 2004. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23: 1737–1742.
- Rowe C. L., O. M. Kinney, A. P. Fiori. Y J. D. Congdon. 1996. Oral deformities in tadpoles (*Rana catesbeiana*) associated with coal ash deposition: effects on grazing ability and growth. *Frehwater Biology*. 36:723-730.

Rupa D.S., Reddy P.P. y Oddi O. S. 1989d. Genotoxic effect of BHC in cultured human lymphocytes. *Hum Genet* 83:271-273.

Sandhu SS, Ma TI-I, Peng Y, et al. 1989. Clastogenicity evaluation of seven chemicals commonly found at hazardous industrial waste sites. *Mutat Res* 224:437-445.

Saxena D.K., Murthy R.C. y Chandra S.V. 1986. Embryotoxic and teratogenic effects of interaction of cadmium and lindane in rats. *Acta Pharmacol Toxicol* 59:175-178.

Sessions S.K. y Ruth S.B. 1990. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. *J Exp Zool* 254:38-47.

Sessions S.K., Franssen R.A. y Horner V.L. 1999. Morphological clues from multilegged frogs: are retinoids to blame? *Science* 284:800-802.

SchuytemA, G. S., Nebeker, A. V., Griffis, W. L. y Wilson, K. N. 1991. Teratogenesis, toxicity, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 232-350.

Schuytema G. S. y Nebeker A. V. 1999. Comparative Effects of Ammonium and Nitrate Compounds on Pacific Treefrog and African Clawed Frog Embryos *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 200–206.

Sienra E., Armienta M.A. y Gonsebatt M.E. 2003. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Environmental pollution*. 126:367-370.

Song Y. F., Wilke B.M., Song X.Y., Gong P., Zhou Q.X. y Yang G. F. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. *Chemosphere*. 65:1859-1868.

-
- Sower S. A., Reed K. L. y Babbitt J. 2000. Limb malformations and abnormal sex hormone concentrations in frogs. *Environ. Health. Persp.* 108:1085-1090.
- Sparling D. W., Fellers G. M. y McConnell L. L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, U.S.A. *Environ.Toxicol. Chem.* 20: 1591-1595
- Stuart S. N., Chanson J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues A. S. L., Fischman D. L., y Waller R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science.* 306: 1783-1786.
- ToxProfiles. 2003. Agency for toxic substances and disease registry. 4,4'-DDT, DDE,DDD (Update) (PB2003-100137).
- UNEP/FAO/IAEA. 1986.Determination of DDT's and PCB's in selected marine organisms by packed column gas chromatography. Reference methods for marine pollution studies. No. 14 Rev.1.
- UNEP/IAEA. 1982. Determination of DDT's, PCB's and other hydrocarbons in marine sediments by gas liquid chromatography. Reference methods for marine pollution studies. No. 17
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. Y Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 64: 178-189.
- Vallisneri, A. 1973. *Opere fisico-mediche.*, Venice. 1733. en Ouellet, M. 2000. Amphibian deformities: current state of knowledge. En Sparling, D.W., G. Linder, and C.A. Bishop (Eds.). *Ecotoxicology fo Amphibians and Reptiles.* Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC) Press, Pensacola, Florida. E.U.
- Vandenlangenberg S.M., Canfield J. T. y Magner J. A. 2003. A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs). *Environmental Monitoring and Assessment.* 82:45-61.

Venturino A., Rosenbaum E., Caballero de Castro A., Anguiano O., Gauna L., Fonovich de Schroeder T. y Pechen de D'angelo A. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*. 8: 167-186.

Wessel. N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F. y Akcha F. 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*. 85:133-142.

Wirz M. V. M. A., Saldiva P. H., Freire-Maia V. 2005. Micronucleus Test for monitoring Genotoxicity of Polluted River Water in *Rana catesbeiana* Tadpoles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75:1220–1227

Anexo 1. Patrones climáticos de la península de Baja California

Con el fin de aportar bases sobre el posible transporte atmosférico de contaminantes, a continuación se presenta una traducción literal del apartado de Clima del capítulo I del libro *Amphibians and Reptiles of Baja California* (Grismer 2002).

La mayoría de la península de Baja California, a excepción de la parte noroeste y sureste, es parte del desierto de Sonora. El clima se caracteriza por presentar altas temperaturas medias con baja precipitación. La península se encuentra bajo la influencia de cuatro fuentes de humedad: el margen sur del sistema de ciclones del oeste que afecta el clima de la parte norte de la península, el margen oeste de los vendavales de verano originados en el Golfo de México y que afecta el clima de la parte este de la península, el margen este de tormentas tropicales y huracanes que abarcan la parte norte del pacífico en otoño y que afectan el clima de la parte sur de la península y el límite oeste de la actividad de otoño de la parte este. Sin embargo, Baja California se encuentra dominada bajo dos principales regimenes climáticos: tormentas ciclónicas de invierno del norte y huracanes del sur. La parte norte de la península recibe la mayoría de la precipitación de tormentas invernales que por lo regular se originan en el oeste del Pacífico y que se extienden sobre la península hacia el sureste. Estas tormentas se debilitan conforme avanzan hacia el sur y por lo regular no rebasan la zona de la laguna de San Ignacio. Ocasionalmente altas presiones en la parte oeste de Estados Unidos “empujan” tormentas hacia el sur en al parte central de Baja California y la región del cabo que se conocen como equipatas y que usualmente se acompañan por bajas temperaturas. La elevación gradual de la Sierra de Juárez y San Pedro Mártir provoca fuertes precipitaciones en forma de lluvia o nieve pero bloquea el paso de la humedad hacia la zona este por lo que esta parte representa la más seca de la península. Temperaturas bajo cero son raras sin embargo, se presentan nevadas en la Sierra San Pedro Mártir y ocasionalmente se han registrado en el cerro Matomí, Cerro San Borja y el Volcán las Tres Vírgenes. Las tormentas de invierno del norte generalmente llegan hasta la parte noreste de la Bahía de los Ángeles y la parte sur de la Laguna San Ignacio en el suroeste. Al sur y en la parte de la costa del golfo las precipitaciones se originan de dos tipos de tormentas de verano. Las más comunes son sistemas de convección. Conforme las regiones del desierto del Norte América se calientan en verano la elevación del aire crea una célula de baja presión que arrastra aire tibio y húmedo de las áreas del Pacífico. Conforme esta masa de aire gana velocidad

y avanza a través del Golfo de California, recoge humedad adicional. Cuando llega a tierra golpea con la cara este de los rangos peninsulares forzando su elevación conforme cruza las montañas. Al elevarse, se enfría y libera su humedad en forma de fuertes lluvias. La Sierra de San Pedro Mártir, Sierra la Asamblea, Sierra San Borja, Sierra la Libertad, Sierra Guadalupe, Sierra la Giganta y Sierra la Laguna reciben este tipo de lluvias. Usualmente, estas tormentas pueden extenderse a las tierras bajas. La región también se ve afectada por huracanes. Estos sistemas se desarrollan sobre las aguas cálidas en la costa oeste de la parte sur y centro de México y pueden golpear a la península en la parte de la costa sur o este.

La influencia más fuerte en temperatura en Baja California se da por la disimilitud de los cuerpos de agua que la rodean. El océano Pacífico, con la corriente de California fría domina el régimen de temperatura de la parte oeste de Baja California ocasionando niebla y nubosidad además de brisa. Esto mantiene las temperaturas de la costa relativamente bajas. Por consiguiente, la costa oeste desde aproximadamente el Rosario hasta Todos Santos es la costa fresca. De hecho en la zona norte de esta área se localiza uno de los tres desiertos de niebla del mundo. La niebla es el resultado del enfriamiento de cuerpos de aire conforme descienden y hacen contacto con la superficie de la corriente fría de California. La temperatura de las porciones sur y este de Baja California se encuentran controladas principalmente por el mar de Cortés, un cuerpo de agua más caliente que el Océano Pacífico. El mar de Cortés provee poca precipitación o enfriamiento a las costas de esta zona por lo que en verano llegan a ser muy calientes.

Anexo 2. Protocolo UNEP/IAEA (1982) para la extracción y purificación de plaguicidas organoclorados en sedimentos.

Extracción.

1. Pesar 3 gramos de sedimento liofilizado. Colocar en papel filtro, previamente lavado con acetona y hexano, durante ocho horas.
2. Extraer en equipo Soxhlet en un matr az de bal on de 500 ml con 250 ml de hexano por ocho horas.
3. Concentrar el extracto en rotoevaporador hasta aproximadamente 10 ml. La temperatura del baño no debe exceder los 30  C y la presión de la bomba de vacío debe estar en 40 psi. Con una corriente de nitrógeno ultrapuro reducir aproximadamente hasta 1 ml. Registrar el volumen total.

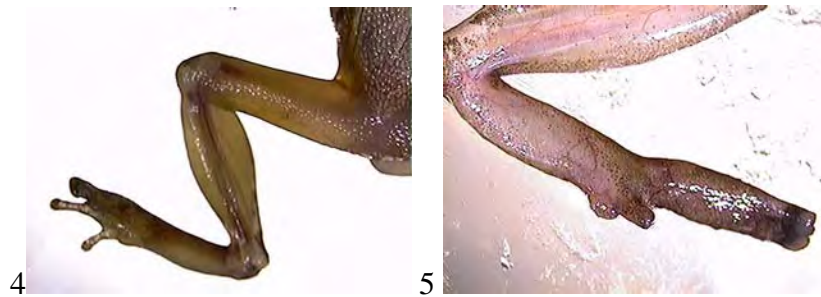
Separación

1. Empacar las columnas de vidrio con fibra de vidrio y florisil parcialmente desactivado en una mezcla de hexano y 0.5 cm. de sulfato de sodio anhidro.
2. Lavar con hexano y aplicar el extracto en el tope de la columna.
3. Eluir lentamente con 60 ml de hexano para obtener la fracción 1 que contendrá los PCB's. Posteriormente eluir con 50 ml. de hexano:eter etílico (9:1), seguido de 20 ml. de hexano:eter etílico (8:2) para obtener la fracción 2 que contendrá los plaguicidas clorados.
4. Concentrar ambas fracciones por rotoevaporación a volúmenes de entre 3 y 5 ml.
5. Transvasar a tubos de centrífuga graduados con tapa y registrar el volumen
6. Detectar los compuestos organoclorados por cromatografía de gases a partir de la inyección de 1 él. de muestra.

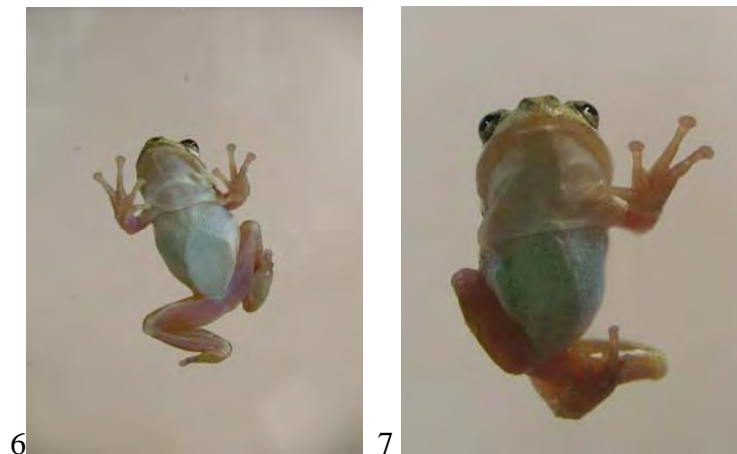
Anexo 3 Malformaciones detectadas y micronúcleos



Casos de ectrodactilia, braquidactilia (1,2) y sindactilia (3)



Casos de ectrodactilia y braquidactilia con sindactilia (4) e hiperextensión de extremidades (5)



Caso de malformación simétrica (6) y ectromelia en miembro anterior y posterior (7)



Formación de micronúcleos en eritrocitos de *P. hypochondriaca*

Anexo 4. Concentración de plaguicidas organoclorados en las poblaciones visitadas

Cuadro 1. Concentración de plaguicidas organoclorados en sedimentos superficiales de los sitios visitados en febrero de 2005. Valores en ng g⁻¹. N.D. < 0.01 ng g⁻¹; * ERL-ERM= daños probables al bentos, >ERM= daños frecuentes al bentos. Daños= alteraciones metabólicas, tasa reproductiva, sobrevivencia. ISQG - Guías interinas de calidad de sedimentos de agua dulce (Ministerio ambiental de Canadá), PEL – niveles de probables efectos a vida acuática (Ministerio ambiental de Canadá). RBC- Concentración basada en riesgo, suelos residenciales. EPA. C- cancerígeno N-no cancerígeno

	Cataviña 2	San Ignacio 1	San Ignacio 2	San Ignacio 3	San Javier	Arroyo La Zorra	La Laguna	ERL *	ERM *	ISQG	PEL	RBC
Familia								(Long <i>et al.</i> , 1995; Buchman, 1999)				
Compuesto												
Alifáticos												
Alfa-HCH	0.87	0.615	0.87	0.7	0.26	0.31	0.66	*	*			0.0001 C
Beta-HCH	6.5	3.415	0.81	12.04	42.93	2.44	N.D.	*	*			0.00035 C
Gamma-HCH	0.44	0.61	0.51	1.31	3.13	0.5	0.18	*	*	0.94	1.38	0.00049 C
Delta-HCH	1.135	2.485	1.37	1.52	1.18	1.29	1.93	*	*			
Aromáticos												
p, p'-DDT	N.D.	N.D.	N.D.	1.50	N.D.	N.D.	N.D.	1.00	7.00	1.19	4.77	0.0019 C
p, p'-DDD	N.D.	N.D.	78.92	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.00	20.0	3.54	8.51	0.0027 C
p, p'-DDE	N.D.	N.D.	0.84	10.82	N.D.	N.D.	N.D.	2.20	27.0	1.42	6.75	0.0019 C
Heptacloro	0.54	N.D.	N.D.	0.16	2.11	0.30	N.D.	*	*			0.00014 C
Epóxido de h	34.39	3.81	0.00	97.11	5.77	N.D.	N.D.	*	*	0.60	2.74	
Aldrín	0.41	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.26	N.D.	*	*			0.000038 C
Dieldrín	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	8.00	2.85	6.67	0.000045C
Endrín	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	*	2.67	62.4	0.023N
Endrín aldehido	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	*			
Ciclodiénicos												
Endosulfán I	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	*			0.47 N
Endosulfán II	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	*			
Sulfato de endosulfán	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	*	*			
Concentración total	44.29	10.94	86.88	140.73	102.88	9.64	5.54					

Cuadro 2. Concentración de plaguicidas organoclorados en sedimentos superficiales de los sitios visitados en septiembre de 2005. Valores en ng g⁻¹. N.D. < 0.01 ng g⁻¹; * ERL-ERM= daños probables al bentos, >ERM= daños frecuentes al bentos. Daños= alteraciones metabólicas, tasa reproductiva, sobrevivencia. ISQG - Guías interinas de calidad de sedimentos de agua dulce (Ministerio ambiental de Canadá), PEL – niveles de probables efectos a vida acuática (Ministerio ambiental de Canadá). RBC- Concentración basada en riesgo, suelos residenciales. EPA. C-cancerígeno N-no cancerígeno

	El chorrito	Cataviña 1	Cataviña 2	San Ignacio carr 1	San Ignacio carr 2	San Ignacio 1	Bocana 2	Bocana 1	San Ignacito	ERL *	ERM *	ISQG	PEL	RBC	
Familia											(Long et al., 1995; Buchman,1999)				
Compuesto															
Alifáticos	Alfa-HCH	2.09	0.41	5.66	5.59	5.16	1.62	0.35	0.39	1.12	*	*			0.0001 C
	Beta-HCH	30.96	3.28	19.08	30.86	19.17	6.68	6.50	0.11	38.69	*	*			0.00035 C
	Gamma-HCH	0.74	0.27	2.43	2.52	1.14	0.48	N.D.	2.67	1.69	*	*	0.94	1.38	0.00049 C
	Delta-HCH	N.D.	N.D.	10.25	1.62	3.78	N.D.	0.19	N.D.	3.77	*	*			
Aromáticos	p, p'-DDT	N.D.	1.15	3.30	225.25	16.41	5.48	50.06	11.73	0.84	1.00	7.00	1.19	4.77	0.0019 C
	p, p'-DDD	N.D.	N.D.	N.D.	10.37	N.D.	13.92	23.16	2.14	N.D.	2.00	20.0	3.54	8.51	0.0027 C
	p, p'-DDE	N.D.	N.D.	0.25	7.88	N.D.	N.D.	12.52	N.D.	N.D.	2.20	27.0	1.42	6.75	0.0019 C
	Heptacloro Epóxido de heptacloro	N.D.	N.D.	2.19	13.13	N.D.	N.D.	5.96	N.D.	1.22	*	*			0.00014 C
		N.D.	N.D.	90.45	0.42	N.D.	0.15	0.60	N.D.	0.40	*	*	0.60	2.74	
	Aldrín	3.31	N.D.	3.89	3.61	5.35	1.97	2.76	N.D.	N.D.	*	*			0.000038 C
	Dieldrín	N.D.	N.D.	N.D.	10.47	N.D.	0.92	21.25	N.D.	N.D.	0.02	8.00	2.85	6.67	0.000045C
	Endrín	N.D.	N.D.	45.60	80.40	8.81	2.88	147.12	2.15	N.D.	*	*	2.67	62.4	0.023N
	Endrín aldehido	N.D.	N.D.	1.56	22.59	8.18	4.12	51.15	9.84	0.93	*	*			
Ciclodiénicos	Endosulfán I	N.D.	N.D.	N.D.	2.12	N.D.	0.51	53.72	0.57	2.05	*	*			0.47 N
	Endosulfán II Sulfato de endosulfán	N.D.	N.D.	N.D.	98.04	12.63	13.04	137.61	2.84	1.26	*	*			
		N.D.	N.D.	21.88	115.84	25.82	5.20	225.75	10.81	N.D.	*	*			
	Concentración total	37.11	5.11	206.54	583.58	106.45	56.97	738.66	43.25	51.97					