



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**EFFECTO DEL AGENTE DISPERSANTE NOKOMIS 3-F4 SOBRE LA ENZIMA
GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) DE *Mytilus californianus***

T E S I S
que para obtener el título de:

OCEANÓLOGO

presenta:

ISAJAV RIVAS REYES

ENSENADA, B. C. MAYO DE 2011

**EFFECTO DEL AGENTE DISPERSANTE NOKOMIS 3-F4 SOBRE LA ENZIMA
GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) DE *Mytilus*
*californianus***

T E S I S

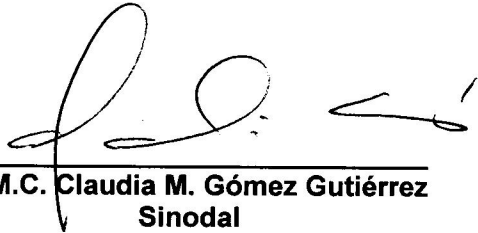
Que presenta:

ISAJAV RIVAS REYES

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas
Director



M.C. Claudia M. Gómez Gutiérrez
Sinodal



Oc. Norma A. Hernández Ramírez
Sinodal

Este escrito está enteramente dedicado a mi motor en este
paso por el universo . . . **mis padres.**

Seamos realistas, soñemos lo imposible...

Ernesto Guevara de la Serna

Agradecimientos:

A ti mamá por aceptar cada una de mis locuras y apoyarme hasta el último instante.

A ti papá por los buenos consejos, momentos gratos y por ser tan tolerante.

A mis hermanos Aris, Amaranta y Luis, que aunque estoy lejos siempre me hacen sentir parte de sus vidas, gracias por toda la alegría y el amor que siempre me transmiten.

A mi familia a todos y cada uno de los integrantes, gracias por recibirme siempre y hacerme sentir como si el tiempo no hubiera transcurrido, los amo.

A mi directora de tesis Graciela Guerra gracias por todas y cada una de las desveladas, las explicaciones, las jaladas de oreja, las salidas de campo, los congresos, en fin gracias por hacerme crecer y confiar en mí.

A Erika por darme fuerzas cada día para seguir con lo que viene, por estar en los momentos difíciles, aguantar mis lloradas, frustraciones, cambios de humor, enojos, berrinches y demás.

A Alex por estar ahí siempre y brindarme tu apoyo ante cualquier adversidad y claro! como olvidarlo, ¡ por cuidar a mis gorditos!

A Claudia por enseñarme el camino de la perdición (la ciencia), gracias por todo lo enseñado en el laboratorio y por los buenos momentos de rock band.

A las chicas del laboratorio Alethia y Cynthia por las compañías en las noches de karaoke del laboratorio y por recordarme que la ciencia es divertida.

A Maribel, Dania, Sari, Sara, Zomal y David por que aunque igual no los veo todos los días como quisiera, siempre me han escuchado, motivado y dado su cariño como solo cada uno de ustedes sabe.

A Rosa por la realización del mapa, así como el apoyo en cualquier situación que se presente.

Al almacén de Ciencias Marinas mil gracias Mily, Manuel, Arturo, Epi, por facilitarme siempre todo para llevar a cabo esta tesis.

A la Armada de México por brindarnos el ingrediente clave para esta investigación.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. ANTECEDENTES.....	11
III. OBJETIVO.....	19
III.1. Objetivo general.....	19
III.2. Objetivos particulares.....	19
IV. METODOLOGÍA.....	20
IV.1. Área de colecta	20
IV.2. Colecta y acondicionamiento de mejillones.....	22
IV.3. Pruebas de solubilidad del tóxico.....	23
IV.4. <i>Obtención del espectro de absorción.....</i>	<i>23</i>
IV.5. Estudio de toxicidad aguda.....	24
IV.5.1. <i>Ensayo preliminar.....</i>	<i>24</i>
IV.5.2. <i>Ensayo definitivo para la determinación de</i>	<i>25</i>
<i>CL₅₀.....</i>	
IV.6. Estudio de toxicidad crónica.....	26
IV.7. Evaluación de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	29
IV.7.1. <i>Obtención de fracciones celulares.....</i>	<i>29</i>
IV.7.2. <i>Ensayo enzimático.....</i>	<i>29</i>
IV.7.3. <i>Determinación de proteínas.....</i>	<i>30</i>

IV.7.4. Cálculos para la obtención de la actividad enzimática.....	30
IV.8. Análisis estadístico.....	31
IV.8.1.Obtención de CL_{50}	32
V. RESULTADOS.....	33
V.1. Pruebas de solubilidad.....	33
V.1.1. Obtención del espectro de absorción.....	33
V.2. Estudio de toxicidad aguda.....	34
V.2.1.Ensayo preliminar.....	34
V.2.2. Ensayo definitivo para la determinación de CL_{50}	36
V.3. Estudio de toxicidad crónica.....	40
VI. DISCUSIÓN.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	53
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del nonil fenol etoxilato de polietileno	4
2	Vía de pentosas. Se muestra la etapa oxidativa y la etapa no oxidativa. Del lado derecho se indica el uso metabólico que se da a los productos de esta ruta metabólica.	10
3	Localización geográfica del área de colecta, Eréndira Baja California, México.	21
4	Anatomía de <i>M. californianus</i> . Se muestran los tejidos utilizados en cada experimento.	23
5	Distribución de organismos en ensayo preliminar. Los siete frascos que contienen las diversas concentraciones se encuentran distribuidos aleatoriamente.	27
6	Distribución de organismos en ensayo de toxicidad aguda. Se muestra sólo una parte de los recipientes del ensayo. Los frascos con las siete concentraciones utilizadas se acomodaron de forma aleatoria.	27
7	Distribución de organismos en ensayo de toxicidad crónica. Se muestra en la parte superior los organismos control,	28

en la parte inferior del lado izquierdo los organismos expuestos a la CL₂ de Nokomis 3-F4 y en la parte inferior del lado derecho se muestran los organismos sometidos a la CL₁₀ del dispersante.

- 8 Disección y extracción de tejidos de *M. californianus*, después de encontrarse expuesto a la mezcla de agua de mar con dispersante Nokomis 3-F4. Se extrajeron gónadas, manto, hepatopáncreas y branquias.

28
- 9 Espectros de absorción para Nokomis 3-F4 disuelto en agua de mar, etanol y agua destilada. Se observan dos máximos de absorbancia, para los tres disolventes.

34
- 10 Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para las gónadas, manto y hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuesto a Nokomis 3-F4 durante 96 horas.

36
- 11 Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la gónada de *Mytilus californianus* expuesto durante 120 h al agente dispersante Nokomis 3-F4 en una prueba de toxicidad aguda.

37
- 12 Curva de concentración-respuesta para el agente dispersante Nokomis 3-F4 sobre *Mytilus californianus* durante la prueba de toxicidad aguda. Se muestra el porcentaje de organismos muertos a lo largo del

39

experimento con una duración de 120 horas.

- 13 Actividad de la G6PDH en hepatopáncreas, manto, 41
gónadas y branquias de *Mytilus californianus* expuesto
durante 90 días al agente dispersante Nokomis 3-F4.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Solubilidad del agente dispersante Nokomis 3-F4 en cada uno de los cuatro disolventes utilizados: agua de mar, agua destilada, etanol y acetona.	33
II	Mortandad de <i>Mytilus californianus</i> en el ensayo de exposición a Nokomis 3-F4 para la obtención del valor de CL ₅₀ . La exposición fue de 120 horas y se realizó el conteo de muertos cada 24 horas. En las primeras cinco columnas se registra el número de organismos muertos durante el período de exposición señalado.	38

RESUMEN

Se evaluaron los efectos letales y subletales que causa el dispersante comercial Nokomis 3-F4 en la especie *Mytilus californianus*, para lo cual se llevaron a cabo pruebas toxicológicas. Se realizó una prueba de toxicidad aguda y una prueba de toxicidad crónica; para ello se colectaron organismos de 8 ± 0.5 cm de longitud, en el Ejido Eréndira B.C., utilizándolos para las diversas pruebas. La prueba de toxicidad aguda se dividió en preliminar y ensayo definitivo. En el ensayo preliminar se sometió al organismo a un gradiente de concentraciones, lo que estableció el intervalo de concentraciones adecuadas (50 a 400 ppm) para el ensayo definitivo, el cual tenía como objetivo determinar el valor de $CL_{50-120h}$. En este ensayo se expuso al organismo durante 120 horas a Nokomis 3-F4, obteniendo un valor de 70.96 ppm para CL_{50} . Dicho valor fue mayor al encontrado por otros autores al exponer a diversas especies marinas a este dispersante; mostrando así Nokomis 3-F4 ser menos letal sobre *M. californianus* que sobre otras especies marinas. Para la prueba de toxicidad crónica se expuso al organismo a 1.29 y 12.9 ppm (CL_2 y CL_{10}) del dispersante. En ambas pruebas toxicológicas se contó con un grupo de organismos control. En las dos pruebas fueron estudiados los efectos subletales que Nokomis 3-F4 provocó a *M. californianus* a través del estudio del biomarcador glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima de la vía de pentosas. La actividad enzimática fue evaluada en varios tejidos, por medio de la obtención del número de nanomoles de NADPH producidos por minuto por mg de proteína. Al realizar la prueba de toxicidad aguda, se observó una disminución significativa en la actividad enzimática a la concentración de 150 ppm del dispersante comparada con el control. Esta disminución puede atribuirse a que el organismo, al encontrarse en estrés provocado por el dispersante, da prioridad a rutas que son importantes en proveer energía al organismo para su supervivencia, disminuyendo la producción en la vía de pentosas. Por otro lado, se observó una recuperación de la actividad enzimática de los organismos expuestos a 400 ppm del dispersante, así como al encontrarse en una exposición constante de 12.9 ppm del dispersante en la prueba de toxicidad crónica. Este aumento sugiere que el organismo, después de verse afectado por el dispersante, tiende a recuperarse. A través de la activación de la vía de pentosas, la cual provee de metabolitos utilizados en procesos que actúan contra el estrés oxidativo, causante de la muerte celular. De igual forma, los productos de la vía de pentosas pueden estar siendo utilizados en procesos de biotransformación de agentes xenobióticos, como el dispersante Nokomis 3-F4.

Palabras claves: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, *Mytilus californianus*, biomarcador.

I. INTRODUCCIÓN

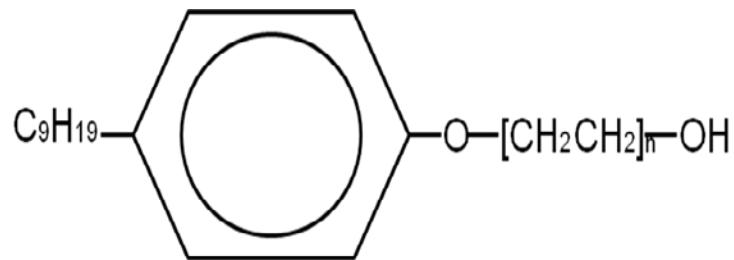
La principal fuente de energía de la sociedad moderna proviene de la combustión del carbón, el gas natural y de los hidrocarburos. Estos últimos son extraídos tanto de las plataformas continentales como de las profundidades de los océanos.

Al realizar tanto la extracción de hidrocarburos en los océanos como el transporte hacia diversas zonas, pueden presentarse accidentes, provocando un desequilibrio ecológico que podría repercutir en el ecosistema marino, así como en la economía del país, al provocar la mortandad de especies que sustentan la pesca de las zonas costeras.

Se sabe que cada año ingresan al ambiente marino aproximadamente 2.5 millones de toneladas de crudo y productos del refinado del petróleo (Scarlett *et al.*, 2008). Para mitigar el daño de los derrames de hidrocarburos en los ecosistemas acuáticos, el ser humano ha ideado diversos métodos. Uno de ellos es la aplicación de sustancias conocidas como agentes dispersantes. Estos son sustancias químicas cuya función es acelerar el proceso natural de dispersión del hidrocarburo, evitando la reintegración del combustible al agua de mar. Una vez dispersa, la mancha presenta menos riesgo para mamíferos y aves marinas; sin embargo, al encontrarse dispersa, tanto la mancha como los residuos de dispersante no unidos al hidrocarburo podrían presentar riesgo para las especies que habitan la columna de agua e incluso para las especies bentónicas.

Las primeras formulaciones de dispersantes utilizados antes de 1970 eran esencialmente solventes basados en agentes desengrasantes adaptados para otros usos. Estos dispersantes demostraron ser altamente dañinos para los organismos acuáticos, como fue el caso de su aplicación en el accidente del barco *Torrey Canyon*, que provocó una impresión desfavorable del uso de éstos. En estudios realizados recientemente, se ha encontrado que los agentes dispersantes utilizados en la actualidad presentan menos toxicidad que las primeras formulaciones de dispersantes (NAP, 2005).

El producto comercial Nokomis 3-F4 es una mezcla de sustancias compuesta por solventes así como por agentes tensoactivos, siendo el agente tensoactivo no iónico, nonil fenol etoxilato de polietileno (Fig. 1) uno de los que lo conforman; este compuesto forma parte del grupo de los alquil fenoles, los cuales son sustancias tóxicas para la vida marina. Los alquil fenoles pueden ser degradados en compuestos más simples que poseen propiedades lipofílicas, lo que provoca que tiendan a acumularse en el sedimento y bioacumularse en especies acuáticas. Se conoce que los alquil fenoles presentan actividad estrogénica; es decir, actúan mimetizando las funciones fisiológicas de algunas hormonas pudiendo así provocar alteraciones en el desarrollo gonadal de algunos organismos (OSPAR, 2004).



$$n=1-40$$

Fig. 1.- Estructura química del nonil fenol etoxilato de polietileno.

El phylum Mollusca comprende ocho clases, las cuales son: Caudofoveados (chaetoderma), Solenogastros (neomenia), Monoplacóforos (extintos solo fósiles, neopilina), Poliplacóforos (quitón), Gasterópodos (caracoles y babosas), Escafópodos (conchas colmillo), Cefalópodos (pulpo y calamar) y Bivalvos (almeja, mejillón). Este último phylum es extremadamente diverso tanto en su fisiología y estructura como en su distribución. Su distribución va desde los ambientes terrestres, de agua dulce hasta los marinos. Se conocen más de 100,000 especies de este phylum (Abbott y Dance, 1982), las cuales se encuentran principalmente distribuidas en zonas marinas, tanto bentónicas como pelágicas.

En los océanos, la zona intermareal es la que recibe la gran mayoría de los contaminantes vertidos; sin embargo, también presenta la mayor cantidad

de plancton, haciéndola ideal como habitat de diversas especies de moluscos bivalvos entre los que se encuentra *Mytilus californianus*, que habita la zona intermareal rocosa; lugar próximo a la costa, con salinidades de entre 23-35 ‰ y temperaturas de 11 a 21°C, valores entre los que se encuentran los óptimos de casi todos los moluscos (García *et al.*, 2007). El mejillón *Mytilus californianus*, descrito por Conrad en 1837 (phylum Mollusca, clase Bivalvia, subclase Pteriomorfa, orden Mytiloida y familia Mytilidae), se distribuye desde Alaska hasta el sur de Baja California, México y generalmente se encuentra agrupado en comunidades muy grandes.

Entre algunos de los atributos de *M. californianus* que lo hacen ideal para utilizarlo como organismo de estudio, se encuentra su situación taxonómica, la cual no está en controversia, lo que la hace una especie fácil de identificar en las costas. De igual forma, este organismo ha sido reconocido como una especie importante en acuicultura, ya que es utilizado como alimento por su fácil reproducción y cultivo (Yamada, 1989). Por otra parte, *M. californianus* es un organismo sésil y capaz de filtrar una gran cantidad de agua, por lo que al realizar filtración puede acumular una gran variedad de agentes xenobióticos. También, en estudios se ha encontrado que presenta la capacidad de aislarse por varias horas con el cierre hermético de sus valvas, cuando las condiciones ambientales se vuelven adversas, tanto por el estímulo por parte de factores naturales como antropogénicos (Loosanoff, 1962; Baqueiro *et al.*, 2007).

Los agentes xenobióticos son compuestos químicos o sustancias ajenas a los organismos y su medio, las cuales pueden causar efectos en los seres vivos y su ecosistema (Rand y Petrocelli, 1985). Es fundamental conocer el potencial dañino de estos agentes, para poder evaluar el peligro que representan en los organismos que habitan el medio marino. Para ello se evalúa el efecto tóxico que es producido por este tipo de sustancias sobre un organismo, población o comunidad, manifestándose como cambios biológicos adversos. El grado de toxicidad se evalúa por una escala de severidad y magnitud, la que se encuentra relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada por unidad de peso corporal) o la concentración (cantidad de sustancia aplicada en el medio) del agente xenobiótico.

Para conocer el potencial tóxico de cualquier sustancia, se utilizan algunos parámetros que miden los efectos letales en los organismos, conocidos, como DL_{50} y CL_{50} los cuales se refieren a la dosis y concentración respectivamente, a la cual se presenta la mortalidad del 50% de los organismos expuestos a un contaminante en pruebas de toxicidad.

Para una evaluación de los efectos subletales causados por los agentes externos sobre los organismos, se utilizan los biomarcadores, siendo éstos, cambios de los organismos al encontrarse expuestos a dichas sustancias. En respuesta a dichas sustancias pueden manifestarse cambios a diversos niveles ya sea fisiológico, celular o molecular (Livingstone *et al.*, 2000). En los organismos, los cambios moleculares y celulares son los más sensibles y los

primeros en manifestarse; por ello, han sido validados como biomarcadores en el monitoreo de la contaminación para evaluar el estado que presentan los organismos de un área en donde se desea conocer las condiciones ambientales (Peakall, 1992; Hahn, 1994). El uso de biomarcadores permite identificar la interacción entre el agente xenobiótico y las células de los organismos, aportando información sobre los mecanismos de acción de los agentes xenobióticos, lo cual puede ser utilizado para conocer y prevenir los efectos de agentes externos en los organismos. Además, el uso de biomarcadores moleculares permite utilizar la información obtenida en otras especies, ya que el efecto que se provoca sobre el metabolismo, podría encontrarse en diversos organismos asumiendo que poseen las mismas rutas metabólicas.

Actualmente existen pocos estudios sobre los efectos que provoca el agente dispersante Nokomis 3-F4 en el metabolismo de los organismos marinos. Diversas investigaciones en donde se evaluán los efectos a nivel molecular sobre especies terrestres expuestas a diversos agentes xenobióticos, han establecido como biomarcadores los efectos que presentan algunas enzimas en los organismos, así como algunos productos metabólicos o rutas bioquímicas afectadas por los agentes xenobióticos (Rand y Petrocelli, 1985).

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es una enzima de gran importancia en el metabolismo de los carbohidratos, al actuar sobre la glucosa, una fuente importante de combustible en los seres vivos, la cual es fosforilada a glucosa-6-fosfato, molécula que es utilizada en diversas rutas

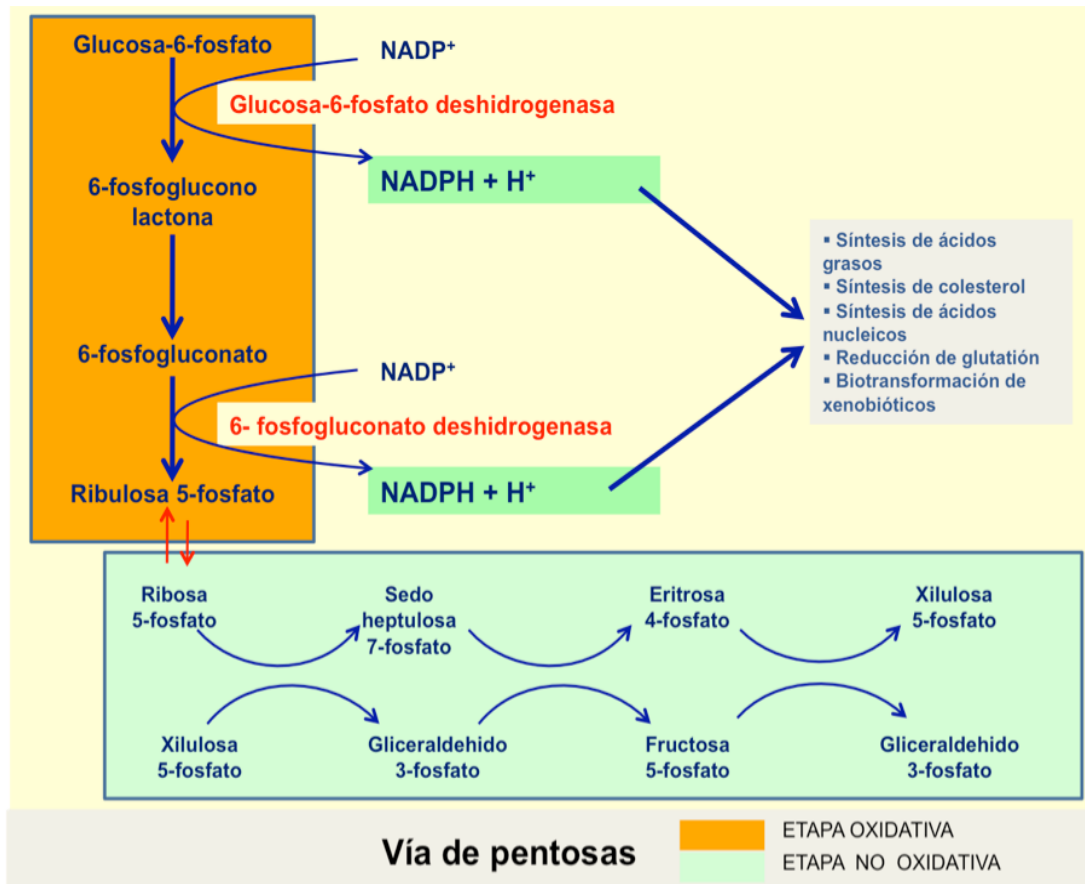
metabólicas. La G6PDH se encuentra implicada en una ruta del metabolismo llamada vía de pentosas, la cual se divide en dos fases: la primera llamada oxidativa, donde la primera enzima en intervenir es la G6PDH la cual deshidrogena a la glucosa-6-fosfato con ayuda del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+). Esta reacción da lugar a 2 reacciones más, que se encargan de formar como productos dos moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH) y una molécula de ribulosa-5-fosfato por cada glucosa-6-fosfato. En la segunda fase conocida como no oxidativa, la ribulosa-5-fosfato realiza una serie de conversiones hacia otros monosacáridos (Fig. 2). Estas conversiones se llevan a cabo dependiendo de los requerimientos energéticos del organismo formando como producto final una molécula de gliceraldehído-3-fosfato y dos moléculas de fructosa-6-fosfato por cada tres moléculas de ribulosa-5-fosfato, las cuales son de utilidad para la glucólisis. Así, el exceso de ribulosa-5-fosfato formado por la vía de pentosas puede convertirse completamente en moléculas utilizadas en la glucólisis, la cual se encarga de aportar energía a los seres vivos a través de la generación de adenosín trifosfato (ATP) y el suministro de monómeros para las reacciones biosintéticas, tales como la formación de ácidos grasos (Stryer, 1998).

El molusco bivalvo *M. californianus*, al igual que todos los organismos vivos, utiliza el NADPH producto de la vía de pentosas, para realizar reacciones de reducción extramitocondriales. Algunos ejemplos de éstas son las

reacciones de la síntesis de ácidos grasos, los que aportan energía para la actividad biológica; así como la reducción del glutatión, siendo éste requerido para la reducción de especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species). En esta reducción el glutatión actúa como un antioxidante natural evitando que las especies reactivas del oxígeno provoquen la muerte celular. Así mismo, el NADPH actúa en los procesos de detoxificación de agentes xenobióticos donando electrones en dichos procesos, para transformar dichos agentes y facilitar su eliminación.

Al igual que el NADPH, la ribulosa 5-fosfato, como producto de la vía de pentosas, es de gran importancia en los procesos metabólicos de los moluscos, ya que actúa en los procesos de reproducción y crecimiento de dichos organismos, al participar en la síntesis de ácidos nucleicos (Tian *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se utiliza a la G6PDH como una herramienta para conocer los efectos que provoca Nokomis 3-F4 sobre el metabolismo de *M. californianus*. Considerando el papel de esta enzima en el metabolismo, su utilización como biomarcador podría indicar los efectos que este dispersante tiene sobre la formación de productos de la vía de pentosas. Esto permitiría inferir el impacto en los procesos del organismo relacionados con esta ruta metabólica.



Modificado de Pankaja (2009)

Fig. 2.- Vía de pentosas. Se muestra la etapa oxidativa y la etapa no oxidativa. Del lado derecho se indica el uso metabólico que se da a los productos de esta ruta metabólica.

II. ANTECEDENTES

Las pruebas de toxicidad aguda en organismos, en las cuales se obtienen valores como la CL_{50} son útiles como herramientas para evaluar el efecto que provocan los agente xenobióticos en los organismos. A través de estas pruebas se puede conocer el intervalo de concentraciones de agentes xenobiótico que pueden ser tolerados por los ecosistemas. Así mismo, un estudio donde se evalúan efectos más específicos, como lo son los estudios a nivel molecular, permite dar un panorama más amplio de los efectos de un xenobiótico en el organismo.

Los agentes dispersantes han sido estudiados intensamente desde el accidente ocurrido al barco petrolero *Torrey Canyon* en 1967 en las costas de Inglaterra. Este accidente motivó la investigación de los efectos que provocan dichos agentes en los ecosistemas, así como en los organismos marinos.

Las primeras formulaciones de agentes dispersantes utilizadas en derrames de hidrocarburos mostraban ser más tóxicas para el ecosistema que el mismo hidrocarburo derramado; sin embargo, se sabe que las nuevas generaciones de dispersantes son mucho menos tóxicas (Singer *et al*, 1991). Para conocer el grado de letalidad de estos dispersantes se llevan a cabo estudios como el realizado para el agente dispersante Corexit 9527[®], por Singer *et al*. (1990), quienes obtuvieron un valor de CL_{50} de 1.6 a 2.2 ppm al exponer durante 48 h a larvas del abulón *Haliotis rufescens*. De igual forma, Briceno *et al*. (1992) encontraron un valor de CL_{50} a las 96 h para el pez *Fundulus*

heteroclitus de 99 a 124 ppm. Por otra parte, estudios realizados con el dispersante Corexit 500[®] muestran una CL₅₀ a las 96 h para *F. heteroclitus* de 140 ppm (George-Ares y Clark, 2000).

En otros estudios, Singer *et al.* (1993) realizaron pruebas de toxicidad aguda para Nokomis 3[®] comparándolo con el agente dispersante Slik-A-Way en el artrópodo *Holmesmysis costata* obteniendo para 96 h de exposición una CL₅₀ de 119.9 ppm en Nokomis 3[®] y CL₅₀ de 31.3 ppm para Slik-A-Way, lo que demuestra que Nokomis 3[®] es menos tóxico que el Slik-A-Way.

Mckee (1991), al llevar a cabo experimentos con el agente dispersante Nokomis 3-F4 en el pez *Menidia beryllina* y en el crustáceo *Americamysis bahia*, obtuvo una CL₅₀ a las 96 h de 29.8 y 32.2 ppm respectivamente. Así mismo, Mckee encontró un valor de CL₅₀ de 65.7 ppm al exponer a *Fundulus heteroclitus* al dispersante por 96 h y un valor de 68.6 ppm en *Artemia salina* a 48 h de exposición.

Investigaciones efectuadas recientemente por Hemmer *et al.* (2010) para el dispersante Nokomis 3-F4 muestran una CL₅₀ para *M. beryllina* de 19 ppm al exponer al pez durante 96 h. De igual forma, al exponer a *A. bahía* al dispersante Nokomis 3-F4 durante 48 h encontraron una CL₅₀ de 42 ppm. Estos estudios muestran un efecto a nivel general de Nokomis 3-F4 sobre los organismos marinos; sin embargo, existen pocas investigaciones donde se evalúen los efectos que este dispersante puede causar a nivel molecular.

Para conocer el efecto de los agentes dispersantes a niveles específicos en los organismos, se han llevado a cabo diversas investigaciones; tal es el caso del estudio realizado por Judson *et al.* (2010) en células humanas *in vitro* donde realizaron pruebas para evaluar la citotoxicidad (toxicidad celular) y el potencial de interacción con receptores andrógenos y estrógenos al exponer a dichas células a ocho diferentes agentes dispersantes, siendo Nokomis 3-F4 uno de los compuestos evaluados. En dicho estudio se encontró que los ocho dispersantes presentaban un efecto citotóxico a concentraciones de entre los 10 y 1000 ppm de los dispersantes. De igual forma, efectos a nivel molecular fueron evaluados por Judson *et al.* (2010), al realizar ensayos para evaluar el potencial de interacción con receptores andrógenos y estrógenos *in vitro* sobre células de hígado humano, ellos reportaron que sólo dos de los ocho dispersantes presentaban un potencial como disruptor endócrino. Al observar un aumento en la actividad estrogénica, encontraron una AC₅₀ (actividad en la cual se observa un 50% de la actividad máxima) a la concentración de 16 ppm para Nokomis 3-F4 y 25 ppm para el dispersante ZI-400.

Para ampliar el panorama sobre la acción de los agentes dispersantes en los seres vivos, es preciso contar con información sobre sus cambios moleculares, al estar expuesto a concentraciones no letales pero capaces de ocasionar efectos sobre biomarcadores, como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Así, al conocer los efectos que provoca el agente dispersante Nokomis 3-F4 sobre la actividad de esta enzima, se tendrá un conocimiento

aplicable sobre el impacto de este derivado de nonil fenol en el metabolismo de dicho organismo.

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre efectos a nivel molecular, la acción de diversos agentes dispersantes ha sido evaluada sobre la actividad de la G6PDH. En estudios como el realizado por Mageau *et al.* (1987) se encontró que al exponer a la almeja *Serripes groenlandicus* durante 14 días a una mezcla de hidrocarburo y el dispersante Corexit 9527®, la actividad de esta enzima disminuye a través del tiempo de exposición, pero muestra una tendencia a estabilizarse después de 14 días. Esta disminución de la actividad fue observada a concentraciones de la mezcla entre 0.2 y 5 mg/Kg de peso corporal de los organismos.

Gilfillan *et al.* (1984), en un estudio *in situ* encontraron que al colocar a *Mytilus edulis* y a *Mya arenaria* en un ambiente con petróleo crudo tratado con Corexit ®9527, un ambiente con petróleo crudo sin tratar y un ambiente sin petróleo (control), la actividad de la G6PDH aumentó al agregar el petróleo crudo. Así mismo, se observó que la temperatura de la zona varió al momento de exponer a estas condiciones, por lo que atribuyen este aumento en la actividad enzimática tanto a los factores ambientales (temperatura y alimento), así como al estrés ocasionado por el petróleo.

En estudios efectuados sobre organismos marinos expuestos a contaminantes, se ha demostrado la sensibilidad que presenta la enzima G6PDH como biomarcador. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Durkina

et al. (1991), quienes encontraron una actividad de $39 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína en las larvas de erizo usadas como control y una inhibición enzimática a ciertas concentraciones de zinc. En otra investigación elaborada por Gilfillan *et al.* (1985) se expuso a *M. edulis* a un estuario presumiblemente contaminado donde se encontró una disminución significativa en la actividad de la G6PDH, al tener un incremento en la concentración de cromo en el tejido de *M. edulis*. De la misma manera Gagné *et al.* (2007), en una investigación realizada en el mejillón de agua dulce *Ellipto complanata*, encontraron que la G6PDH presentó una disminución en la actividad al exponer al organismo a efluentes urbanos y atribuyeron el cambio de producción de NADPH a la producción de NADH en apoyo a la β -oxidación, durante la síntesis de lípidos, esto debido a que se cree que el efluente al que se encontraba expuesto *E.complanata* presentaba un potencial estrogénico.

En 2002, Winzer *et al.* realizaron estudios en el pez *Platichthys flesus* sugiriendo que la inhibición de la G6PDH reflejaba el principio de un desbalance celular después de encontrarse en estrés oxidativo por xenobióticos, encontrando que dicha enzima podía ser utilizada como marcador sensitivo para lesiones hepáticas.

En condiciones en donde los organismos se encuentran en ambientes presumiblemente libres de contaminantes, se han realizado investigaciones como la llevada a cabo por Gabbott y Head (1980), quienes en un estudio en *M. edulis* evaluaron los cambios estacionales de la enzima G6PDH, encontrando

una actividad de $30 \pm 9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína en el manto y una actividad de $69 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína en la glándula digestiva. Ellos observaron un aumento de la actividad enzimática en la época de verano lo cual atribuyeron al incremento en el alimento, lo que provocaba un aumento en los niveles de carbohidratos en los tejidos de *M. edulis*.

La primera enzima involucrada en la vía de pentosas, la G6PDH fue identificada por primera vez en el mejillón *M. californianus* por Bennet y Nakada (1968). En estudios posteriores realizados por Rodriguez-Segade *et al.* (1980) se encontró que la inhibición de la G6PDH en la glándula digestiva de *M. edulis* se veía afectada por las moléculas de NADP^+ ; así mismo, se observó que esto podía ser contrarrestado por el glutatión en su forma oxidada. Por otra parte, al llevar a cabo investigaciones con dicha enzima, García *et al.* (1984) hallaron que tanto la actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) como la G6PDH mostraban una fuerte inhibición por parte del NADPH, lo que disminuía la eficiencia en la vía de pentosas de fosfato.

La G6PDH tiene una gran importancia, ya que es la enzima encargada de regular la velocidad de la vía de pentosas; también determina la producción de NADPH mediante el control del metabolismo de la glucosa a través de dicha ruta (Wood, 1985).

Estudios llevados a cabo por Tian *et al.* (1998) corroboran la importancia de la actividad de la G6PDH no solo en la vía de la pentosas, sino también en el crecimiento de la célula, ya que proporciona NADPH para reacciones REDOX

(óxido-reducción), lo cual la hace una enzima de interés para conocer el posible efecto de agentes xenobióticos sobre el crecimiento de los organismos. Por otro lado, Biagiotti *et al.* (2000) proporcionaron evidencia de que la G6PDH es la enzima reguladora del nivel NADPH necesario para los procesos de biotransformación de agentes xenobióticos y para las defensas contra el estrés oxidativo, el cual provoca muerte de la célula, ocasionando efectos severos sobre los organismos.

En los seres vivos existen variaciones de individuo a individuo en el desarrollo de la vía de pentosas, así como en la actividad de la G6PDH. De igual forma, estas variaciones se presentan en los diversos tejidos de un organismo, debido a que los requerimientos de cada tejido dependen de la función que desempeñe en éste. Así, en estudios realizados en mejillones se ha observado que la vía de pentosas es importante en el manto, ya que en él ocurre el almacenamiento de nutrientes y la gametogénesis. Esto se presenta especialmente en hembras, donde los esfuerzos reproductivos necesitan de acumulación de lípidos y de síntesis de ácidos nucleicos (Gabbott, 1975).

Al evaluar el efecto que provoca el agente dispersante Nokomis 3-F4 sobre la actividad de la enzima G6PDH de *M. californianus*, se pueden inferir algunos aspectos relativos a esta enzima. Por ejemplo, un aumento en la actividad de la enzima podría sugerir que el organismo es capaz de biotransformar a este agente dispersante, ya que al incrementar su actividad estaría utilizando el NADPH para la biotransformación ó bien, lo estaría usando

como agente reductor en procesos metabólicos contra el estrés oxidativo provocados por el agente dispersante. En cualquiera de estas dos situaciones, la enzima tendría que aumentar su velocidad para satisfacer la demanda de NADPH. Por el contrario, y de acuerdo con Gagne *et al.* (2007), una disminución en la actividad de dicha enzima estaría indicando que el organismo cambia de producir NADPH a generar NADH en apoyo a la oxidación durante la síntesis de lípidos, en respuesta a contaminantes.

Debido a que se han realizado estudios en diversos organismos y éstos presentan letalidad al exponerse al dispersante Nokomis 3-F4, es posible que este dispersante sea letal sobre el mejillón *Mytilus californianus*. Por otra parte, la falta de estudios a nivel molecular en la acción de Nokomis 3-F4 hacen necesario abundar sobre el tema, por lo que esta investigación tiene el propósito de ampliar el conocimiento de acción de Nokomis 3-F4 sobre la actividad enzimática de la G6PDH de *M. californianus*, proponiendo como hipótesis que dicha enzima presentará una respuesta al encontrarse el organismo expuesto a condiciones tanto agudas como crónicas del agente dispersante.

III. OBJETIVO

III.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de Nokomis 3-F4 en *Mytilus californianus* mediante el estudio de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como biomarcador.

III.2. Objetivos particulares

- Obtener el valor de CL_{50} para el dispersante Nokomis 3-F4 en *Mytilus californianus*.
- Cuantificar el efecto del dispersante Nokomis 3-F4 sobre la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Mytilus californianus* en una prueba de toxicidad aguda, así como en una prueba de toxicidad crónica.

IV. METODOLOGÍA

Se realizaron pruebas de toxicidad aguda y crónica en el mejillón *Mytilus californianus* exponiendo a éste al agente dispersante Nokomis 3-F4 siguiendo los protocolos descritos por Rand y Petrocelli (1985). En cada uno de los experimentos se expuso al organismo a diversas concentraciones del agente dispersante Nokomis 3-F4 por un tiempo determinado. Fueron extraídas muestras de tejido de cada organismo expuesto, de las cuales se obtuvieron fracciones celulares. En cada fracción celular se cuantificó la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la concentración de proteínas. Mediante el ensayo de toxicidad aguda se obtuvo la CL_{50} de *M. californianus* expuesto a Nokomis 3-F4 y con el ensayo de toxicidad crónica se obtuvieron las concentraciones a las cuales se empieza a observar efecto del principio activo de Nokomis 3-F4.

IV.1. Área de colecta

Los mejillones de la especie *M. californianus* fueron colectados en la playa del Ejido Eréndira, en el municipio de Ensenada, Baja California, ubicada a 190 km de la frontera México y Estados Unidos, a los 31° 27' latitud Norte 116° 21' longitud Oeste. La zona de colecta se caracteriza por un oleaje de alta energía y presencia del fenómeno de surgencia; dicho oleaje baña la playa litoral de aguas frías que proporcionan una alta cantidad de nutrientes, vitales para la fauna y la flora del lugar (Fernández y Aldeco- Ramírez, 1981).

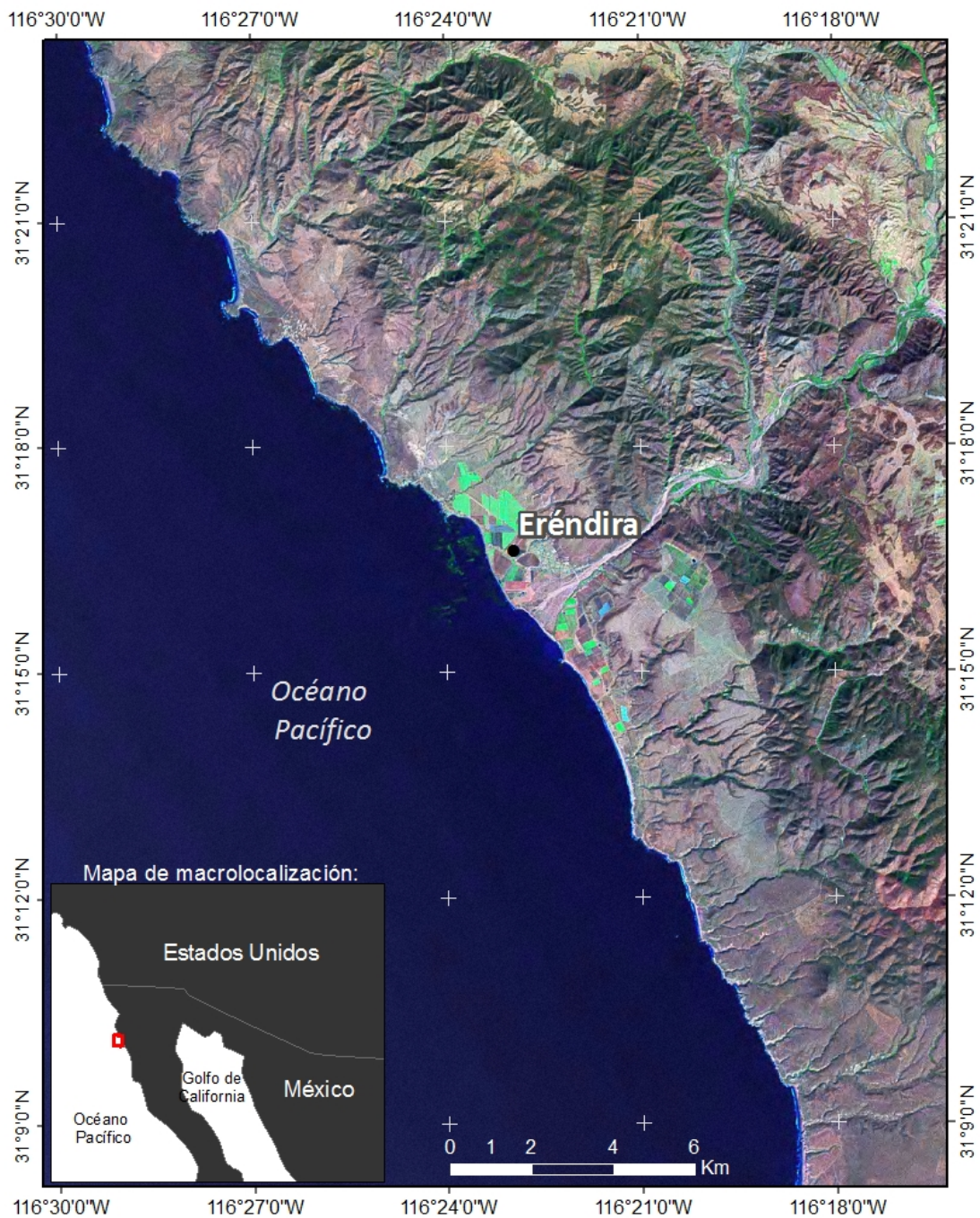


Fig. 3.-.Localización geográfica del área de colecta, Eréndira Baja California, México.

IV.2. Colecta y acondicionamiento de mejillones de la especie (*Mytilus californianus*).

Se realizaron salidas de campo al Ejido Eréndira, Baja California, México, en donde se obtuvieron mejillones de la especie *Mytilus californianus*. Se tomaron registros de salinidad, temperatura y pH del agua de mar de la zona en la cual se colectaron los organismos. Las salidas al campo se llevaron a cabo de acuerdo a la tabla de mareas propuesta por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Para cada ensayo realizado se llevó a cabo una colecta.

Los organismos colectados fueron trasladados al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, en donde fueron colocados en un tanque de fibra de vidrio con agua de mar ($S_{\text{‰}}=35$) previamente acondicionada a una temperatura 16-18 °C. Cada 3 días se realizó la limpieza y recambio parcial con agua de mar, reponiendo el agua descartada con agua de mar obtenida de la zona de Punta Morro. Se midió la temperatura y salinidad a la que se encontraba el agua del tanque hasta su utilización en el ensayo.

Los organismos se alimentaron cada día con un concentrado de la microalga *Isochrysis sp.* (TM ® Reed Mariculture). Los organismos fueron clasificados por personal del Instituto de Investigaciones Oceanográficas (IIO).

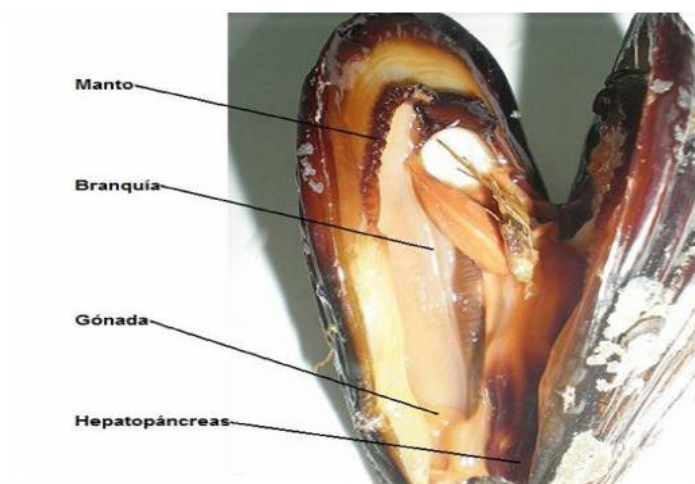


Fig. 4.- Anatomía de *M. californianus*. Se muestran los tejidos utilizados en cada experimento.

IV.3. Pruebas de solubilidad del tóxico

Se realizaron pruebas de solubilidad para el dispersante Nokomis 3-F4, en los siguientes solventes: agua destilada, agua de mar, etanol y acetona, para decidir el solvente a utilizar en los ensayos.

IV.4. Obtención del espectro de absorción

Se realizaron pruebas sobre las propiedades ópticas del agente dispersante Nokomis 3-F4, utilizando soluciones en agua de mar, agua destilada y etanol. Las soluciones se prepararon aplicando los siguientes factores de dilución al producto comercial: 4, 100, 200, 450, 460, 500 y 600. Para cada solución se realizó un barrido de 200 a 400 nm, en un espectrofotómetro THERMO uv/visible helios α .

IV.5. Estudio de toxicidad aguda.

IV.5.1 Ensayo preliminar.

Con la finalidad de encontrar el intervalo de concentraciones más adecuado para exponer al mejillón *M. californianus* y observar el efecto de muerte. Se colocaron grupos de tres organismos en recipientes de vidrio, variando la concentración de manera creciente y en forma exponencial de Nokomis 3-F4 en agua de mar. Las concentraciones probadas fueron: 0, 0.1, 1 y 10%. La distribución de los organismos en cada recipiente se realizó tomando en cuenta el tamaño de los organismos, el que fue de 8.0 ± 0.5 cm, colocando los organismos de tal forma que los promedios de cada grupo fueran similares. Para cada recipiente se colocó una réplica. Una vez en los recipientes, los organismos se revisaron cada 24 horas durante 96 h registrando el número de organismos muertos.

Con este ensayo se obtuvo el intervalo de concentraciones más apropiadas para llevar a cabo un segundo experimento, utilizando concentraciones aritméticamente crecientes.

En el segundo ensayo preliminar, además de registrar el número de muertos, se evaluó la actividad de la enzima G6PDH en el mejillón *M. californianus* bajo exposición a Nokomis 3-F4 y el tiempo de exposición se aumentó a 144 horas. Se colocaron grupos de tres mejillones en recipientes con una capacidad de 2.8 L, utilizando organismos que fueron medidos previamente eligiendo tamaños de 8 ± 0.5 cm, cuidando que los promedios de cada grupo

fueran similares. Las concentraciones probadas fueron 0, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 ppm, las cuales se denominaron C0, C1, C2, C3, C4, C5 y C6 respectivamente. Para cada recipiente se trabajó una réplica. Una vez en los recipientes, los organismos se revisaron cada 24 horas, anotando el número de muertos. Posteriormente se realizó la disección del organismo para la extracción de branquias, hepatopáncreas, gónadas y manto. Una vez extraído cada tejido se procedió a congelar las muestras hasta su uso para la evaluación de la G6PDH y la determinación de proteínas.

IV.5.2. Ensayo definitivo para la determinación de CL_{50} .

Se formaron grupos con tres organismos, para ello se tomaron especímenes de talla de 8.0 ± 0.5 cm. Cada grupo se colocó en frascos con una capacidad de 2.8 L. Se probaron cinco concentraciones y un control (C0); las concentraciones aplicadas fueron de 50, 100, 150, 200, 300 y 400 ppm, nombrándose C1, C2, C3, C4, C5 y C6 respectivamente. En el transcurso del experimento se revisaron los organismo continuamente para observar su reacción ante la exposición del agente dispersante. Una vez transcurridas 120 horas se realizó la cuantificación de sobrevivientes en cada recipiente y se llevó a cabo la disección, extrayendo manto, branquias, gónadas y hepatopáncreas, para el posterior análisis de la enzima G6PDH.

IV.6. Estudio de toxicidad crónica.

Se colocaron diez mejillones en cuatro peceras con una capacidad de 15 L; dos de ellas se utilizaron como control (C_0) y en las dos restantes se agregó dispersante Nokomis 3-F4 las concentraciones fueron seleccionadas con base en la CL_{50} obtenida en el ensayo de toxicidad aguda, utilizando dos concentraciones menores al valor de CL_{50} . Una de ellas fue el equivalente a CL_2 (concentración letal en donde muere el 2% de los organismos expuestos durante 120 h) y la otra a CL_{10} (concentración letal en donde muere el 10% de los organismos expuestos durante 120 h). El tiempo de exposición fue de 90 días, período en el cual se realizó el recambio de agua cada semana, colocando de nuevo a los organismos en las mismas concentraciones iniciales. A cada pecera se le agregó el alimento necesario para cada organismo utilizando un concentrado de la microalga *Isochrysis sp*, pasta obtenida de la empresa Reed Mariculture (TM ® Reed Mariculture).

Una vez transcurridos los 90 días del experimento, los organismos fueron extraídos de sus peceras, tanto los de C_0 como los de las concentraciones de CL_2 y CL_{10} para extraer hepatopáncreas, gónada, manto y branquias. Los tejidos fueron congelados hasta su uso para la medición de proteínas y actividad de la G6PDH.



Fig. 5.-Distribución de organismos en ensayo preliminar. Los siete frascos que contienen las diversas concentraciones se encuentran distribuidos aleatoriamente.



Fig. 6.- Distribución de organismos en ensayo de toxicidad aguda. Se muestra sólo una parte de los recipientes del ensayo. Los frascos con las siete concentraciones utilizadas se acomodaron de forma aleatoria.

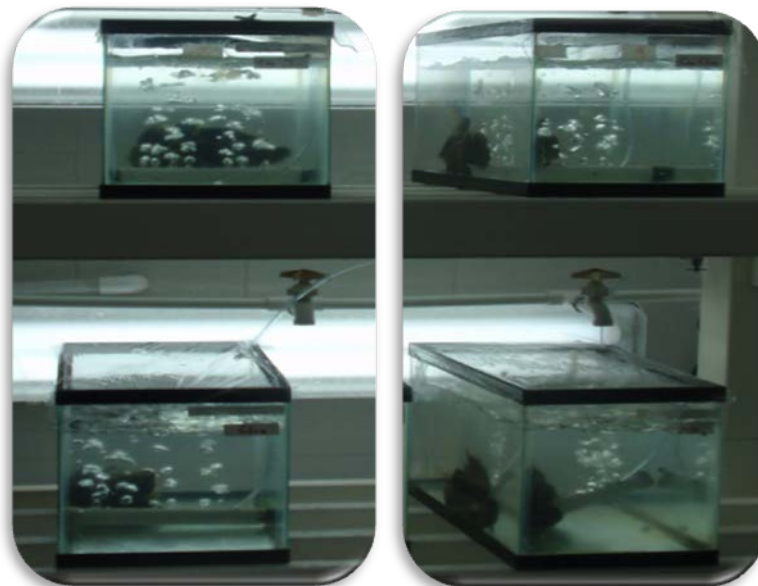


Fig. 7.- Distribución de organismos en ensayo de toxicidad crónica. Se muestra en la parte superior los organismos control, en la parte inferior del lado izquierdo los organismos expuestos a la CL₂ de Nokomis 3-F4 y en la parte inferior del lado derecho se muestran los organismos sometidos a la CL₁₀ del dispersante.



Fig. 8.- Disección y extracción de tejidos de *M. californianus*, después de encontrarse expuesto a la mezcla de agua de mar con dispersante Nokomis 3-F4. Se extrajeron gónadas, manto, hepatopáncreas y branquias.

IV.7. Evaluación de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Para cada muestra de tejido de hepatopáncreas, manto, branquias y gónadas, en los diferentes ensayos se realizaron los procedimientos que a continuación se describen:

IV.7.1 Obtención de fracciones celulares

La fracción soluble de los homogenados para cada tejido fue obtenido utilizando el método propuesto por Lohr *et al.* (1974) modificado por Guerra (2003). Se pesó una porción de 0.2 g de tejido, el cual fue suspendido en Na₂ EDTA (sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético) al 0.1% en solución salina y homogenizado en un homogenizador POLYTRON PT 2100. Posteriormente, el homogenado fue centrifugado durante 20 min a 15,000 RPM a 16 °C. El sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de proteínas así como para la evaluación de la G6PDH.

IV.7.2. Ensayo enzimático

La actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se midió mediante el incremento en la absorbancia del NADPH a través del tiempo a 340 nm.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Livingstone (1981), con las siguientes modificaciones: MgCl₂ 63 mM, glucosa-6-fosfato 33 mM, NADP⁺ 3.8 mM y maleimida, todo en un buffer tris 0.5 M a un pH de 7.5, en un volumen final de 1.2 mL. Se corrió una línea base a 340 nm con la mezcla de reacción en un espectrofotómetro THERMO uv/visible helios α. Posteriormente se adicionó el sobrenadante para activar la reacción y una vez

activada se tomó lectura a 340 nm durante 10 min. Cada ensayo se realizó por duplicado.

IV.7.3. Determinación de proteínas

Para determinar la concentración de proteína en el homogenado, se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951), que consistió en agregar a una porción del homogenado diluido con agua destilada una serie de soluciones. Primeramente una solución alcalina de cobre (1mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico de potásico al 1% y 50 mL de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N), dejando reposar por 10 min para adicionar posteriormente 5 mL de reactivo de Folin, una vez agregados éstos, se esperaron 30 min y se procedió a la lectura en un espectrofotómetro Spectronic 21 a 750 nm.

La concentración de proteína (mg/mL) se calculó en función de la ecuación obtenida mediante una curva de calibración con diez concentraciones de 0 a 0.5 mg/ mL de proteína utilizando un estándar de albúmina de 0.5 mg/ mL.

IV.7.4. Cálculos para la obtención de la actividad enzimática

La actividad enzimática se definió en términos del número de nanomoles de NADP reducido por minuto por gramo de tejido, que se calculan según la siguiente ecuación:

NADPH producido durante la reacción (nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína)=

$$(\Delta A/\Delta t * Vol_{reacción})/(\epsilon * b * mg \text{ de proteína})$$

Donde:

$\Delta A/\Delta t$ = Cambio de absorbancia de la mezcla de reacción en 1 min

$Vol_{reacción}$ = Volumen total de ensayo en mL

ϵ = coeficiente de extinción de NADPH (6.22X 10⁻³ nmol⁻¹ mL cm⁻¹, SIGMA, 2003)

b = Espesor de la celda en cm (1)

mg de proteína = cantidad de proteína presente en el sobrenadante.

(Guerra, 2003)

IV.8. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico en los diversos ensayos efectuados, a éstos se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1999) para observar si la distribución de los datos era normal, de igual forma se comprobó la homocedasticidad de las varianzas. Posteriormente se realizó el análisis de varianza ANOVA (Zar, 1999) para evaluar si existía diferencia entre las medias de cada grupo. Se realizó la comparación entre cada concentración y el control con la prueba estadística propuesta por Dunnet (Zar, 1999). Para los datos no paramétricos se hizo una comparación entre las diferentes concentraciones con respecto al control en cada ensayo mediante estadística no paramétrica.

IV.8.1. Obtención de CL_{50}

Con los datos de la prueba de toxicidad aguda se estableció la respuesta al agente dispersante (muerte) en función de la concentración del mismo. El valor de CL_{50} se obtuvo mediante un análisis Probit.

V. RESULTADOS

V.1. Pruebas de solubilidad

Al realizar los ensayos de solubilidad del dispersante Nokomis 3-F4 diluyendo en acetona, etanol, agua destilada y agua de mar, se encontró que el dispersante presentó poca solubilidad en acetona y una mayor solubilidad en etanol y agua destilada. La mayor solubilidad obtenida fue en el agua de mar (Tabla I), por ello los ensayos toxicológicos se llevaron a cabo utilizando agua de mar como disolvente.

Tabla I. Solubilidad del agente dispersante Nokomis 3-F4 en cada uno de los cuatro disolventes utilizados: agua de mar, agua destilada, etanol y acetona.

Solvente	Solubilidad
Agua de mar	Muy soluble
Agua destilada	Soluble
Etanol	Soluble
Acetona	Poco soluble

V.1.1. Obtención del espectro de absorción

Se obtuvieron los espectros de absorción para Nokomis 3-F4 disuelto en etanol, agua destilada y agua de mar, en el cual se observaron 2 máximos de absorción en los 3 casos, en el caso del etanol los picos encontrados fueron a los 230 nm y a los 275 nm, disuelto en agua destilada se presentan picos a los 224 nm y 275nm. En el agua de mar los máximos fueron a los 232 nm y a los 276 nm (Fig. 8).

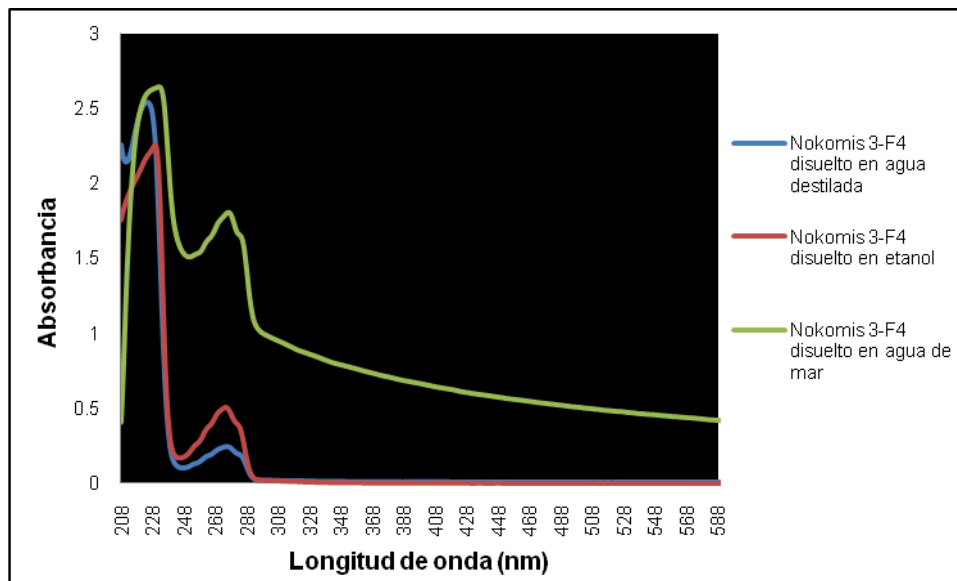


Fig. 9.- Espectros de absorción para Nokomis 3-F4 disuelto en agua de mar, etanol y agua destilada. Se observan dos máximos de absorbancia, para los tres disolventes.

V.2. Estudio de toxicidad aguda.

V.2.1. Ensayo preliminar.

El ensayo preliminar permitió encontrar el intervalo de concentraciones para exponer a *M. californianus* al agente dispersante Nokomis 3-F4 en el segundo experimento preliminar. En el primer ensayo, a la concentración de 0.1% no se observó mortandad en los organismos expuestos; por otra parte, en la concentración de 10% se encontró que todos los organismos morían.

Con base a lo obtenido se consideró el intervalo de 1-10% como el más adecuado para encontrar el valor de CL_{50} en *M. californianus*. Para este fin se

eligieron las concentraciones para el segundo preliminar con base en la escala aritmética, siendo éstas: 0, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 ppm.

Al realizar en el segundo ensayo preliminar la evaluación de la G6PDH de los diversos tejidos en los organismos, se encontraron valores de actividad entre 2 y 6 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (Fig. 9). Para los organismos control, el valor más alto ($3.78 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) se encontró en el hepatopáncreas, mientras que el menor valor ($2.35 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) se presentó en el manto de los mismos. Para los organismos expuestos, se encontraron los siguientes resultados: en el manto no hubo diferencias significativas de actividad enzimática entre los organismos expuestos y los no expuestos. En las gónadas se observó una disminución significativa de actividad con respecto al control en la concentración de 400 ppm (C5), presentando un valor de actividad enzimática de $2.39 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. En el hepatopáncreas se presenta una actividad más alta que en los otros tejidos, observándose una disminución significativa con respecto al control a las concentraciones C4 y C5 (200 ppm y 400 ppm, en el cual las actividades fueron de 2.66 y $2.45 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente).

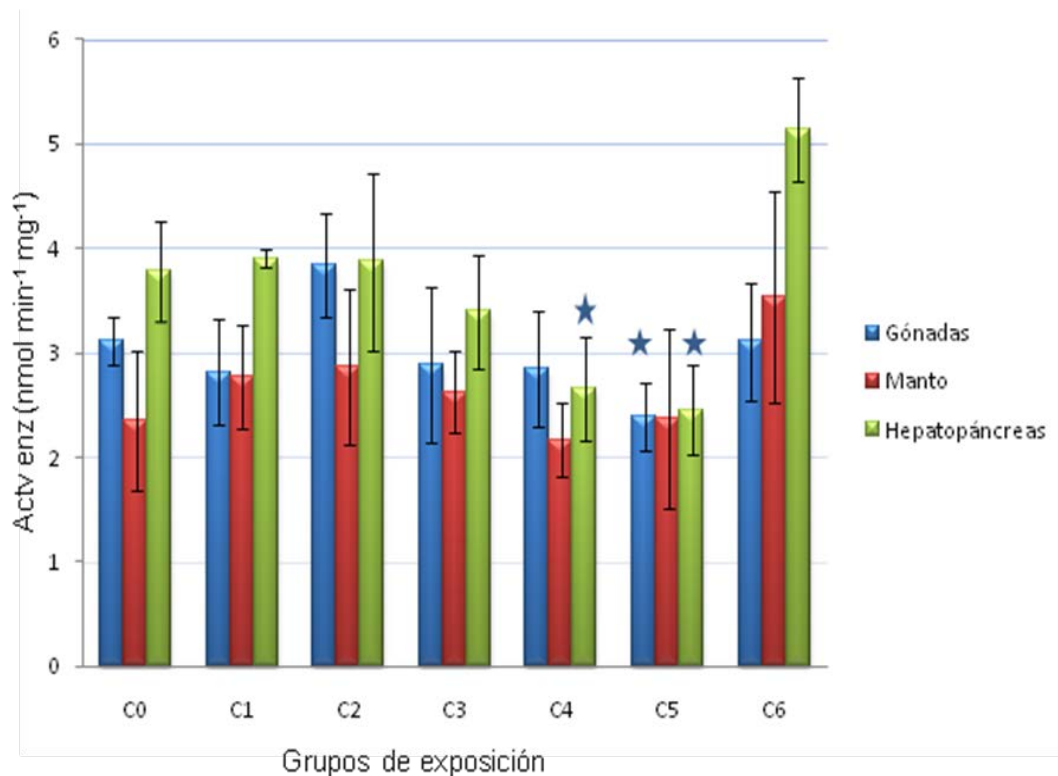


Fig.10.- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para las gónadas, manto y hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuesto a Nokomis 3-F4 durante 96 horas.

C0= Control (sin Nokomis 3-F4), C1= 25 ppm, C2= 50 ppm, C3= 100 ppm, C4= 200 ppm, C5= 400 ppm y C6= 800 ppm. Para cada caso, n = 3; se muestra la desviación estándar. El símbolo ☆ indica la diferencia significativa con respecto al control $\alpha=0.05$.

V.2.2. Ensayo definitivo para la determinación de CL_{50} .

En la obtención del valor de CL_{50} , se obtuvo para las gónadas de *M. californianus* al exponerlo durante 120 horas a Nokomis 3-F4 un efecto de éste sobre los organismos expuestos a las concentraciones de 150, 200 y 300 ppm (C3, C4 y C5) donde las actividades enzimáticas encontradas fueron de 1.36,

1.79 y 1.98 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (C3, C4 y C5 respectivamente) como se muestra en la figura 10; sin embargo, en la concentración de 400 ppm (C6) la actividad de la G6PDH incrementó, hasta llegar a un valor de 3.64 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, sin mostrar efecto de la exposición al dispersante en esta concentración.

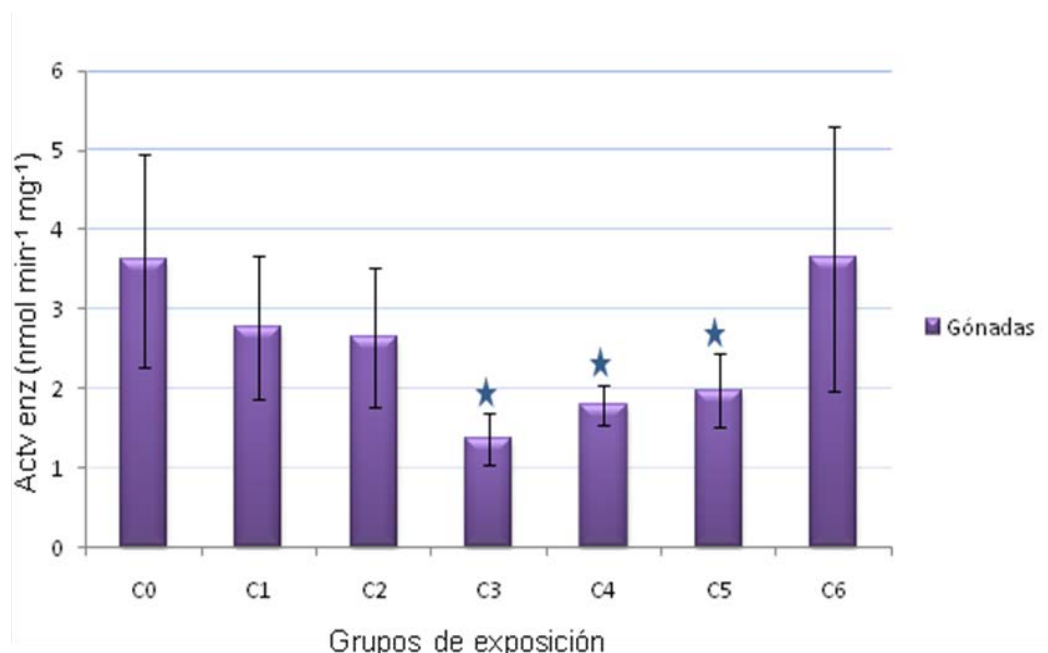


Fig. 11.-Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en la gónada de *Mytilus californianus* expuesto durante 120 h al agente dispersante Nokomis 3-F4 en una prueba de toxicidad aguda.

C0= control (sin Nokomis 3-F4), C1=50 ppm, C2= 100 ppm, C3=150 ppm, C4= 200 ppm, C5= 300 ppm y C6= 400 ppm, se muestran las desviaciones estándar obtenidas para cada grupo; el símbolo ★ indica la diferencias significativa encontrada para cada grupo $\alpha=0.05$.

En lo que respecta al valor de CL_{50} , se encontró que 70.96 ppm fue la concentración a la cual muere el 50 % de muestra de la población de *Mytilus californianus* expuesto durante 120 horas a Nokomis 3-F4. Tomando como base los datos de la Tabla II., se construyó la curva de concentración-respuesta de la figura 11, obtenida mediante el método PROBIT, la que permitió obtener el valor de CL_{50} .

Tabla II. Mortandad de *Mytilus californianus* en el ensayo de exposición a Nokomis 3-F4 para la obtención del valor de CL_{50} . La exposición fue de 120 horas y se realizó el conteo de muertos cada 24 horas. En las primeras cinco columnas se registra el número de organismos muertos durante el período de exposición señalado.

Grupo	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	Total de muertos	Mortalidad (%)	Concentración de Nokomis 3-F4 en el medio (ppm)
C0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	0	0	0	2	1	3	33.3	50
C2	0	0	0	2	5	7	77.7	100
C3	0	0	2	1	6	9	100	150
C4	0	0	1	7	1	9	100	200
C5	0	0	0	7	2	9	100	300
C6	0	0	3	3	2	8	88.8	400

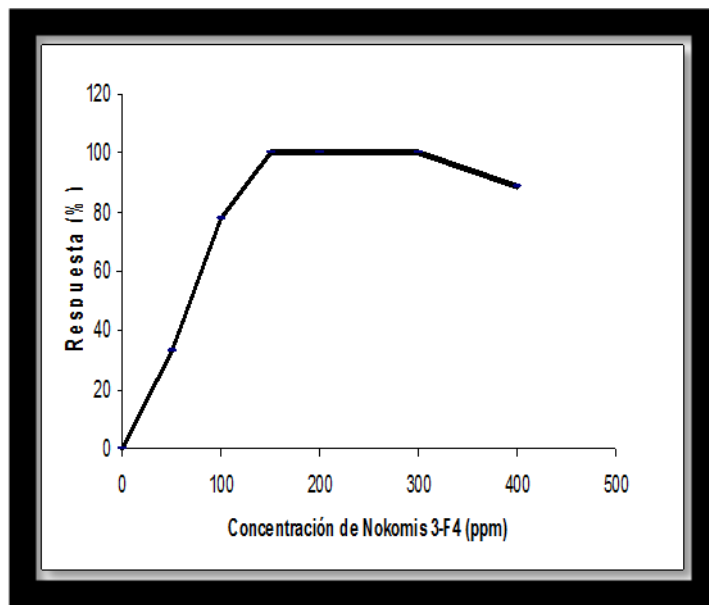


Fig.12.-Curva de concentración-respuesta para el agente dispersante Nokomis 3-F4 sobre *Mytilus californianus* durante la prueba de toxicidad aguda. Se muestra el porcentaje de organismos muertos a lo largo del experimento con una duración de 120 horas.

V.3. Estudio de toxicidad crónica

Para *M. californianus* expuesto a Nokomis 3-F4 durante 90 días, se encontraron valores en la actividad de la G6PDH que variaban entre los 1.7 y 7.54 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. En el caso de los organismos control se registró la mayor actividad de la G6PDH en el tejido de las branquias, la que fue de 7.54 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína y la menor actividad para el tejido del manto donde la actividad fue de 2.03 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Fig.12).

Para los organismos expuestos al agente dispersante se presentaron los siguientes resultados: se observó efecto sobre la actividad enzimática del hepatopáncreas a la concentración de 1.29 ppm (CL₂) en la cual la actividad de la G6PDH fue de 3.09 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína; en el caso del manto, el efecto sobre la actividad enzimática fue denotada en la concentración de 12.9 ppm (CL₁₀), la cual presentó una actividad de 1.70 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Por último para las gónadas y branquias se observó una disminución significativa en la actividad de la enzima tanto en la concentración CL₂ como CL₁₀ obteniendo para CL₂ de gónadas una actividad de 3.19 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína y para CL₁₀ una actividad de 3.61 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, y para las branquias actividades enzimáticas de 3.38 y 5.19 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para CL₂ y CL₁₀ respectivamente.

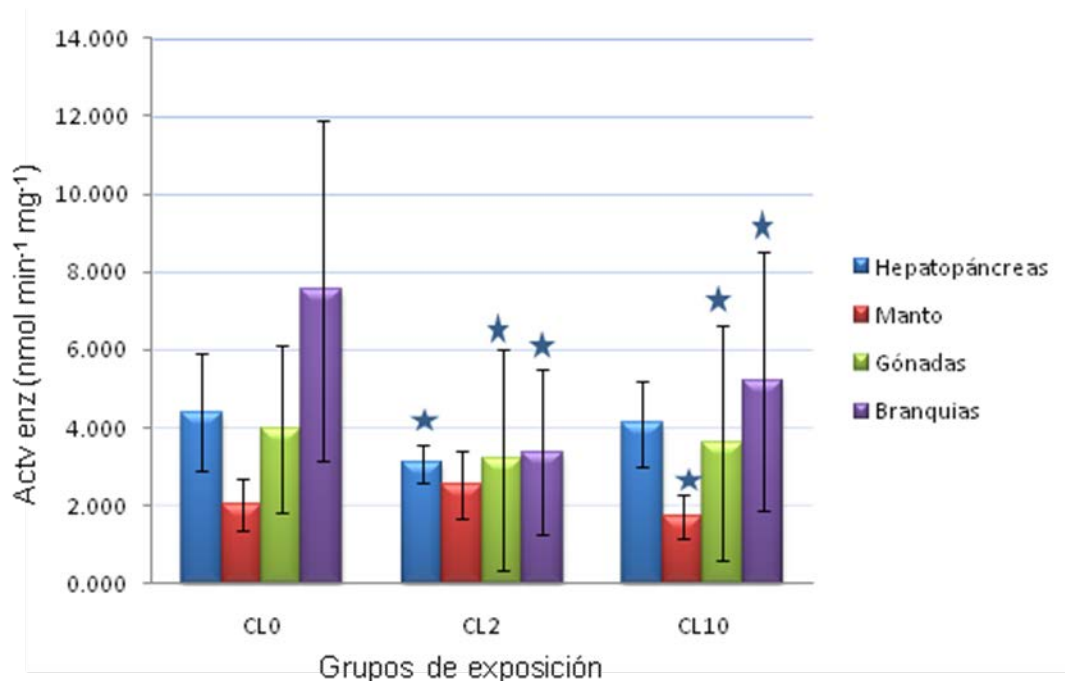


Fig. 13.- Actividad de la G6PDH en hepatopáncreas, manto, gónadas y branquias de *Mytilus californianus* expuesto durante 90 días al agente dispersante Nokomis 3-F4.

C₀= control (sin Nokomis 3-F4), CL₂= concentración de mortandad del 2% de la población expuesta (1.29 ppm), CL₁₀= concentración de mortandad del 10 % de la población expuesta (12.9 ppm). Se muestra la desviación estándar para cada grupo. El símbolo ☆ indica que existe diferencia significativa con respecto al control de este experimento $\alpha=0.05$.

VI. DISCUSIÓN

La solubilidad encontrada para Nokomis 3-F4 utilizando agua destilada y agua de mar como disolvente, corrobora la recomendación de la empresa Mar-Len supply Inc. (1) productora del agente dispersante, la que plantea utilizar el agua de mar como disolvente al aplicar el producto en derrames ocurridos en el océano.

El producto comercial Nokomis 3-F4 es una mezcla de varias sustancias, una de ellas es el nonil fenol etoxilato, compuesto que forma parte de los alquil fenoles. Este alquil fenol contiene la porción nonil fenoxi, la cual presenta una baja solubilidad en agua, ya que posee una alta hidrofobicidad debido a su porción hidrocarbonada (Ricciardi *et al*, 2008). Nokomis 3-F4 presenta también en su principio activo una porción hidrofílica, el radical etoxilado, la cual contrarresta la lipofilicidad que pueda presentar el producto, facilitando su solubilidad en el agua destilada y agua de mar como lo hacen los solventes de tipo polar que contiene Nokomis 3-F4. Debido a esto fue posible encontrar una alta solubilidad del dispersante en el agua de mar, por lo cual, se tomó la decisión de utilizarlo como solvente para la realización de las pruebas toxicológicas.

El espectro de absorción mostró dos picos de máxima absorción, uno a los 228 nm y otro a los 275 nm, lo que muestra que el producto Nokomis 3-F4 está compuesto por nonil fenol etoxilato, ya que se sabe que este compuesto tiene su máximo de absorbancia a la longitud de onda de 275 nm (Gutierrez y

Crespi, 1991). De igual forma, Babay *et al.*(2006) al realizar pruebas espectrofotométricas en una mezcla de alquil fenoles compuesta por nonil fenol etoxilato, nonil fenol dietoxilato, nonil fenol y nonil fenol monoetoxilato, encontraron los máximos espectros de absorción de esta mezcla a los 200, 230 y 277 nm, lo que corrobora la presencia del compuesto nonil fenol etoxilato; sin embargo, debe considerarse que el dispersante contiene otras sustancias, por lo que el segundo pico presente en la gráfica posiblemente sea un solvente, ya que los dispersantes requieren de solventes que mantenga homogénea la solución, para así lograr su mezcla eficiente en la columna de agua al colocarlo en un derrame de hidrocarburos.

En relación a la actividad enzimática, no se observaron diferencias significativas en ningún tejido de los organismos control entre experimentos. Es decir, los valores de los organismos no expuestos al dispersante para los tejidos de manto, gónadas y hepatopáncreas resultaron iguales, a pesar de que el estudio de toxicidad aguda se realizó con organismos colectados en una estación del año diferente a los obtenidos para el experimento de toxicidad crónica. Esto contrasta con lo encontrado por Gabbott y Head (1980), quienes evaluaron la relación en el ciclo anual reproductivo de *M. edulis* y los ciclos bioquímicos estacionales. Estos autores señalan que en esta especie existe variación estacional en la actividad de la G6PDH, mostrando un pico de actividad en verano mientras que los meses de agosto a mayo permanece relativamente constante, en concordancia con la disponibilidad de alimento. La

estabilidad en la actividad enzimática de los organismos de este trabajo puede deberse a que estos fueron alimentados con una concentración constante de alimento desde el momento que fueron colectados hasta el término de los experimentos.

Al evaluar la actividad de la G6PDH en el ensayo preliminar en el manto no se observó que el dispersante ocasionara cambio en la actividad enzimática a ninguna concentración de exposición. La ausencia de efecto puede deberse a que el ensayo se realizó en enero y según lo propuesto tanto por Santiago y Rojas, (1982) como por Chi y García (1984), *M. californianus* realiza sus desoves más intensos en invierno (diciembre, enero y febrero), por lo que una vez terminada esta época, el peso de este tejido disminuye, como lo reportan Kagley *et al.*(2003). Esta disminución se debe a que el organismo utiliza su glucógeno de reserva para realizar la síntesis de lípidos utilizados en la creación de los gametos (Gabbott ,1975; Ruiz *et al.*, 2007) los cuales se pierden al realizar el desove, por lo que disminuye la afinidad del tejido hacia compuestos lipofílicos como la porción etoxilada de Nokomis 3-F4. Así, el tejido incorpora poca cantidad de dispersante, lo que a su vez ocasiona que la vía de las pentosas no se vea afectada.

En las gónadas se encontró efecto de Nokomis 3-F4 únicamente sobre la actividad enzimática de la G6PDH del mejillón al exponerlo a la concentración de 400 ppm (C5). La falta de efecto sobre otras concentraciones a las que se encontraba expuesto *M. californianus* puede explicarse también como se

describió para el manto en función de la terminación de su época de desove, al ocurrir este proceso, disminuye la cantidad de lípidos tanto en el manto como en las gónadas, ya que se sabe que las gónadas son desarrolladas a través del tejido del manto (Gabbott, 1983). Al disminuir la cantidad de lípidos en el tejido se crea una carencia de efecto sobre la actividad enzimática en los mejillones expuestos a concentraciones menores a 400 ppm del dispersante, por la poca afinidad de este sobre el tejido, como se mencionó anteriormente para el tejido del manto.

En el ensayo preliminar, los organismos no expuestos al dispersante (control) mostraron en el hepatopáncreas la mayor actividad enzimática (Fig. 9) comparado éste con los otros dos tejidos; la alta actividad enzimática encontrada puede deberse a que en este tejido se llevan a cabo una gran cantidad de procesos bioquímicos, lo que provoca que rutas como la vía de pentosa adquieran una mayor intensidad, para satisfacer las diversas funciones que realiza el organismo, aumentando así, la actividad de la G6PDH.

Para el hepatopáncreas el efecto de Nokomis 3-F4 sobre la enzima G6PDH de *M. californianus* se presentó en los organismos expuestos a las concentraciones de 200 y 400 ppm. Comparado con el efecto encontrado para las gónadas en este mismo ensayo, el hepatopáncreas mostró ser un tejido más sensible, ya que el efecto se presentó por exposición a una concentración menor (200 ppm) que las que ocasionan efecto sobre las gónadas (400 ppm). Posiblemente debido a que el hepatopáncreas es un tejido altamente sensible

a los cambios fisiológicos y ambientales (Johnston et al. 1998). Así, los procesos de reserva y detoxificación de agentes xenobióticos en los que participa el hepatopáncreas, lo vuelven un tejido vulnerable ante la exposición a dichos agentes. Una vez incorporado el dispersante Nokomis 3-F4 en el organismo, la afinidad de éste por los diversos tejidos varía de acuerdo al contenido de lípidos de los mismos. Sin embargo, el hepatopáncreas mostró ser más sensible que el manto y las gónadas, al encontrar un efecto a una concentración más baja del dispersante. Esto se observa al disminuir su actividad enzimática a los 200 ppm, lo que ocurre posiblemente a que los metabolitos de la vía de pentosas son utilizados en los procesos de creación de energía. Es decir, productos como el NADPH y ribosa-5-fosfato, utilizados en la síntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos respectivamente, no eran primordiales al encontrarse expuesto el organismo al agente contaminante. Así, la glucosa fue aprovechada para otras rutas como la glucólisis, que se encarga de proveer energía al organismo (Stryer, 1998), ya que *M. californianus*, al estar en estado de alerta por el agente dispersante, tendió a dar prioridad a su supervivencia.

Para los organismos expuestos a la mayor concentración (800 ppm), no se observó efecto en ninguno de los tres tejidos de este experimento (manto, gonadas y hepatopáncreas), esto se debió posiblemente a que los organismos se aislaron del medio al cerrar sus valvas, lo que provocó su muerte antes de finalizar el experimento. La falta de efecto sugiere que el organismo se vio

afectado por el dispersante, el cual posiblemente provocó daño fisiológico que lo llevó a la muerte en un corto tiempo, como lo encontrado por Scarlett et al.(2005) al exponer a *M. edulis* al dispersante Corexit 9527; así, Nokomis 3-F4 no tuvo tiempo de causar efecto sobre la actividad de la G6PDH, la que interactúa en la vía de las pentosas.

El ensayo definitivo de toxicidad aguda se realizó a finales del mes de octubre, época en la cual el organismo posiblemente se encontraba preparándose para el desove que lleva a cabo en invierno (Santiago y Roja, 1982; Chi y García, 1984). Para llevar a cabo el desove, el organismo se prepara utilizando su glucógeno de reserva para la creación de sus gametos, los cuales son resguardados en las gónadas, aumentando así el contenido de lípidos en ellas (Livingstone, 1981). Debido a esto, *M. californianus* posiblemente presentaba una mayor estabilidad en el contenido de lípidos de dicho tejido, lo que provocó una afinidad mayor por parte del dispersante hacia éste. Por esta razón, se observó un efecto sobre las gónadas del organismo a una menor concentración de dispersante (150 ppm) que la concentración a la que se observó efecto en las gónadas de los organismos expuestos en el ensayo preliminar, el cual ocurrió a 400 ppm.

Los efectos observados para la actividad enzimática, sugieren que *M. californianus* es capaz de recuperarse del impacto del dispersante Nokomis 3-F4 sobre la G6PDH. Estos resultados muestran una mínima actividad a la concentración de 150 ppm (C3), la cual se mantiene parecida hasta la

concentración de 300 ppm (C5); sin embargo, en la mayor concentración de este experimento 400 ppm (C6), el organismo se recuperó. La disminución de la actividad enzimática que se observa en la concentración C3 (Fig.10) podría deberse a que *M. californianus* se encontraba en el principio de un desbalance celular provocado por la exposición al dispersante. El organismo, al encontrarse expuesto a un ambiente hostil, pudo haber entrado en un desbalance celular el cual provocó una disminución en la actividad de la enzima, al mismo tiempo que utilizó su energía en otras rutas. En una situación de este tipo, el NADPH no es requerido por el organismo, por lo que la producción de la vía de pentosas disminuye. Así, el organismo utiliza la glucosa que es requerida por la vía de pentosas, en rutas que permiten la supervivencia del organismo y recuperación del desbalance celular. Por otra parte, la recuperación que se presentó a los 400 ppm (C6) se puede atribuir a que el organismo tiende a recuperarse del desbalance celular a partir de la concentración C3. A partir de esta concentración el organismo comenzó a destoxificarse del dispersante, lo que provocó que la vía de pentosas incrementara su actividad, aumentando los niveles de NADPH. Molécula necesaria para la reducción del glutatión, el cual se encarga de reducir las especies reactivas al oxígeno (ROS), las cuales se producen al exponer al organismo a agentes xenobióticos. Así, el aumento en la actividad de la G6PDH fue para producir NADPH utilizado en procesos como la biotransformación de agentes xenobióticos con el fin de eliminarlos del

organismo ó bien para utilizar el NADPH como agente reductor en defensa contra el estrés oxidativo (Biagiotti et al., 2000).

El valor de CL_{50} obtenido para *M.californianus* expuesto durante 120 horas al dispersante Nokomis 3-F4 encontrado fue de 70.96 ppm. Al realizar la comparación con los obtenidos por diversos autores, se observó que Nokomis 3-F4 posee una menor letalidad sobre *M.californianus* comparado con otras especies. Mckee (1991) al exponer al pez *Menidia beryllina* y al crustáceo *Americamysis bahía* a Nokomis 3-F4 durante 96 h, obtuvo una CL_{50} de 29.8 y 32.2 ppm respectivamente, mostrando así el dispersante una mayor letalidad sobre estos organismos. Incluso al exponer a *Fundulus heteroclitus* durante 96 h y a *Artemia salina* a 48 h a este mismo dispersante, Mckee (1991) obtuvo valores de CL_{50} menores, siendo éstos de 65.7 y 68.8 ppm respectivamente. Por otra parte, en estudios realizados recientemente por Hemmer et al. (2010) en *M.beryllina* y *A.bahia* se reportan valores de CL_{50} de 19 ppm a 96 h para *M.beryllina* y de 42 ppm a 48 h para *A.bahia*. Estas comparaciones muestran que Nokomis 3-F4 tiene un efecto menor sobre *M. californianus* comparado con otras especies marinas, a pesar de que *M. californianus* es una especie que presenta mayor riesgo de ser afectada por agentes xenóbioticos presentes en su medio, por ser una especie sésil y filtradora (Gagné et al., 2007). Aunque el valor de CL_{50} indica baja toxicidad sobre *M. californianus* es necesario realizar más experimentos sobre otras especies, con el fin de ampliar el conocimiento de los efectos que Nokomis 3-F4 muestra, para así saber a qué

concentraciones es óptimo utilizar el dispersante en una derrama de hidrocarburos.

En lo que respecta al ensayo de toxicidad crónica, se encontró una disminución significativa en la actividad enzimática de la G6PDH en todos los tejidos (manto, gónadas, hepatopáncreas y branquias) de *M.californianus* al encontrarse expuesto al dispersante. Este resultado era de esperarse ya que el organismo al estar expuesto por un periodo de 90 días realizó una filtración constante, provocando un efecto similar sobre los cuatro tejidos.

El hepatopáncreas, gónadas y branquias del organismo, mostraron un decremento en la actividad de la enzima G6PDH al exponerlo a CL₂ (1.29 ppm) y CL₁₀ (12.9 ppm). En lo que respecta al tejido del manto se encontró una disminución únicamente en la concentración mayor ó CL₁₀, mostrando que posee menor sensibilidad a Nokomis 3-F4 que los otros tres tejidos. Por otra parte, el hepatopáncreas fue el único tejido que se recuperó a la concentración de 12.9 ppm (Fig.12), mostrando así, que tiene la capacidad de enfrentar el efecto del dispersante mediante mecanismos que le permiten contrarrestar el daño.

La disminución en la actividad enzimática en branquias, gónadas, hepatopáncreas y manto de este ensayo, puede deberse a que el organismo, al estar expuesto crónicamente en un ambiente contaminado, realizó un cambio en su metabolismo dando prioridad a la producción de energía. Se sabe que los organismos utilizan el NADPH, producto de la vía de pentosas para la síntesis

de ácidos grasos, los que posteriormente pueden ser utilizados para producir energía por medio de su degradación mediante la β -oxidación. A partir de éste proceso se genera acetil CoA, el cual es utilizado en el ciclo de Krebs que promueve la producción de NADH y ATP (Stryer, 1998). Al disminuir la actividad de la vía de pentosas y aumentar la β oxidación, el organismo produce más acetil CoA, NADH, y ATP, metabolitos de suma importancia en procesos encargados de proveer energía. La disminución en la actividad de la G6PDH, sugiere que los mecanismos asociados a la obtención de energía de *M. californianus* están siendo activados. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Gagné *et al.* (2007), quienes observaron una disminución en la actividad de la G6PDH de las gónadas de mejillones de agua dulce (*Elliptio complanata*) expuestos a un efluente urbano durante 90 días. Ellos al igual que esta investigación atribuyeron esta disminución, a que el organismo cambió sus prioridades dando una mayor importancia a la generación de energía.

La recuperación que se observa en la actividad enzimática del hepatopáncreas expuesto a 12.9 ppm (Fig. 12), puede deberse a que el organismo comenzó a incrementar los productos de la vía de pentosas. Como resultado, produjo una mayor cantidad de NADPH necesario para la reducción del glutatión, el cual es utilizado en defensa contra el estrés oxidativo provocado por Nokomis 3-F4. Esto es apoyado por lo encontrado por Gilfillan *et al.* (1984), quienes observaron un aumento en la actividad de la G6PDH al exponer a *M. edulis* durante cuatro meses a mezclas de petróleo crudo con agua de mar.

Ellos atribuyeron este aumento a la estimulación de la enzima por parte del hidrocarburo debido al estrés generado por el mismo. Por otra parte, este incremento puede deberse también al aumento en la producción de NADPH en apoyo a la biotransformación de los componentes del agente dispersante. Lo anterior fue demostrado por Biagiotti *et al.* (2000), quienes proporcionaron evidencia de que la G6PDH es la enzima reguladora del nivel de NADPH necesario para los procesos de biotransformación de xenobióticos; así como en defensa contra el estrés oxidativo.

Al realizar este estudio se observó que la enzima G6PDH presenta una alta sensibilidad al encontrarse expuesta al dispersante Nokomis 3-F4. Esto confirma que las enzimas pueden ser utilizadas como biomarcadores, lo que hace que sea necesario e importante realizar estudios sobre esta y otras enzimas, para abundar en los efectos metabólicos causados por los agentes xenobióticos en los organismos. La importancia de conocer el comportamiento de la enzima G6PDH en los organismos, radica en el hecho de que puede proveer información valiosa sobre las prioridades energéticas que presenta el organismo al momento de encontrarse expuesto a un agente xenobiótico, así, como información sobre si el organismo es capaz de recuperarse de una exposición utilizando los productos de la vía de pentosas para la biotransformación de xenobiótico o contra el estrés oxidativo provocado por el agente xenobiótico.

VII. CONCLUSIONES

- I. El agente dispersante Nokomis 3-F4 es soluble en agua de mar.
- II. Nokomis 3-F4 provoca una disminución en la actividad enzimática de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a partir de 150 ppm en los tejidos de hepatopaneas, gonadas, branquías y manto de *Mytilus californianus*.
- III. La disminución de la actividad de la G6PDH podría deberse a que el organismo expuesto al dispersante Nokomis 3-F4 reduce la producción de NADPH y envía la glucosa que ingresa hacia la glucólisis para producción de ATP que provee energía al organismo.
- IV. *Mytilus californianus* presenta un comportamiento similar en la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa al encontrarse expuesto a la concentración de 400 ppm y a una exposición continua a una concentración de 12.9 ppm, con una tendencia a recuperar su actividad enzimática.

- V. El aumento de la actividad enzimática de la G6PDH podría ser ocasionada por la síntesis de NADPH el cual puede estar siendo utilizado para los procesos de biotransformación de xenobióticos o bien como defensa contra el estrés oxidativo.
- VI. El hepatopáncreas mostró ser el tejido más sensible a la exposición del agente dispersante Nokomis 3-F4.
- VII. El valor de 120-CL₅₀ para Nokomis 3-F4 sobre *Mytilus californianus* es de 70.96 ppm.
- VIII. La respuesta de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en *Mytilus californianus* al exponerse al dispersante Nokomis 3-F4 indican que la enzima es apta para utilizarla como biomarcador en estudios de exposición de dicho dispersante.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, R. T. and S. P. Dance (1982). Compendium of seashells. Dutton. 912 pp.
- Babay, P.A., Getta, R.T., Silva, M.F., Thiel B. and D.A., Batiston (2006). Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1116: 277-285.
- Baqueiro, C.E., Borabe, L., Goldaracena, I.C. y Rodríguez, N.J. (2007). Los moluscos y la contaminación. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78.
- Bennett, R. and H.I, Nakada (1968). Comparative carbohydrate metabolism of marine mollusks. I. The intermediary metabolism of *Mytilus californianus* and *Haliotis rufescens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 24B: 287-789.
- Biagiotti, E., Bosch, K.S., Ninfali, P., Frederiks, W.M. and C.J., Van Noorden (2000). Posttranslational regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in tongue epithelium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48:971–977.
- Briceno, J., McKee, W.J., Clark, J.M. and D.D., Whiting (1992). *Relative sensitivity of Gulf of Mexico species and national test species in acute toxicity tests with dispersants. Poster presentation.* Paper presented at the Thirteenth Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). SETAC, North America, Pensacola, Florida.
- Chi Barragan, G y F.A. García Pamanes. (1984). Estudios preliminares sobre la biología, ecología y explotación comercial de *M. californianus* en Baja

Californi . Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas, UABC, Ensenada, México

Durkina, V.B. and Z.S., Evtuchenko (1991). Change in activity of certain enzymes in sea urchin embryos and larvae after exposure of adult organisms to heavy metals. *Marine Ecology Progress Series*, 72: 111-115.

Fernández-Méndez, E. y J., Aldeco-Ramírez (1981). Estudio de algunos parámetros hidrológicos en una zona costera del Ejido Eréndira, B.C. Tesis Profesional, Escuela Superior de Ciencias Marinas, UABC, Ensenada, México.

Gabbott, P.A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. In: H. Barnes (Editor), *Proceedings of the Nineteenth European Marine Biology Symposium*. Oban, Scotland. 191-211 pp.

Gabbott, P.A. and J.H., Head (1980). Seasonal changes in the specific activities of the pentose phosphate pathway enzymes, G6PDH and 6PGDH and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the bivalves *Mytilus edulis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 66: 279-284.

Gabbott, P.A. (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marines molluscs In: The mollusca. Vol 2. Environmental biochemistry and physiology. *Academies Press, New York*.

- Gagné, F., Gagnon, C., Turcotte, P. and C., Blaise, (2007). Changes in metallothionein levels in freshwater mussels exposed to urban wastewaters: Effects from exposure to heavy metal? *Biomarker Insights*. 2: 107-116.
- García, M.L., Abad, M., Sanchez, J.L. and A., Garza (1984). Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 79B: 599-606.
- García, F.M., Alonso, D.J., Loira, T.L., y R.M., Melgar (2007). Contenido de mercurio en conservas de mejillones berbechos y navajas comercializadoras en Galicia (España). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 5(5): 379-383.
- George A. A. and J. R., Clark (2000). Aquatic toxicity of two Corexit dispersants. *Chemosphere* 40: 897-906.
- Gilfillan, E.S., Page, D.S., Hanson, S.A., Foster, J., Hotham, J., Vallas, D. and R., Gerber (1984). Effects of test spills of chemically dispersed and nondispersed oil on the activity of aspartate amino-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in two intertidal bivalves, *Mya arenaria* and *Mytilus edulis*. *Oil spill and chemical dispersants : research, experience and recommendations*. 299-313pp.
- Gilfillan, E.S., Page, D.S., Vallas, D., Gonzales, L., Pendergast E. and J.C., Foster (1985). Relationship between glucose-6-phosphate dehydrogenase

and aspartate aminotransferase activities, scope for growth and body burden of Ag, Cd, Cu, Cr and Zn in populations of *Mytilus edulis* from a polluted estuary. *Marine pollution and physiology: recent advance*. 13:107-124.

Guerra-Rivas, G. (2003). Biocatalizadores y biomarcadores moleculares de organismos marinos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 177 pp.

Gutiérrez, M.C. y M., Crespi (1991). Distribución de oligómeros en nonilfenoles oxietilenados . Boletín Intexter . N° 99.

Hahn, M.E. (1994). Using biomarkers to detect contamination of the marine environment. *Inovati Technology Northeast Sea Grant.-archives*.

Hemmer, M.J., Barron, M.G. and R.M., Greene. (2010). Comparative toxicity of eight oil dispersant products on two Gulf of Mexico aquatic test species. *United States Environmental Protection Agency Dispersant Toxicity Testing*. 11pp.

Johnston, D.J., C.G. Alexander and D. Yellowhees (1998). Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *Journal of crustacean biology*.18:271-278.

Judson, R.S., Martin, M.T., Reif, D.M., Houck, K.A., Xia, M., Sakamuru, S., Huang, R., Shinn, P., Austin, C.P., Kavlock, R.J. and D.J.,Dix. (2010). Analysis of eight oil spill dispersants using rapid, *in vitro* test for endocrine

and other biological activity. *Environmental Science and Technology*. 44: 5979–5985.

Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K. and E., Casillas (2003). Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 43–53

Livingstone, D.R. (1981). Induction of enzymes as a mechanism for the seasonal control of metabolism in marine vertebrates: glucose-6-phosphate dehydrogenases from the mantle and hepatopancreas of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 69B: 147- 156.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M, Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D. and R.K., Pipe (2000). Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environmental Pollution*.13: 56–91.

Lohr, G. W. y H.D. Waller. (1974). Methods of enzymatic analysis. 2nd edition. Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press, N.Y. pp. 636-643.

Loosanoff, V. L. (1962). Effects of turbidity on some larval and adult bivalves. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 14:80–95.

- Lowry, O.H., Rosenberg, J., Farr, A. L. and R. J., Randall (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193:265-275.
- Mageau, C., Engelhardt, F.R., Gilfillan, E.S. and P.D., Boehm (1987). Effects of Short-Term Exposure to Dispersed Oil in Arctic Invertebrates. *The Arctic Institute of North America*. 40:162-171.
- Mckee, J. and D., Johnson (1991). Acute, definitive, toxicology test with the material NOKOMIS 3-F4 using the Mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Florida Department of Health and Rehabilitative Services*.
- OSPAR, (2004). Nonylphenol/nonylphenoethoxylates, OSPAR Priority Substances Series, OSPAR Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic, OSPAR Commission, London ISBN 0-946956-79-0:18 pp.
- Pankaja, N. (2009). Biochemistry. McGraw-Hill. New York.708 pp.
- Peakall, D.B. (1992). The role of biomarkers in environmental assessment. In Depledge: MH, Sanders B. *Animal Biomarkers as Pollution Indicator*. Chapman and Hallm New York, NY, USA. 201-226 pp.
- Rand, G.M. and S.R.,Petrocelli (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation. New York. 670pp.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., and M., Marín (2008). Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus*

aestuarii) with particular emphasis on vitellogenin induction. *Marine pollution bulletin*. 57:365-372.

Rodriguez, S. S., Eguiraun, A. and M., Freire (1980). Properties of the regulatory cofactor of the pentose phosphate pathway in mussel hepatopancreas (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 65B: 579-581.

Ruiz, M.Y., Suárez A.P. y F., San Juan (2007). Glucógeno sintasa del tejido del manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk, 1819. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 23:1-4.

Santiago, B.R. y P., Rojas (1982). Determinación del ciclo reproductivo del mejillón *Mytilus californianus* en el Ejido Eréndira, B.C. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California. 46 pp.

Scarlett, A., Galloway, T.S., Canty, M., Smith, E.L., Nilsson, J. and S.J., Rowland. (2005). Comparative Toxicity of Two Oil Dispersants, Superdispersant-25 and Corexit 9527, To a Range of Coastal Species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1219-1227.

Scarlett, A., Rowland, J.S, Galloway, S.T., Lewis, C.A. and M.A., Booth (2008). Chronic sublethal effects associated with branched alkylbenzenes bioaccumulated by mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27:561-567.

- Singer, M.M., Smalheer, D.L. and R.L., Tjeerdema (1990). Toxicity of an oil dispersant to the early life stage of four California marine species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:1387-1395.
- Singer, M.M., Smalheer, L.D. and S.R., Tjeerdema (1991). Effects of skipped exposure to an oil dispersant on the early life stages of four marine species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10: 1367-1374.
- Singer, M.M., George, S., Benner, D., Jacobson, S., Tjeerdema, R.S. and M.L., Sowby (1993). Comparative toxicity of two oil dispersants to the early life stages of two marine species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1855-1863.
- Stryer, L. (1998). Bioquímica. Ed. Reverté, 4^{ta} Edición, España. 1010 pp.
- The National Academies Press (2005) Oil spill dispersants efficacy and effects. Washington D.C. 400 p.
- Tian, W., Braunstein, L., Pang, J., Stuhlmeier, K., Tian, X.Q. and R., Stanton (1998) Importance of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity for Cell Growth. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:10609-10617.
- Winzer, K., Van Noorden, C. F. and A. Köhler (2002), Glucose-6-phosphate dehydrogenase: the key to sex-related xenobiotic toxicity in hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.?). *Aquatic toxicology* 56: 275-288.
- Wood, T. (1985). The Pentose Phosphate Pathway. Academic Press. Orlando FL.

Yamada, S.B. (1989). *Mytilus californianus* a new aquaculture species.
Aquaculture. 81: 275-284.

Zar, J.H. (1999). Biostatistical Analysis. Prentice Hall, 4th edition, New Jersey. 663
pp.

REFERENCIAS EN RED

1.- <http://www.epa.gov/oem/content/ncp/products/nokomis.htm>