

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



Evaluación del dispersante de petróleo NOKOMIS 3-F4 como disruptor endócrino en *Mytilus californianus*.

Tesis profesional que para obtener el título de  
BIOLOGO presenta:

Ana Gabriela Flores López

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Evaluación del dispersante de petróleo NOKOMIS 3-F4  
como disruptor endócrino en *Mytilus californianus*.

**Tesis Profesional que presenta:**

Ana Gabriela Flores López

Aprobado por:

Dra. Graciela Guerra Rivas

Presidente del Jurado

(Directora de Tesis)

Dra. Evarista Arellano García

(Sinodal propietario)

M.C. Bernardino Ricardo Eaton

(Secretario)

## **AGRADECIMIENTOS**

A los mejillones que murieron para la realización de esta investigación, gracias.

A mi familia, por su eterno apoyo, e *input* científico en nuestras pláticas.

A la Dra. Graciela Guerra por aceptarme como tesista y guiarme.

Al Laboratorio de Farmacología Marina, por permitirme realizar el proyecto de investigación, y a todos sus integrantes. A los prestadores de Servicio Social que apoyaron al proyecto, sobre todo a María Cruces.

Al Dr. Stephano y Dr. Faustino por prestarme equipo necesario para completar mis experimentos.

A Dzoara.

Presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología.  
Ensenada, Baja California, México. 16 de Febrero 2012 .

## **Evaluación del dispersante de petróleo NOKOMIS 3-F4 como disruptor endócrino en *Mytilus californianus*.**

Se evaluó el efecto del dispersante NOKOMIS 3-F4 (NOK) como disruptor endócrino en el mejillón *Mytilus californianus*, mediante la estimación de la inducción de proteínas tipo VTG (vitelogeninas, vitelinas) en tres tejidos: gónada, hepatopáncreas y hemolinfa. Para ello, se realizaron dos pruebas de toxicidad aguda y una de toxicidad crónica. Grupos de organismos *M. californianus* se expusieron a varios agentes, incluyendo el dispersante y un xenoestrógeno caracterizado, el 4-Nonilfenol (NP), que se utilizó como control positivo; además, en todos los ensayos se usó un control negativo consistente en un grupo de organismos en agua de mar. La prueba aguda preliminar duró 96 h y se manejaron 3 concentraciones de dispersante (50 ppm, 150 ppm, 300 ppm) además del control positivo (NP), el control negativo (agua de mar) y otro grupo control negativo, expuesto al disolvente. La exposición aguda definitiva duró 96 h, tres concentraciones de NOK (5 ppm, 10 ppm, 30 ppm), un grupo con NP y otro expuesto a solvente. La exposición crónica tuvo una duración de 240 h, con dos grupos de exposición al dispersante (5 ppm y 10 ppm), un grupo de exposición a NP y un grupo control. Se analizaron los tejidos para determinar proteínas VTG en gónada, hepatopáncreas y hemolinfa por medio del ensayo de fosfatos lábiles álcali (ALP). Se obtuvo un valor de 76.75 mg/L para CL<sub>50</sub> de 96 h, lo cual sugiere que *M. californianus* es más sensible a NOK que *Menidia* sp. pero más resistente que *Mysidopsis* sp. Se observó un aumento en proteínas VTG en machos expuestos durante los estadios tempranos de la gametogénesis y en hembras expuestas durante los estadios medios de la gametogénesis. Los organismos expuestos durante los estadios tardíos no mostraron inducción de la vitelogenina. Para hemolinfa, los valores obtenidos mostraron que ésta no es un tejido apropiado para la detección de proteínas tipo (VTG) debido a la baja concentración encontrada. Los resultados sugieren una susceptibilidad de *M. californianus* a NOK como disruptor endócrino a ciertos estadios de la gametogénesis.

**Palabras clave:** *Mytilus californianus*, disrupción endócrina, vitelogeninas, 4-Nonilfenol, NOKOMIS 3-F4.

Resumen aprobado:

Dra. Graciela Guerra Rivas  
(Directora de Tesis)

M. en C. Bernardino Ricardo Eaton González  
(Codirector de Tesis)

ABSTRACT of the thesis presented by Ana Gabriela Flores López

As a partial requirement to obtain the Bachelor degree in Biology. Ensenada, Baja California, México. February 16<sup>th</sup> 2012 .

## **Evaluation of the oil spill dispersant NOKOMIS 3-F4 as an endocrine disruptor in *Mytilus californianus***

The effect of the oil spill dispersant NOKOMIS 3-F4 (NOK) as an endocrine disruptor on *Mytilus californianus* was elucidated with the quantification of VTG like proteins (vitellins, vitellogenins) on three types of sample: gonad, digestive gland and hemolymph. Three exposure bioassays on *M. californianus* to the commercial oil spill dispersant were made. For the acute preliminary assay, organisms were exposed for 96 hours to 3 concentrations (50 ppm, 150 ppm, 300 ppm), a group was exposed to 4-nonylphenol (NP), a known xenoestrogen, another group was exposed to the equivalent solvent concentration used to dissolve NP, for each assay a control group was used. The acute definitive exposure assay was made with three NOK concentrations (5 ppm, 10 ppm, 30 ppm) and lasted for 96 hours, a group was exposed to NP and another to the equivalent solvent concentration. The chronic exposure lasted 240 hours and two concentrations of the dispersant were used (5 ppm, 10 ppm), a group was exposed to NP, and another group to equivalent acetonitrile concentration. Tissue and samples from female and male organisms were analyzed separately to determine VTG levels by the *Alkaline-Labile Phosphate* assay (ALP). The dispersant's LC<sub>50</sub> value was calculated for 96 hours as 76.75 mg/L, compared to *Menidia sp.*, *M. californianus* is slightly more sensible to NOKOMIS 3-F4 but more resistant than *Mysidopsis sp.* Levels of VTG- like proteins were significantly higher in male organisms exposed on the first stages of gametogenesis. Females exposed during the peak stages of gametogenesis had significantly higher levels of VTG like proteins. Organisms exposed at the end of gametogenesis were not shown to have higher levels of VTG like proteins. Hemolymph was not suitable for ALP analysis, given the low levels of VTG that were found in this kind of sample. Data suggests a susceptibility of *M. californianus* to endocrine disruption by exposure to NOKOMIS 3-F4 at certain stages of gametogenesis.

**Keywords:** *Mytilus californianus*, endocrine disruption, vitellogenin, 4-nonylphenol, NOKOMIS 3-F4.

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
III. OBJETIVOS	17
IV. METODOLOGÍA	18
IV.2. Colecta de Organismos ( <i>Mytilus californianus</i> )	20
IV.3. Acondicionamiento de <i>Mytilus californianus</i> al laboratorio.	21
IV.4. Pruebas de toxicidad	22
IV.4.1. Prueba de toxicidad aguda preliminar.	22
IV.4.2. Prueba de toxicidad aguda definitiva	24
IV.4.3. Prueba de toxicidad crónica	24
IV.5. Disección, obtención de tejido y sexado	25
IV.6. Cuantificación de vitelogeninas	27
IV.6.1. Obtención de la fracción de fosfatos lábiles a la alcalinidad (ALP) (Ortiz-Zaragoitia y Cajaraville, 2006)	27
IV. 6.2. Medición del contenido de fosfato.	28
IV.7. Medición de proteínas (Lowry, 1951)	28
IV.8. Análisis estadístico	29
V. RESULTADOS	30
V.1. Pruebas de Toxicidad	30
V.1.1 Prueba de toxicidad aguda preliminar	30
V.1.2 Prueba de toxicidad aguda definitiva	31
V.1.2.1. ALP en gónada.	31

**(Continuación)**

V.1.2.2. ALP en hepatopáncreas.	32
V.1.2.3. Determinación del valor de CL <sub>50</sub> .	33
V.1.3. Prueba de toxicidad crónica	35
V.1.3.1. ALP en gónada	35
V.1.3.2. ALP en hepatopáncreas	36
V.1.3.3. ALP en hemolinfa	37
VI. DISCUSIÓN	38
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA	54

## LISTA DE FIGURAS

## Página

### Figura

- Figura 1. Diagrama de flujo que enlista las actividades realizadas durante la fase experimental de la investigación. 19
- Figura 2. *Mytilus californianus* en el Ejido Eréndira, playa de Punta San Ysidro 21
- Figura. 3. Especímenes de *Mytilus californianus* en recipientes de exposición durante una prueba de toxicidad. Cada frasco contó con 3 organismos y se manejaron 3 frascos por grupo de exposición. Los frascos fueron cubiertos con plástico para evitar la contaminación entre los grupos expuestos y los no expuestos 23
- Figura 4. Frotis de gónada de *M. californianus* a 400 X. (a) espermatozoides , (b) ovocitos. 25
- Figura 5. Toma de muestra de hemolinfa de *Mytilus californianus*. Para el ensayo de toxicidad crónica se obtuvo hemolinfa del músculo aductor posterior, con el fin de realizar la cuantificación de vitelogeninas mediante la cuantificación de fosfatos por el ensayo ALP. 26
- Figura 6. Anatomía de *Mytilus californianus* disectado. De los organismos sometidos a las pruebas de toxicidad, se obtuvo para su análisis, gónada, hepatopáncreas y hemolinfa, colectada del músculo aductor posterior. 27
- Figura 7. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónadas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda preliminar. Se muestran valores de los grupos: NOKOMIS 3-F4 (50 ppm), 4-nonilfenol (NP-4, control positivo), así como un grupo expuesto al solvente de NP-4 y un grupo control en agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. El asterisco señala diferencia significativa del grupo marcado con respecto al grupo control (Prueba Dunnet). 30
- Figura 8. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónadas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda definitiva.

(Continuación)

Se muestran valores de los grupos expuestos a tres concentraciones del dispersante de mar y un grupo control sin xenobióticos, sumergidos en agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet). 31

Figura 9. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda definitiva. Se muestran valores de los grupos expuestos a tres concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, sumergidos en agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet). 32

Figura10. Gráfica Probit para la Concentración Letal 50 (LC<sub>50</sub>) a 96 horas de NOKOMIS 3-F4 para *Mytilus californianus*. 34

Figura 11. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónada de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet). 35

Figura 12. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet). 36

**(Continuación)**

Figura 13. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hemolinfa de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. (Prueba de Dunnet).

37

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Organismos vivos a las horas de exposición durante la intoxicación aguda preliminar de <i>Mytilus californianus</i> con NOKOMIS 3-F4 en un ensayo de 96 horas.	33
Tabla II. Valores Probit por porcentaje de muerte en organismos expuestos a NOKOMIS 3-F4.	34

## **I. INTRODUCCIÓN**

La sociedad en la que vivimos actualmente basa la mayoría de sus actividades en el uso de hidrocarburos, especialmente en el petróleo. En consecuencia, resulta necesario extraer petróleo, almacenarlo y transportarlo, usualmente en grandes cantidades. Con frecuencia estas acciones y la negligencia suelen conducir a los derrames de hidrocarburos al medio ambiente, que representan una amenaza para los recursos naturales, la biodiversidad y la salud humana.

Los dispersantes de hidrocarburos son utilizados en medios acuáticos como una estrategia de remediación para neutralizar y combatir los derrames de petróleo. En tales casos, el detergente (compuesto activo de los dispersantes) favorece la formación de micro micelas de las fracciones hidrofóbicas del petróleo, lo que ocasiona una disminución de la tensión de fases entre el petróleo y el agua. Esto permite la biodisponibilidad del hidrocarburo para la biodegradación bacteriana (biorremediación) y el asentamiento del petróleo.

Los agentes dispersantes de hidrocarburos son de suma importancia en la protección de las aves marinas al evitar que el petróleo se adhiera a sus plumas. Además, los detergentes protegen a los mamíferos marinos que suben constantemente a la

superficie a respirar y están en contacto directo con las capas flotantes del petróleo. Los agentes dispersantes también protegen ecosistemas como los humedales, playas y costas, que además de ser sitios turísticos y zonas donde las poblaciones humanas realizan actividades diarias, son espacios de filtración de agua y barreras de protección contra huracanes.

Sin embargo, a pesar de los beneficios que presenta el producto, cuenta con desventajas: al ocurrir el hundimiento del petróleo, se afectan a ecosistemas del fondo marino como los arrecifes de coral, los cuales son de gran importancia para la industria pesquera, siendo este tipo de hábitat donde muchas de las especies de importancia comercial se desarrollan. Al ser convertidos en micelas, los hidrocarburos se vuelven más biodisponibles para la fauna bentónica y los organismos que habitan la columna de agua, los ecosistemas bentónicos suelen tener metabolismos más lentos, por lo que podrían tardar más en recuperarse del impacto por la exposición a hidrocarburos. A lo largo de los años, los grupos ambientalistas perciben estos productos como una salida fácil para las compañías petroleras; los dispersantes son vistos como una sustancia química que hunde y dispersa el derrame, de manera que el problema se vuelve menos visible, el ecosistema protegido es el mangle pero el perjudicado son los arrecifes de coral y el bentos.

Durante el derrame de petróleo de 2010 en el Golfo de México, por la plataforma *Deep Water Horizon*, las ventajas y desventajas de la aplicación de dispersantes a la mancha fueron ampliamente discutidas por ambientalistas, científicos, funcionarios de gobierno y demás personas involucradas, ya que la decisión de aplicar dispersantes en

este caso, se realizó con la intención de preservar los humedales que se encuentran en las costas, las áreas turísticas, y además, proteger a las aves y mamíferos marinos (Lovett, 2010).

La introducción de productos químicos que actúan como agentes dispersantes al medio ambiente se debe llevar a cabo con suma precaución, especialmente si se trata de compuestos cuyos efectos en organismos centinelas no se han investigado. La evaluación del uso de estos productos comienza con la determinación de su toxicidad bajo condiciones estandarizadas (Singer *et al.*, 1995). Una forma de determinar el efecto que tiene un agente sobre un organismo es el monitoreo de biomarcadores. Los biomarcadores son respuestas de los organismos, ya sea a nivel molecular, bioquímico o celular, en poblaciones silvestres en hábitats contaminados o en condiciones de laboratorio que indican si el organismo ha estado expuesto a un agente exógeno, denominado xenobiótico (McCarthy y Shugart, 1990).

La medición de biomarcadores es un tipo de herramienta que resulta de utilidad en el estudio del potencial tóxico de un producto comercial, por medio de análisis de biomarcadores en modelos experimentales. El uso de biomarcadores como indicadores de un impacto ambiental o toxicidad son de gran valor para la evaluación de riesgos, resulta pertinente evaluar la toxicidad, con biomarcadores de toxicidad, para cualquier producto que se aplicará al medio ambiente, antes de su uso.

Los agentes tóxicos se clasifican con base en el efecto que ejercen en un organismo. De acuerdo con Goksøyr (2006), un disruptor endócrino puede actuar a través de tres posibles mecanismos:

- Imitando a alguna hormona (funcionando como agonista o antagonista)
- Como disruptor de la producción, metabolismo o transporte de alguna hormona.
- Como disruptor en la producción o la síntesis de algún receptor hormonal.

Los disruptores endócrinos son compuestos que alteran el balance hormonal de un organismo. Algunos disruptores endócrinos pueden tener consecuencias en la viabilidad reproductiva de una población, ya que su efecto puede presentarse incluso a concentraciones tan bajas como partes por billón ó partes por trillón (Campbell *et al.*, 2006) del xenobiótico (Daston *et al.*, 2003).

La presencia de agentes tóxicos en el ambiente (xenobióticos) genera respuestas en los organismos, que pueden manifestarse como muerte en el caso de intoxicaciones agudas; o bien, expresarse en efectos subletales, causados por intoxicaciones crónicas. Los efectos agudos, que son evaluados mediante el valor de  $CL_{50}$  (concentración del tóxico que causa la muerte del 50 % de los organismos en una muestra) son de utilidad para conocer los efectos sobre una población expuesta a altas concentraciones de tóxico durante períodos cortos. Por otra parte, los efectos subletales se evalúan mediante biomarcadores y los organismos se someten a periodos largos de exposición. Los efectos subletales son cambios detectables y cuantificables, que ocurren a nivel molecular, celular

o fisiológico y que a pesar de no ocasionar la muerte, afectan fisiológicamente el desempeño de las especies agredidas (Hutchinson *et al.*, 2006).

La modificación de los niveles de vitelogenina, o proteínas tipo VTG, es un ejemplo de un biomarcador para disruptores endócrinos. Las proteínas tipo VTG son un grupo de moléculas precursoras del vitelo y los cambios en sus niveles son utilizados como indicadores de la presencia de xenobióticos que actúan como EDC (Disruptores endócrinos; del inglés *Endocrine Disruptive Compound*). Algunos EDC son estrogénicos, sobre todo en peces macho. En los peces, los machos cuentan con el gen codificante para VTG, pero no expresan la proteína normalmente, aunque sí lo hacen cuando están expuestos a xenoestrógenos (disruptores endócrinos que imitan al estrógeno). Las vitelogeninas son glico-lipofosfoproteínas. Éstas son componentes importantes del vitelo y son utilizadas por los embriones de molusco como una fuente de energía (Gagné *et al.*, 2002). En los moluscos la vitelogénesis está regulada por neuropéptidos en combinación con estrógenos (Puinean *et al.*, 2006), por lo que se esperaría una respuesta en la producción de vitelo ante un antagonista de estrógenos. Esto permite utilizar los niveles de vitelogenina en moluscos y crustáceos como indicadores de xenoestrógenos (Hutchinson *et al.*, 2006).

Algunos surfactantes basan su efectividad en los derivados del 4-nonilfenol (NP), el cual es usado en la fabricación de etóxidos de nonilfenol (NPE, por sus siglas en inglés, nonyl phenol etoxide) que son detergentes no iónicos. Se ha demostrado que ambos compuestos, tanto NP como NPE, son xenoestrógenos. Éstos se unen al receptor del

estrógeno e imitan a la hormona que induce al organismo al desove (Ricciardi *et al.*, 2008). El NP es una molécula de naturaleza lipofílica, por lo que la bioacumulación del compuesto o sus metabolitos en tejidos es alta: en particular, el proceso de acumulación tiene una tasa más alta en mejillones que en otras especies (Ricciardi *et al.*, 2008).

*Mytilus californianus* pertenece a la clase de los bivalvos, los cuales han sido ampliamente utilizados en estudios de impacto ambiental basados en el monitoreo de algún biomarcador (Porte *et al.*, 2006; Schiedek *et al.*, 2006; citado por Ricciardi *et al.*, 2008). Es importante señalar que siendo los mejillones un grupo de gran consumo humano, su exposición a los agentes dispersantes confiere un potencial de riesgo para la salud humana por el proceso de biomagnificación.

El propósito del presente trabajo fue el de evaluar el potencial del agente dispersante de hidrocarburos NOKOMIS 3-F4 como disruptor endócrino en la especie de mejillón *Mytilus californianus*. NOKOMIS 3-F4 es un producto comercial cuyo uso no se ha generalizado, por lo que se realizó el estudio con el propósito de conocer el efecto a nivel laboratorio y establecer las bases para anticipar el efecto que podría tener la aplicación de NOKOMIS 3-F4 sobre *M. californianus* de las costas de Baja California. Hasta el momento, no se han encontrado estudios de disrupción endócrina en esta especie expuesta a NOKOMIS 3-F4, por lo que resulta pertinente el desarrollo de este tema como trabajo de tesis.

## II. ANTECEDENTES

Los dispersantes de hidrocarburos surgieron a partir de los detergentes usados en la limpieza de contenedores de petróleo. El derrame de *Torrey Canyon* en 1967 liberó aproximadamente 1 millón de barriles (1 barril, (bbl) = 158.9 litros) de hidrocarburos en la costa sur de Inglaterra. Esta emergencia impulsó a las autoridades a aplicar 10,000 barriles de varios dispersantes a lo largo de la costa. Investigaciones posteriores mostraron que los componentes tenso activos de los detergentes no se evaporaban, disolvían o mezclaban con el agua de mar, sino que formaban una emulsión estable con el petróleo. Además, se observó que las emulsiones más estables eran producidas por los dispersantes más tóxicos (CETS, 1989), por lo que resultaron ser igual o más tóxicos que el petróleo que dispersaban (Singer *et al.*, 1995).

Tras estos descubrimientos se han desarrollado dispersantes menos agresivos con surfactantes no iónicos y solventes como éter de glicol (Singer *et al.*, 1995). Algunos agentes dispersantes de hidrocarburos han mostrado un grado de toxicidad hacia organismos acuáticos, ejemplos de ellos son los conocidos comercialmente como COREXIT 9500 y COREXIT 9527 (George-Ares y Clark, 1997). Un estudio realizado por *Exxon Biomedical Sciences* encontró que la concentración letal que afecta al 50% de la

población (CL<sub>50</sub>) de COREXIT 9500 y COREXIT 9527 puede tener gran variación en la misma especie dependiendo de la temperatura del agua y el estado embrionario del organismo. Singer y colaboradores reportaron una mayor sensibilidad hacia COREXIT 9554 en organismos en las primeras fases de desarrollo que en adultos (1995).

El derrame de petróleo de la plataforma *Deepwater Horizon* vertió aproximadamente 4.9 millones de barriles de petróleo crudo entre el 20 de abril y el 15 de julio de 2010 al norte del Golfo de México (Robertson y Krauss, 2010). Este incidente es el derrame accidental marino más grande en la historia de la industria del petróleo. El 12 de Julio de 2010 la empresa responsable, *British Petroleum*, declaró haber aplicado 4,000 m<sup>3</sup> de COREXIT 9500A y COREXIT 9527A en la superficie y 3,000 m<sup>3</sup> debajo del agua en la fuente de la fuga del pozo petrolero de la plataforma *Deepwater Horizon* (Cedre, 2010). Esta es la primera vez que se aplican dispersantes bajo agua, ya que el diseño de estos productos es para su aplicación en la superficie. (Cedre, 2010).

Durante la aplicación de los dispersantes surgieron controversias entre el público, científicos, la Agencia estadounidense de Protección Ambiental (US EPA, 2010<sup>a</sup>) (EPA, por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency*) y la empresa *British Petroleum* (BP). En particular, la aplicación de estos surfactantes se dio sin la autorización y recomendación de la EPA, la cual hizo hincapié en la aplicación de dispersantes menos tóxicos para organismos acuáticos (US EPA, 2010<sup>a</sup>) y realizó un estudio de toxicidad con 8 dispersantes comerciales sobre dos especies acuáticas del Golfo de México: *Americamysis bahia* y *Menydia beryllina* (US EPA, 2010<sup>b</sup>). Las exposiciones a estos agentes se dio tanto

con los dispersantes solos como con mezclas de éstos y petróleo crudo de Louisiana. Los resultados del estudio demostraron que para el místico (*Americamysis bahia*) NOKOMIS 3AA resultó ser el más tóxico de los 8 dispersantes. (US EPA, 2010b).

En las últimas dos décadas, se ha incrementado el interés científico y el debate público acerca de los efectos de la exposición a compuestos con potencial de daño endócrino en animales y el hombre. Estos compuestos, denominados disruptores endócrinos o EDC (del inglés *Endocrine Disruptive Compound*), son definidos por la EPA como “aquel agente que interfiere en la síntesis, la secreción, el transporte, la unión o la eliminación de hormonas naturales de un organismo, las cuales tienen funciones en el mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento” (US EPA, 1997). En 1996 la EPA identificó a los EDC’s como uno de los 6 tópicos más importantes y se asignó un comité de investigación sobre *compuestos con potencial de alterar el funcionamiento normal del sistema endócrino* (Foster *et al.*, 2008).

El efecto de los EDC’s en organismos acuáticos es un fenómeno que ha ocasionado la preocupación de organizaciones internacionales como la Unión Europea y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Esto ha propiciado el establecimiento de programas de investigación para el desarrollo de legislaciones y regulaciones del uso de EDC’s (Goksøyr, 2006), ya que la disrupción endócrina presenta un peligro para algunos recursos naturales como las pesquerías y también un riesgo potencial a la salud humana (Daston *et al.*, 2003).

Uno de los temas más controversiales en relación a los disruptores endócrinos es el de la respuesta dosis dependiente, que se define como la correlación entre la dosis y el efecto de un producto químico. Dado que los EDC's actúan imitando componentes del sistema endócrino de un organismo, ya sea un receptor o una hormona, su efecto es usualmente más débil que el del componente endógeno. Por esta razón los efectos reportados a concentraciones bajas del disruptor suelen generar controversia (OMS, 2002). Los efectos adversos de estos compuestos han sido estudiados y reportados en diversos animales que abarcan la mayoría de los *taxa* del reino animal. El tributil estaño y sus derivados (TBT), un biocida utilizado en pinturas para los cascos de barcos, proporciona el ejemplo más claro en disrupción endócrina en invertebrados. La masculinización de gasterópodos hembra expuestos a TBT resultó en un declive de las poblaciones de esta clase (OMS, 2002) y movilizó a la prohibición y regulación de TBT. El mecanismo de acción de este xenobiótico involucra probablemente niveles elevados de andrógenos a través de la actividad alterada de la aromatasa (OMS, 2002).

El sistema endócrino en un organismo vivo juega un papel esencial en la regulación a corto y largo plazo de los procesos metabólicos (OMS, 2002). Cualquier organismo multicelular requiere de mecanismos coordinados además de los que involucran contacto directo entre células. Consecuentemente, todos los *taxa* de invertebrados utilizan las hormonas para el control de procesos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento en general, así como el crecimiento, desarrollo y reproducción en particular (Oehlmann y Schulte- Oehlmann, 2003). Sin embargo, a lo largo de la historia evolutiva, los diferentes

fila han divergido y han diversificado tanto en cuanto a los mecanismos como en las hormonas que utilizan para controlar los diferentes procesos fisiológicos (Oehlmann y Schulte- Oehlmann, 2003).

El sistema endócrino en *Mollusca* puede ser considerado como el sistema hormonal más diverso de los Invertebrados. Difiere entre las varias clases de moluscos y entre algunos grupos de gasterópodos. Los mensajeros químicos en estos organismos pueden ser divididos en dos grupos: mensajeros peptídicos y neurohormonas. El efecto estimulador de las neurohormonas en la maduración sexual de moluscos fue demostrado en *Mytilus edulis* y en *Crassostrea gigas* por Mathieu *et al.* (1991, citado por Ketata *et al.*, 2008). La multiplicación de gametos y la vitelogénesis son activados por neurohormonas, las que también controlan el proceso de desove y almacenamiento de energía (Lubet *et al.*, 1990; Mathieu, 1994, citados por Ketata *et al.*, 2008).

Los moluscos son considerados como un filo que es capaz de sintetizar esteroides de tipo vertebrado *de novo*, los cuales tienen funciones fisiológicas específicas. Sin embargo, no se han descrito a la fecha las enzimas que sintetizan estos esteroides a partir de colesterol en este filo, por lo que el origen endógeno de estos compuestos en *Mollusca* es cuestionable (Ketata *et al.*, 2008), aunque se han reportado enzimas capaces de metabolizar estos esteroides en moluscos (Ketata *et al.*, 2008). Además, para *M. edulis* se ha documentado la presencia de testosterona, estradiol, estrona y otros esteroides en sus tejidos (De Longchamp *et al.*, 1974, citado por Ciocan *et al.*, 2010).

Se ha observado que los niveles de estradiol en bivalvos varían a lo largo del año; estos valores están sincronizados con los diámetros de los ovocitos y el índice gonadal. Consecuentemente, se considera que esta hormona tiene un papel en el ciclo reproductivo y está involucrada en la regulación de ciertos procesos metabólicos vía los receptores de estrógeno como lo es la vitelogénesis (Matsumoto *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 2004; Ciocan, *et al.*, 2010).

El grupo de las vitelogeninas (VTG) constituyen el precursor principal de las vitelinas (proteínas del vitelo), que proporcionan energía para el desarrollo embrionario en organismos ovíparos. Son glico-lipofosfoproteínas de alta densidad (300-700 kDa) con ligandos de Ca y Zn, exhiben características similares en peces (Nagler *et al.*, 1987, citado por Marin y Mattozzo, 2004) y moluscos (Blaise *et al.*, 1999 citado por Marin *et al.*, 2004). La síntesis de estas moléculas ocurre en hembras adultas en presencia de estrógeno endógeno y cuyos niveles suelen ser más bajos en hembras juveniles. En machos, el gen para VTG está presente pero normalmente no se expresa. Sin embargo, puede activarse por xenoestrógenos (estrógenos o moléculas antagonistas al estrógeno que son exógenas al organismo). El órgano responsable de la vitelogénesis es un tema controversial en moluscos. Las observaciones histológicas (Pipe, 1987, citado por Marin y Mattozzo, 2004) sugieren que las VTG se sintetizan dentro de los ovocitos del mejillón *Mytilus edulis*. Estas y otras observaciones que apoyan esta teoría no logran explicar la presencia de proteínas tipo VTG en la hemolinfa de *Mytilus edulis* (Gagné *et al.* 2002), ya que las proteínas no tendrían que ser transportadas si son producidas *in situ*. Considerando las discrepancias

entre los autores previamente mencionadas y la importancia de la presencia de niveles VTG; en el presente trabajo se tomó la decisión de utilizar varios tipos de muestra como material de estudio, para ampliar la probabilidad de detectar cambios en los niveles VTG.

El 17 $\beta$ -estradiol (esteroide de tipo vertebrado) regula la reproducción en muchos invertebrados. La ubicuidad de la producción de esta hormona en el reino animal indica que las enzimas estrogénicamente activas son señales evolutivamente conservadas y sugiere la posibilidad de que todos los animales sean sensibles al estrógeno, ya sea endógeno o exógeno (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). Considerando los efectos que los xenoestrógenos pueden tener en los organismos, el monitoreo de contaminación por disruptores endócrinos cobra gran importancia, ya que se ha reportado, mediante numerosos estudios de impacto ambiental, que este tipo de compuestos es ubicuo, debido tanto a los procesos naturales como las actividades antropogénicas (Golsoyr, 2006)

El 4-nonilfenol ha sido identificado como un xenoestrógeno para peces e invertebrados. Se ha reportado la inducción *in vitro* de proliferación celular y del receptor de progesterona en células humanas MCF7 de tumor mamario sensibles al estrógeno (Soto *et al.*, 1991). Goksøyr (2006) reporta que en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el xenoestrógeno 4-nonilfenol puede actuar de múltiples formas en un organismo: como mímico de estrógeno, como disruptor del metabolismo de los esteroides y como un modulador de los niveles de los receptores de estrógeno. Estos descubrimientos sugieren que el compuesto funciona de forma diferente a diferentes concentraciones.

El producto comercial conocido como NOKOMIS 3-F4, que es el motivo de este estudio, no revela en su etiqueta los componentes de su formulación. Sin embargo la organización no gubernamental Toxipedia hizo de dominio público los componentes del dispersante, siendo 4-nonilfenol precursor de su ingrediente activo (Toxipedia, 2011). En un estudio por Ricciardi y colaboradores (2008), realizado con individuos macho del cangrejo *Carcinus aestuari* e individuos macho y hembra del mejillón *Mytilus galloprovincialis*, se evaluó la inducción de vitelogenina y la bioacumulación de 4-nonilfenol (un metabolito derivado de surfactantes no iónicos tipo polietóxido de nonilfenol) en tejidos (hemolinfa, gónadas y glándulas digestivas para el cangrejo y glándulas digestivas para el mejillón). En ambas especies se encontró una correlación entre la bioacumulación del xenoestrógeno y la concentración de proteínas VTG (Ricciardi *et al.*, 2008).

El 4-nonilfenol es un compuesto que suele encontrarse en concentraciones detectables en efluentes de plantas de tratamiento de agua y puede ser bioacumulado por organismos, sobre todo bivalvos que filtran grandes volúmenes de agua. Giger y sus colaboradores (2009) reportan mayores concentraciones de 4-nonilfenol en efluentes tratados bajo condiciones anaeróbicas que en efluentes bajo condiciones aeróbicas, lo que sugiere que la formación de este compuesto se ve favorecida bajo condiciones anaeróbicas (Giger *et al.*, 1984).

Se han desarrollado muchos ensayos directos e indirectos para medir los niveles de VTG en hígado y plasma de pez y así como en hemolinfa de bivalvos y gónadas. Los

ensayos directos son específicos y son más sensibles que otros métodos; sin embargo, son costosos y requieren de altos niveles de experiencia y tecnología. Entre ellos se cuentan: Ensayo por Inmuno Absorción Enzimática (ELISA), radio-inmunoensayos (RIA), análisis Western Blot, determinación de RNA mensajero de VTG por hibridación de DNA. Aunque se tienen desarrollados anticuerpos específicos para vitelogeninas de peces, esto no es así para especies de bivalvos. Recientemente se ha desarrollado una técnica para estimar la presencia de estas proteínas en peces y bivalvos por un ensayo indirecto denominado ensayo de fosfatos lábiles a la alcalinidad (ALP) (Gagné y Blaise, 2000, citado por Marin *et al.*, 2004). Este método se basa en la cuantificación de fosfatos lábiles liberados por hidrólisis alcalina de proteínas y ha mostrado una correlación con otros ensayos de determinación directa (Marin *et al.*, 2004).

La ciencia relacionada con la medición y demostración de disrupción endócrina se encuentra en su infancia, por lo que actualmente se están desarrollando y validando métodos para las pruebas que indiquen efectos específicos de disrupción endócrina. (Hutchinson, *et al.*, 2006).

Los mejillones han adquirido una importancia global como centinelas en programas de monitoreo de contaminación marina y existen numerosos estudios al respecto (Ortiz-Zarragoitia y Cajaraville, 2006). Son un buen modelo para el monitoreo de la calidad del ambiente debido ya que su tejido responde a cambios en el medio ambiente (Kimbrough *et al.*, 2008). Para el presente trabajo, se seleccionó a *Mytilus californianus* como organismo de prueba porque se encuentra bien caracterizado como modelo de

exposición en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina (FARMAR) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California.

## HIPÓTESIS

El dispersante NOKOMIS 3-F4 actúa como disruptor endócrino en *Mytilus californianus*.

## III. OBJETIVOS

### General

Evaluar la toxicidad del producto NOKOMIS 3-F4 como disruptor endócrino en *Mytilus californianus*.

### Particulares

- Obtener el valor de  $CL_{50}$  de NOKOMIS 3-F4 en *Mytilus californianus* mediante ensayos de toxicidad aguda por exposición de organismos al agente dispersante durante 96 h.
- Evaluar la inducción de proteínas tipo vitelogenina en organismos machos y hembras de *Mytilus californianus* expuestos a NOKOMIS 3-F4 en una prueba de toxicidad crónica.

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 Estrategia general para la experimentación.

Después de colectados, los organismos de la especie *Mytilus californianus* se trasladaron al laboratorio de FARMAR, donde se mantuvieron vivos para su posterior exposición. Se realizaron tres ensayos de toxicidad para conocer diferentes aspectos del efecto de NOKOMIS 3-F4 sobre *Mytilus californianus*, tanto el efecto que tiene el dispersante al exponerse a altas concentraciones por períodos cortos, como el efecto al exponerlos a bajas concentraciones por períodos largos. Al final de cada exposición los organismos se sacrificaron y disectaron para obtener el hepatopáncreas, gónada y hemolinfa, para su análisis. Las muestras se analizaron para determinar los niveles de fosfatos lábiles a la alcalinidad para utilizarlos como indicador de vitelogeninas. Para tener una referencia sobre la cantidad de muestra utilizada, se midió el contenido de proteína en cada tejido (Figura 1).

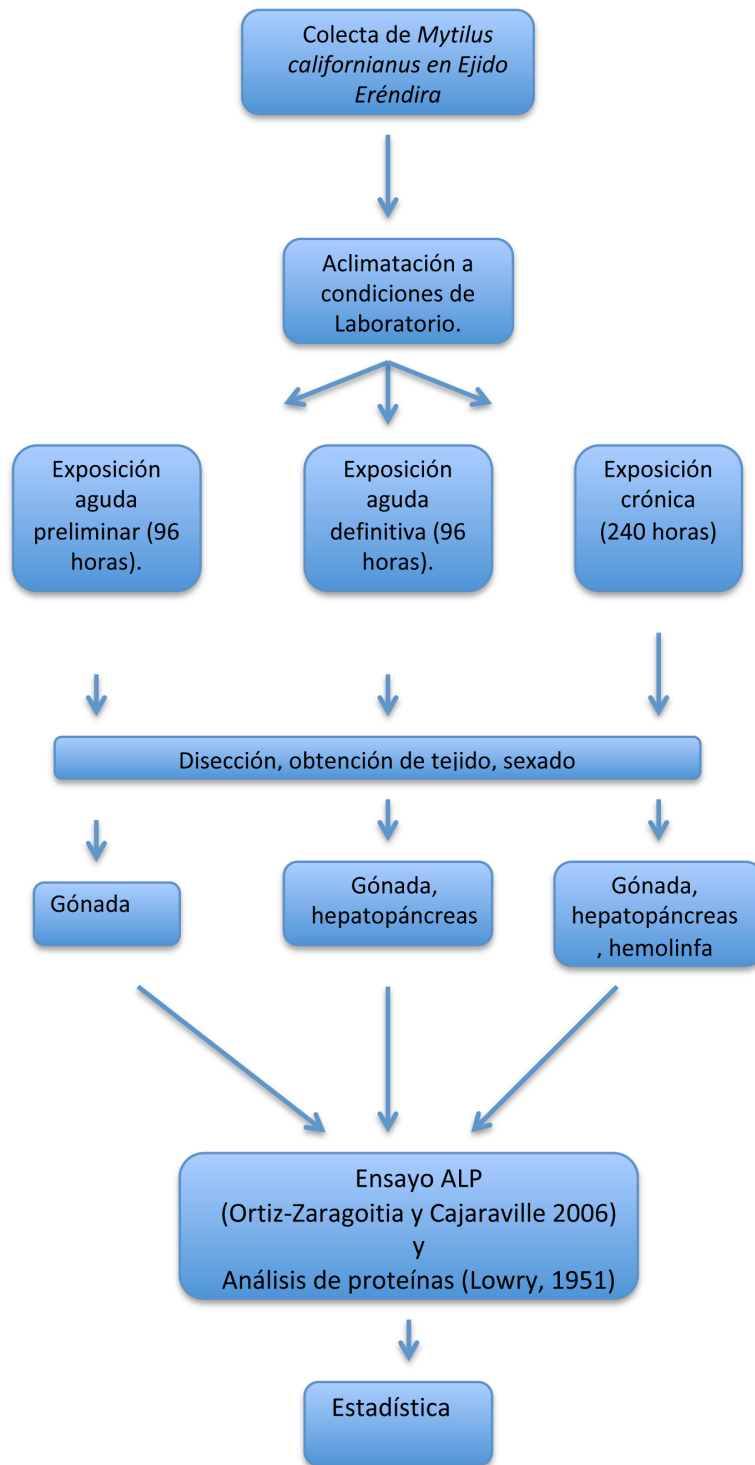


Figura 1. Diagrama de flujo que enlista las actividades realizadas durante la fase experimental de la investigación.

#### **IV.2. Colecta de Organismos (*Mytilus californianus*)**

Los organismos de estudio se colectaron en la playa de Punta San Ysidro del Ejido Eréndira, localidad situada al sur de Ensenada Baja California (31°19'N, 116°26'O). Debido a su lejanía de la mancha urbana y a que no ha sido explotado este recurso, este sitio aún conserva condiciones prístinas, en comparación con otras zonas cercanas a la Bahía de Todos Santos. El lugar de colecta cuenta con las condiciones idóneas para obtener ejemplares sanos y poco expuestos a agentes tóxicos (Figura 2). Se realizaron dos colectas para el presente trabajo, una en agosto del 2010 y otra en enero del 2011. En ambas colectas se obtuvieron aproximadamente 200 individuos de *Mytilus californianus* de 8 cm ( $\pm 0.5$  cm) de longitud de valvas. La longitud de los organismos fue determinada con un vernier. También se colectaron 40 litros de agua de mar en el sitio y se realizaron mediciones *in situ* de la temperatura, pH y salinidad del agua. Una vez obtenidos, los organismos fueron trasladados al laboratorio de FARMAR de la Facultad de Ciencias Marinas, en donde fueron acondicionados antes de proceder a la realización de ensayos de toxicidad.



Figura 2. *Mytilus californianus* en el Ejido Eréndira, playa de Punta San Ysidro.

#### **IV.3. Acondicionamiento de *Mytilus californianus* al laboratorio.**

Los organismos se mantuvieron en condiciones de temperatura, aireación, salinidad y pH del laboratorio FARMAR conteniéndolos en peceras de 20 litros, con el agua colectada en Punta San Ysidro. El acondicionamiento incluyó aireación continua, temperatura controlada (17°C) y luz fría las 24 horas del día. Diariamente se sustituyó un 25% del agua de cada pecera con agua de mar del sistema de ductos de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, la cual está tratada por filtración (0.45 µm) y luz UV. Este procedimiento se repitió hasta que en las peceras solamente quedó agua de mar proveniente del sistema de flujo del laboratorio. El proceso completo de

acondicionamiento tuvo una duración de 5 a 7 días. Durante este período, los organismos se alimentaron diariamente con un concentrado de microalgas Isochrysis 1800® (Reed Mariculture). A cada pecera se agregó el volumen necesario de Isochrysis 1800® para lograr una concentración final en cada pecera de  $10^3$  células/ml (Lagos, 1982).

#### **IV.4. Pruebas de toxicidad**

Las exposiciones se llevaron a cabo en frascos de vidrio con capacidad de 4 litros; en cada frasco se colocaron 3 organismos, y se manejaron 3 frascos por grupo de exposición, contando con una  $n = 9$  por grupo. Durante las exposiciones se realizaron pruebas de estímulo todos los días, para verificar que los organismos se encontraran vivos, si las valvas no se cerraban al estímulo, se consideraba que el organismo estaba muerto, se removía este del frasco y se proseguía a la disección, para la obtención de tejido como referencia.

##### **IV.4.1. Prueba de toxicidad aguda preliminar.**

Se realizó una exposición preliminar de 96 horas a tres grupos de organismos, con concentraciones en incremento logarítmico (50, 150 y 300 ppm). Para comparar el efecto de NOKOMIS 3-F4 con un disruptor endócrino reconocido, se aplicó simultáneamente 4-nonilfenol (NP-4) a un grupo designado como control positivo a una concentración de 100 mg/L ya que este compuesto fue reportado como un disruptor endócrino en *Mytilus edulis* por Ricciardi y colaboradores (2008). Ya que el NP-4 es hidrofóbico, se utilizó una mezcla de acetona (Ricciardi *et al.*, 2008) y acetonitrilo para propiciar su disolución en agua de mar. Para evaluar la toxicidad de la mezcla acetona-acetonitrilo-agua de mar, otro grupo

fue expuesto a este solvente, el cual se preparó a una concentración similar a la que recibió el grupo de NP-4. Se incluyó en el experimento un recipiente con un grupo control, el cual sólo contenía agua de mar. En total, se manejaron 6 grupos con 3 organismos cada uno, teniendo por triplicado cada recipiente (Figura 3).



Figura 3. Especímenes de *Mytilus californianus* en recipientes de exposición durante una prueba de toxicidad. Cada frasco contó con 3 organismos y se manejaron 3 frascos por grupo de exposición. Los frascos fueron cubiertos con plástico para evitar la contaminación entre los grupos expuestos y los no.

Los mejillones usados fueron medidos y se seleccionaron de manera que el promedio de tallas por cada frasco fuera de 8.0 ( $\pm 0.25$ ) cm. En cada frasco se colocaron 3.8 litros de agua de mar, se mantuvieron con aireación y luz fría continua; además, fueron cubiertos con plástico para evitar contaminación entre los grupos.

Diariamente se sustituyó toda el agua de cada grupo, reponiendo en cada caso la concentración de la sustancia de prueba, ya fuera NOKOMIS 3-F4, NP-4, solvente o control. Los organismos no fueron alimentados durante la exposición. Los especímenes que murieron fueron retirados de los frascos, disectados y su tejido congelado a -20°C. Este experimento se realizó en septiembre de 2010.

#### **IV.4.2. Prueba de toxicidad aguda definitiva**

Basándose en los resultados del experimento preliminar, se designaron 3 concentraciones de NOKOMIS 3-F4 (5, 10 y 30 ppm) para la exposición aguda definitiva. La concentración del NP-4 se aumentó a 200 µg/L para observar su efecto en los niveles de VTG. Para esta prueba se preparó la solución de NP-4 disolviéndolo en acetonitrilo, por lo que se formó un grupo para exponerlo a este solvente (control solvente) y un grupo control, el cual sólo contenía agua de mar. En total, en esta prueba se tuvieron 6 grupos, cada uno de ellos por triplicado: un control en agua de mar, un control en agua de mar con acetonitrilo, un grupo testigo con NP-4 y tres grupos con las concentraciones de prueba del NOKOMIS-3F4. Esta exposición tuvo una duración de 96 horas y se sustituyó diariamente el agua, reponiendo la concentración de cada sustancia de prueba. Los organismos no fueron alimentados durante la exposición, los mejillones que murieron fueron removidos de los frascos, disectados y su tejido congelado a -20 °C. Este experimento se realizó en noviembre de 2010.

#### **IV.4.3. Prueba de toxicidad crónica**

Para este ensayo se seleccionaron dos concentraciones de NOKOMIS 3-F4, (5 ppm y 10 ppm), un grupo con NP-4, un grupo con solvente (acetonitrilo) y un grupo control (sólo agua de mar). Al igual que las exposiciones anteriores, los grupos constaron de triplicados, tres frascos por grupo con tres organismos cada uno. Los mejillones fueron alimentados diariamente con Isochrysis 1800® a una concentración de 10<sup>3</sup> células/ml (Lagos, 1982). Diariamente se sustituyó el agua, los frascos se mantuvieron con aireación continua, temperatura controlada y luz fría las 24 horas del día. Esta prueba de toxicidad tuvo una duración de 240 horas.

#### IV.5. Disección, obtención de tejido y sexado

Una vez concluido el tiempo de exposición, los organismos fueron disectados. Se obtuvo la gónada y el hepatopáncreas para los ensayos de exposición aguda. Para el ensayo de toxicidad crónica se obtuvo la gónada, el hepatopáncreas y la hemolinfa, el último tejido se obtuvo según la metodología descrita por Riffeser y Hock (2002).

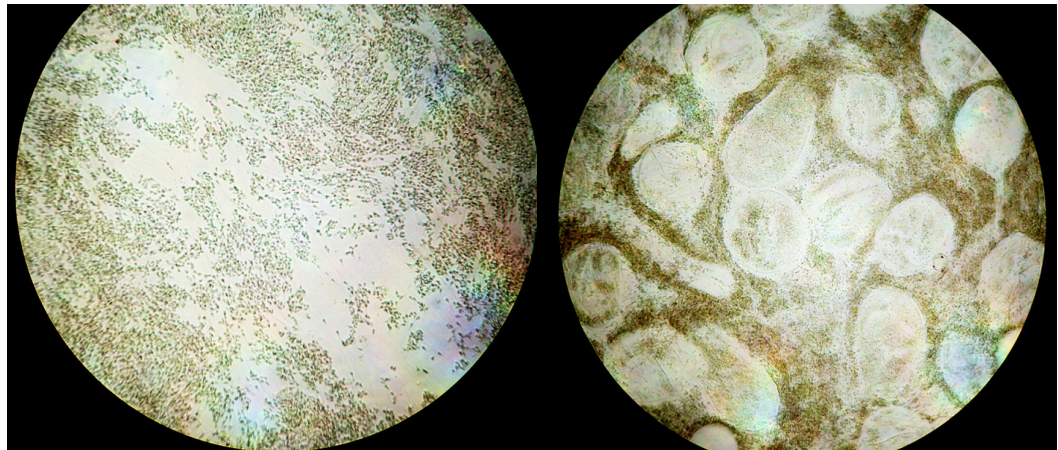


Fig. 4 . Frotis de gónada de *M. californianus* a 400 X. (a) espermatozoides , (b) ovocitos.

Con el objeto de analizar independientemente los machos de las hembras, se determinó el sexo de los organismos mediante la observación de un frotis de la gónada a 400X en un microscopio óptico (Figura 4).

La gónada y el hepatopáncreas fueron enjuagados individualmente con agua de mar filtrada, colocados en navcillas de plástico previamente etiquetadas y congelados a -20°C. La hemolinfa fue colectada del músculo aductor posterior, con una jeringa de plástico de 10 ml, obteniendo al menos 1 ml de hemolinfa por organismo, y colocándola en tubos de plástico para centrífuga de 2 ml enfriados mediante inmersión en hielo picado (Figuras 5 y 6) . Posteriormente los tubos fueron centrifugados 2 minutos a 12,000 xg a 2°C y se utilizó el sobrenadante para cuantificar vitelogeninas y proteínas.



Figura 5. Toma de muestra de hemolinfa de *Mytilus californianus*. Para el ensayo de toxicidad crónica se obtuvo hemolinfa del músculo aductor posterior, con el fin de realizar la cuantificación de vitelogeninas mediante la cuantificación de fosfatos por el ensayo ALP.

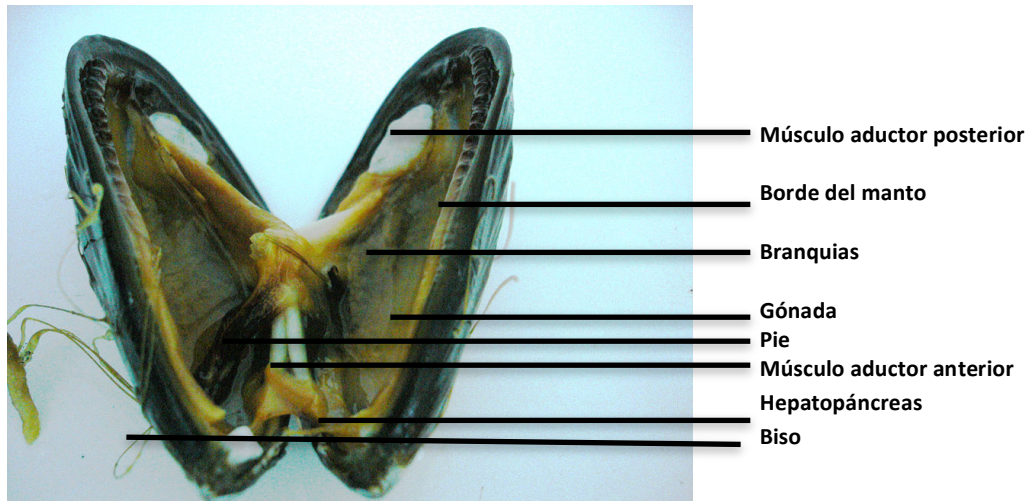


Figura 6. Anatomía de *Mytilus californianus* disectado. De los organismos sometidos a las pruebas de toxicidad, se obtuvo para su análisis, gónada, hepatopáncreas y hemolinfa, colectada del músculo aductor posterior.

#### IV.6. Cuantificación de vitelogeninas

El ensayo ALP es un método sencillo que permite determinar los niveles de lipoproteínas fosforiladas (vitelinas y vitelogeninas) en fluidos o tejidos biológicos. (Gagné *et al.*, 2000). El método está basado en el principio de que las vitelogeninas son extraídas con un solvente, el fosfato es posteriormente liberado por hidrólisis con hidróxido de sodio (NaOH) y cuantificados con el ensayo del fosfomolibdato (Gagné *et al.*, 2000).

##### IV.6.1. Obtención de la fracción de fosfatos lábiles a la alcalinidad (ALP) (Ortiz-Zaragoitia y Cajaraville, 2006)

Se pesaron 3 muestras por sexo por grupo, cada muestra consistiendo de 1 mejillón. Los tejidos fueron homogenizados con un homogenizador Polytron PT2100 a 22,000 rpm por 1 minuto en 1 ml (3.3 volúmenes) de buffer de ácido 4-(2-hydroxyetil)-1-

*piperazinil-etano sulfónico* (HEPES) 25 mM a pH 7.4 conteniendo cloruro de sodio (NaCl) 125 mM, ditioneitol 1 mM y *ácido etiléndiaminotetra-acético* (EDTA) 1 mM. El tejido homogenizado se centrifugó por 30 minutos a 2°C a una velocidad de 12,000 xg en una centrífuga refrigerada. Se tomaron 500 µL de sobrenadante y se mezclaron con 500 µL de acetona al 35%, la mezcla se centrifugó por 5 minutos a 10,000 xg. El pellet obtenido fue decantado y se resuspendió en 200 µL de solución con NaOH 1mM con vortex. La mezcla se incubó por 30 minutos a 60 °C en baño maría, agitando periódicamente con vortex. Se tomó una muestra de 75 µL de la fase acuosa y se analizó para cuantificar el fosfato libre.

#### **IV. 6.2. Medición del contenido de fosfato .**

El fosfato libre se cuantificó de acuerdo al método colorimétrico del fosfomolibdato, que consiste en la formación de complejos entre el fosfato inorgánico y el molibdato de amonio que es posteriormente se reduce con una solución de bisulfito de sodio y p-metil amino fenol sulfato, dando una coloración azul que puede ser medida a 660 nanómetros (Fiske *et al.*, 1925), citado por Gagné y Blaise (2000) Paralelamente, se obtuvo una curva de calibración utilizando una solución estándar de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El contenido de fosfato en el tejido se expresó en términos de µg de fosfato/mg de proteína.

#### **IV.7. Medición de proteínas (Lowry, 1951)**

Una muestra del tejido se homogenizó en 1 ml de Buffer de *2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol* (Tris) en concentración de 8 mM (pH 7.4), conteniendo 125mM de cloruro de sodio, 1mM ditioneitol y 1 mM de *ácido etiléndiaminotetra-acético* (EDTA) como inhibidor de proteasas. Se tomó una muestra de 30 µL de homogenado y se

cuantificaron las proteínas mediante el método de Lowry, que se basa en la reactividad de los péptidos con iones de cobre bajo condiciones alcalinas. La subsecuente reducción de los fenoles en tirosina (aminoácido presente en proteínas) con el reactivo Folin Ciocalteu da un color azul oscuro, que se cuantifica leyendo la absorbancia a 750 nm (Scopes, 1994). Como referencia se utilizó una curva de calibración con albúmina.

#### **IV.8. Análisis estadístico**

El valor de  $CL_{50}$  se obtuvo mediante un análisis Probit. Para el análisis de datos en los ensayos ALP, se procedió de la manera siguiente: los datos de contenido de vitelogenina se analizaron para evaluar normalidad mediante la prueba de Kolmogorov ( $\alpha = 0.05$ ); la homogeneidad de varianza se verificó mediante la prueba de Bartlett. Se realizó una prueba de Dunnett como análisis *a posteriori* para comparar los grupos con el control y una prueba de Tukey para comparar los grupos entre sí. Para la realización de este segmento del trabajo se utilizó como referencia *Biostatistical Analysis* (Zar, 2010).

## V. RESULTADOS

### V.1. Pruebas de Toxicidad

#### V.1.1 Prueba de toxicidad aguda preliminar

Durante este experimento se tuvo un gran porcentaje de muerte en los grupos expuestos al dispersante, por lo que sólo se realizó análisis ALP en el grupo de menor concentración (50 ppm). Se encontró un aumento significativo en los niveles ALP (Figura 7)

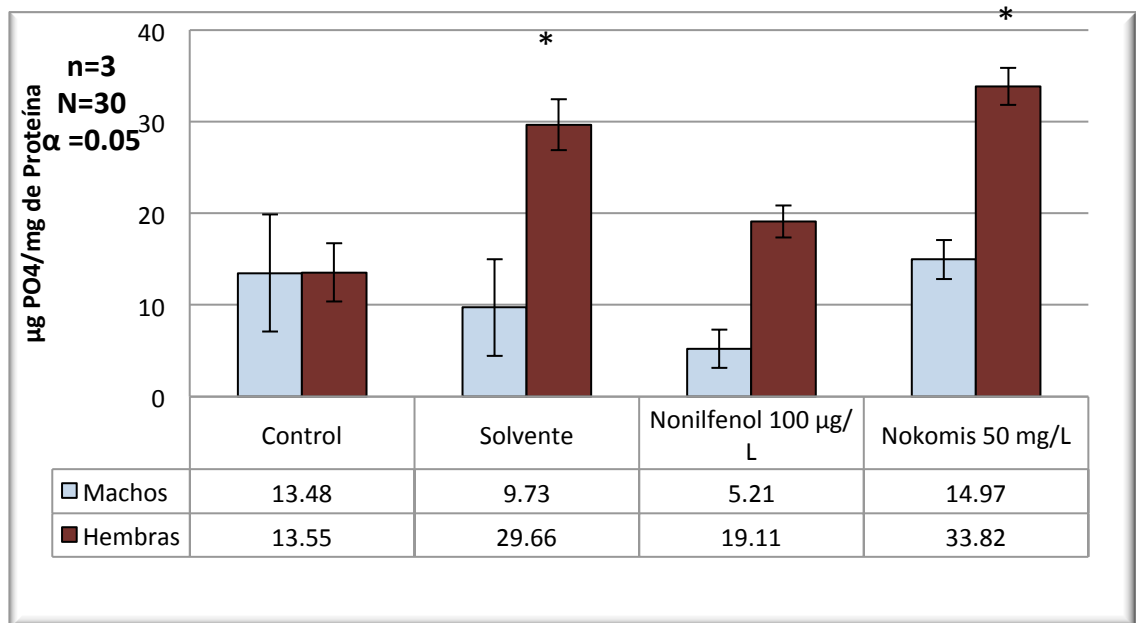


Figura 7. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónadas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda preliminar. Se muestran valores de los grupos : NOKOMIS 3-F4 (50 ppm), 4-nonilfenol (NP-4, control positivo), así como un grupo expuesto al solvente de NP-4 y un grupo control en agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. El asterisco señala diferencia significativa del grupo marcado con respecto al grupo control (Prueba Dunnet).

del grupo 50 ppm con respecto al grupo control, así como en las hembras del grupo solvente comparando con el grupo control. En el grupo NP-4 no se observó efecto significativo en los niveles de ALP.

### V.1.2 Prueba de toxicidad aguda definitiva

#### V.1.2.1. ALP en gónada.

Se encontró un decremento en los niveles de ALP (Figura 8) en los machos del grupo expuesto a 5 ppm del dispersante. Por otro lado, se observó en el grupo control un

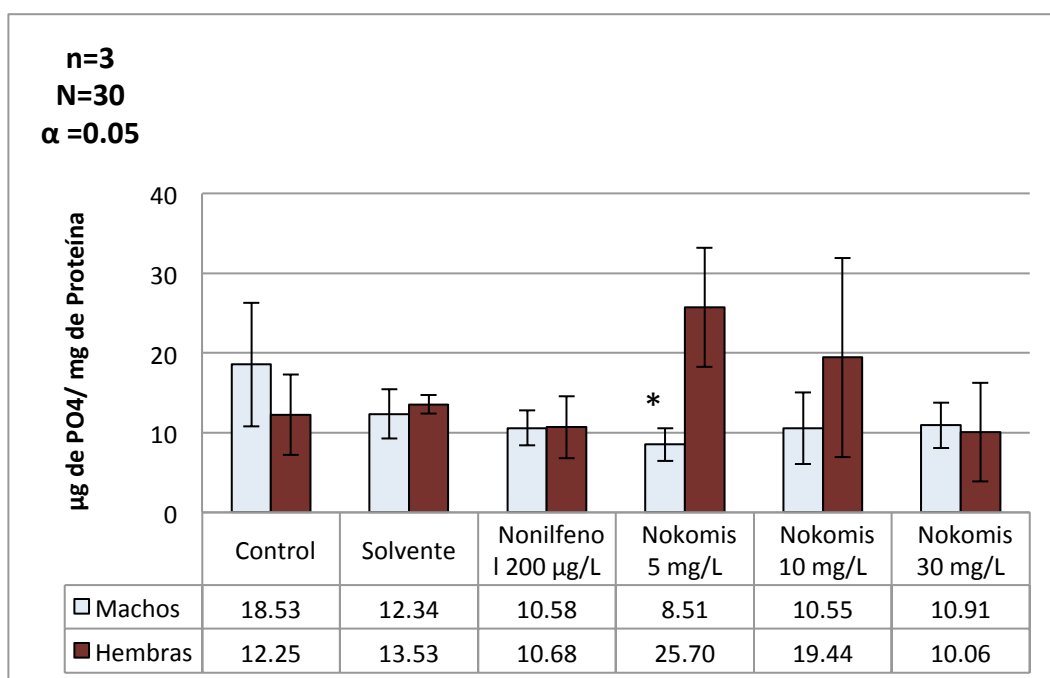


Figura 8. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónadas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda definitiva. Se muestran valores de los grupos expuestos a tres concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, sumergidos en agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet).

mayor valor en los niveles de machos que en hembras tanto en el análisis de gónada como el de hepatopáncreas. Las hembras no mostraron una respuesta significativa en esta exposición.

#### V.1.2.2. ALP en hepatopáncreas.

El análisis de hepatopáncreas mostró una diferencia significativa entre los machos del grupo control y el grupo NOKOMIS-3F4 de 10 ppm (Figura 9). A su vez, las hembras no mostraron diferencias significativas entre los grupos incluyendo el control en la

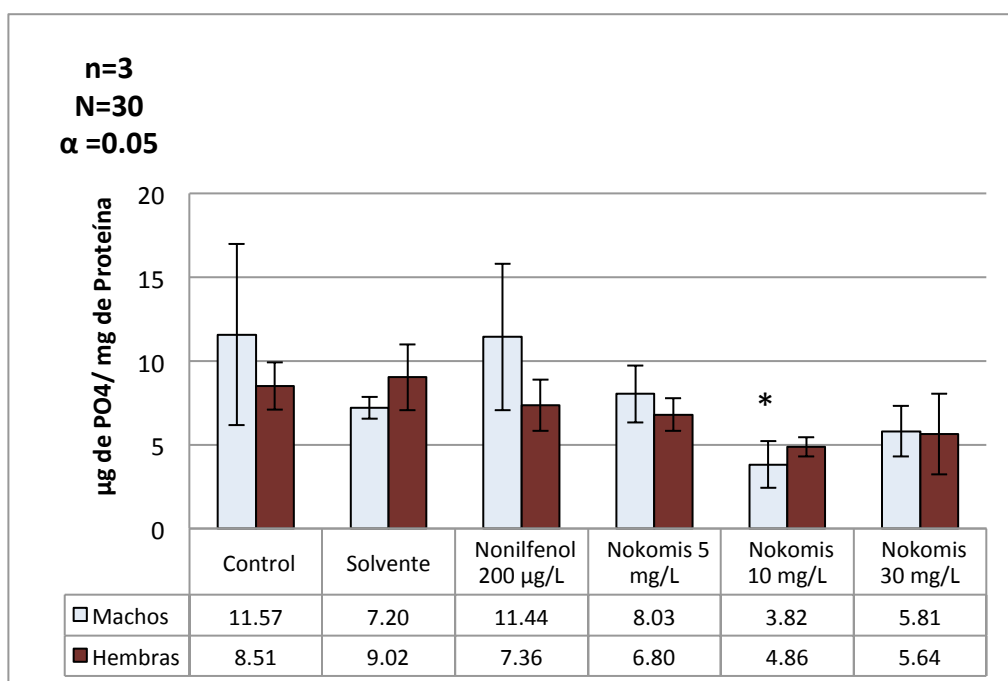


Figura 9. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuestos durante 96 h en la prueba de toxicidad aguda definitiva. Se muestran valores de los grupos expuestos a tres concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, sumergidos en agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet).

comparación. Igual que en el análisis de gónada, las diferencias en los grupos expuestos tendió a una disminución de los niveles ALP y no en un aumento.

#### V.1.2.3. Determinación del valor de CL<sub>50</sub>.

Se calculó el valor de la CL<sub>50</sub> basado en el porcentaje de organismos muertos (Tabla 1); y por medio de la metodología Probit se calculó el valor de CL<sub>50</sub> para 96 horas obteniendo 76.7454 mg/l (Tabla II, Figura 10).

Tabla I. Organismos vivos a las horas de exposición durante la intoxicación aguda preliminar de *Mytilus californianus* con Nokomis 3-F4 en un ensayo de 96

Tratamiento	Concentración (ppm)	Organismos Sobrevivientes				
		Horas de Exposición				
		0	24	48	72	96
Control	0	9	9	9	9	9
Solventes		9	9	9	9	9
NP-4	0.1	9	9	9	9	9
NOKOMIS 3-F4 1	50	9	9	9	8	7
NOKOMIS 3-F4 2	150	9	9	9	4	1
NOKOMIS 3-F4 3	300	9	9	6	0	0

Tabla II. Valores Probit por porcentaje de muerte en organismos expuestos a NOKOMIS 3-F4.

Concentración de			
NOKOMIS- 3F4 (ppm)	Log de C	% de Muertos	Probit
5	0.6989	0	-
10	1	0	-
30	1.477	0	-
50	1.69897	22.2	4.23
150	2.17609	88.8	6.23
300	2.47712	99.9	7.33

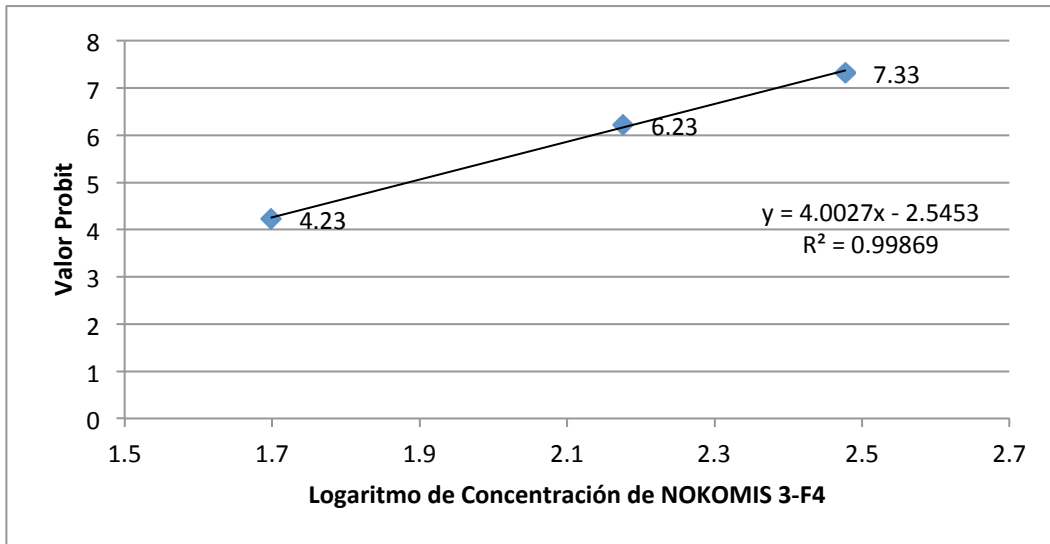


Figura 10. Gráfica Probit para la Concentración Letal 50 ( $CL_{50}$ ) a 96 horas de NOKOMIS 3-F4 para *Mytilus californianus*.

### V.1.3. Prueba de toxicidad crónica

#### V.1.3.1. ALP en gónada

En esta exposición se observó respuesta de parte de las hembras (Fig. 11), los dos grupos expuestos a distintas concentraciones de NOKOMIS 3-F4 mostraron una disminución significativa en los niveles ALP, así como el grupo expuesto a 4-nonilfenol, el cual también mostró una disminución significativa. Los machos no mostraron diferencias significativas con respecto al control. No se observaron diferencias significativas entre el

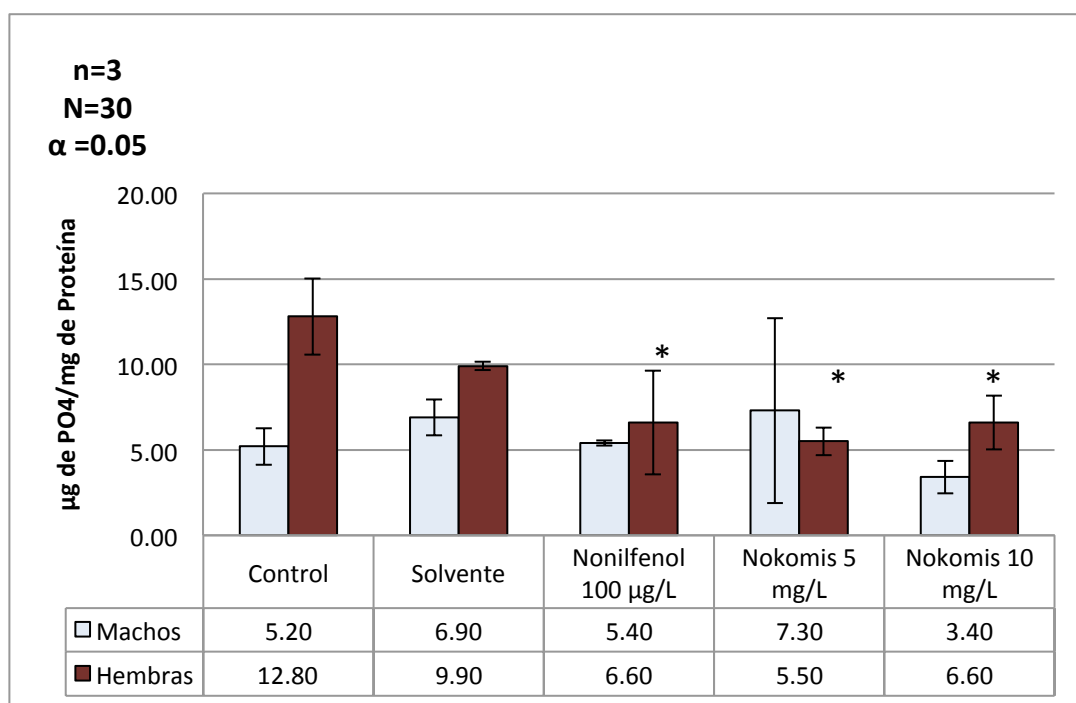


Figura 11. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en gónada de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet).

grupo expuesto a acetónitrilo y el grupo control. El nivel de ALP observado en hembras fue mayor al de los machos en el grupo control.

#### V.1.3.2. ALP en hepatopáncreas

En este tejido no se observaron cambios en los niveles de ALP de las hembras expuestas. Los machos mostraron un aumento significativo en los niveles ALP del grupo expuesto a 4-nonilfenol y el grupo expuesto a 5 ppm de NOKOMIS 3-F4. (Figura 12)

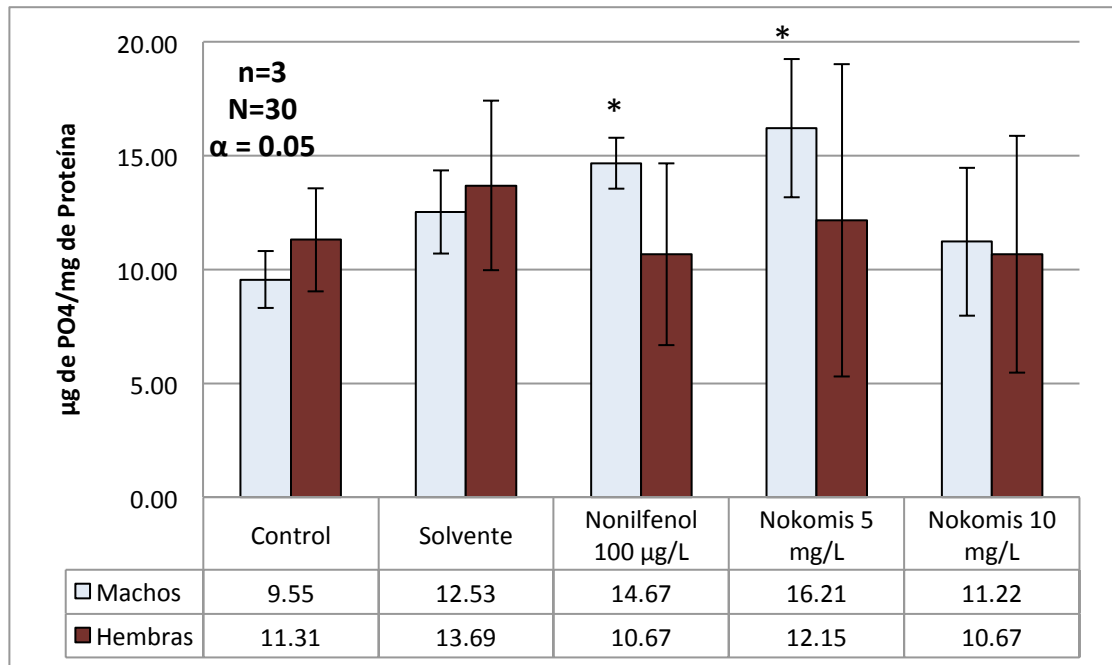


Figura 12. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hepatopáncreas de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. El asterisco señala diferencia significativa del grupo con respecto al control (Prueba de Dunnet).

### V.1.3.3. ALP en hemolinfa

El análisis en hemolinfa no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados. Las concentraciones encontradas fueron alrededor de un orden de magnitud menor que las observadas en las otras muestras (gónada y hepatopáncreas). Por ejemplo, en hepatopáncreas de machos expuestos a 10 ppm de NOKOMIS 3-F4 se observó un promedio de 11.22  $\mu\text{g}$  de fosfatos/mg de proteína y en hemolinfa se observó un promedio de 1.15  $\mu\text{g}$  de fosfatos/mg de proteína en machos del mismo grupo. (Figura 13)

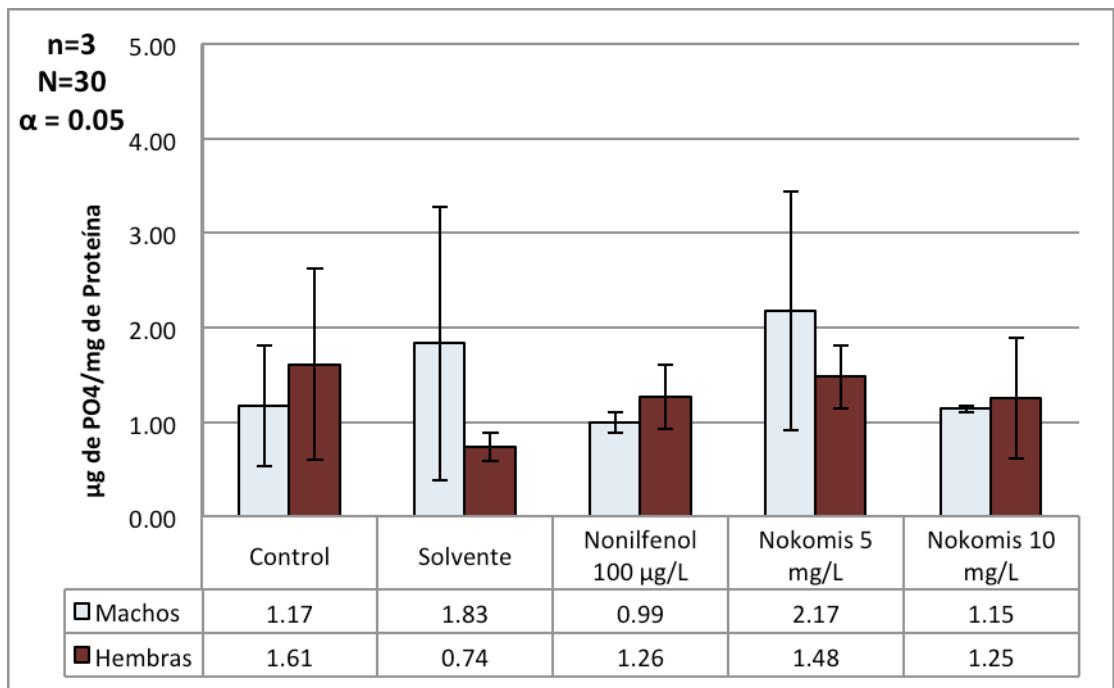


Figura 13. Niveles de vitelogenina en términos de contenido de fosfatos lábiles al álcali (ALP) en hemolinfa de *Mytilus californianus* expuestos durante 240 h en la prueba de toxicidad crónica. Se muestran valores de los grupos expuestos a dos concentraciones del dispersante NOKOMIS 3-F4, un grupo bajo 4-nonilfenol como control positivo, un grupo expuesto al solvente utilizado para disolver el 4-nonilfenol en agua de mar y un grupo control sin xenobióticos, con sólo agua de mar. Las líneas representan la desviación estándar de la media. (Prueba de Dunnet).

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el potencial del dispersante NOKOMIS 3-F4 como disruptor endócrino en el mejillón *Mytilus californianus*, ya que este producto comercial se encuentra bajo estudio en el Laboratorio de FARMAR de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California en colaboración con la Segunda Región Naval de la Secretaría de Marina Armada de México.

Los datos obtenidos en la prueba de toxicidad aguda para las concentraciones probadas (50 ppm, 150 ppm, 300 ppm) permitieron determinar la  $CL_{50}$  de NOKOMIS 3-F4 sobre *Mytilus californianus* mediante la metodología Probit, siendo ésta de 76.75 mg/L para 96 horas (Figura 10). Según la EPA, la  $CL_{50}$  de NOKOMIS 3-F4 en *Menidia beryllina* para 96 horas es de 100 mg/L y en *Mysidopsis bahia* para 48 horas es de 50.4 mg/L (EPA, 2010b). El análisis Probit indica que *Mytilus californianus* es más sensible a NOKOMIS 3-F4 que *Menidia beryllina* pero más resistente al dispersante que *Mysidopsis bahia*. Los dispersantes usados por British Petroleum (BP) durante el derrame del Golfo de México fueron COREXIT 9500A y COREXIT 9527A, de los cuales el primero tiene una  $CL_{50}$  de 2.61 mg/L para 96 horas en *Menidia beryllina* y de 3.4 mg/L en *Mysidopsis bahia* para 48 horas. El segundo dispersante, COREXIT 9527A, tiene una  $CL_{50}$  de 4.49 mg/L en *Menidia*

sp. para 96 horas y de 6.60 mg/L en *Mysidopsis bahia* para 48 horas. Por comparación con estos datos, podría desprenderse la idea de que el dispersante NOKOMIS 3-F4 es menos tóxico que los dispersantes usados por BP: COREXIT 9500A, COREXIT 9527A. Según los parámetros de la EPA, NOKOMIS 3-F4 sería clasificado como ligeramente tóxico mientras que COREXIT 9500A se clasificaría como moderadamente tóxico (US EPA, 2010<sub>b</sub>). La EPA considera a un compuesto moderadamente tóxico cuando éste ejerce una respuesta tóxica en organismos acuáticos a una concentración entre 1 y 10 ppm, y ligeramente tóxico cuando el compuesto ejerce una respuesta a una concentración entre 10 y 100 ppm (US EPA, 2010<sub>c</sub>). Aunque la EPA no indica claramente la efectividad de ambos dispersantes no es aclarada por la EPA, dicho dato es de suma importancia para tomar una decisión en relación a su aplicación, pues mientras que un agente puede ser menos tóxico que otro, si éste es menos efectivo y se requiere aplicar una mayor cantidad para dispersar la mancha de petróleo, su baja toxicidad no marcaría una diferencia en el impacto al ambiente. Otros parámetros que se debieran tomar en cuenta son la toxicidad del petróleo dispersado, la dilución que sufrirá en el medio en que se dispersa y la degradación del dispersante en el ambiente, el potencial del hábitat y las poblaciones a recuperarse tras el impacto, entre otros aspectos que merecen estudiarse (George-Ares, y Clark, 1997).

Cuando un xenobiótico se introduce en un organismo, las posibles causas de efecto tóxico observado son: a) La presencia del agente contaminante, o b) Algún producto de su biotransformación por el organismo (Smart y Hodgson, 2008). Al aplicar estas bases al

presente estudio, se observó que la intensidad del efecto es similar en los grupos expuestos a 4-nonilfenol y los grupos expuestos al dispersante NOKOMIS 3-F4, lo cual es un indicio de que el agente dispersante es capaz de ejercer una disrupción endócrina similar al compuesto 4-nonilfenol, ya sea por medio de un compuesto similar a 4-nonilfenol en NOKOMIS 3-F4 o algún producto biotransformado del dispersante que sea similar a 4-nonilfenol.

El 4-nonilfenol es el producto primario en la producción industrial de surfactantes no iónicos, como NOKOMIS 3-F4. Cuando estos productos se liberan al mar, se biodegradan y metabolizan hasta convertirse en etoxilados de cadena corta y finalmente a 4-nonilfenol libre (Granmo *et al.*, 1989). Cuando 4-nonilfenol se encuentra biodisponible a organismos, su propiedad lipofílica le permite acumularse en los tejidos y por su similitud con la hormona estradiol le permite activar los receptores de estrógeno y de esta manera generar una respuesta en el organismo, como puede ser la producción de proteínas VTG (Ricciardi *et al.*, 2008). De acuerdo al estudio realizado por Madigou y colaboradores (2001), donde se encontró una correlación entre 4-nonilfenol y la actividad del receptor de estrógeno de la trucha arcoíris, y a los experimentos realizados durante esta investigación, es posible que el dispersante pudiera ejercer un efecto por medio de los receptores de estrógeno; sin embargo, se requieren estudios enfocados específicamente en la actividad de estos receptores para elucidar este punto.

Durante la prueba de toxicidad aguda preliminar (Figura 7), las hembras del grupo expuesto al dispersante NOKOMIS 3-F4 con 50 ppm de concentración presentaron un aumento significativo en sus niveles ALP, mientras que los machos de este grupo no mostraron un cambio en sus niveles ALP. Aunque en este experimento se esperaba encontrar una similitud entre este grupo y el grupo control positivo (4-nonilfenol), esto no fue así, pues el 4-nonilfenol no ejerció efecto en los niveles ALP de los mejillones. Mientras que NOKOMIS 3-F4 es hidrofílico y por consiguiente se disuelve fácilmente en agua de mar, este se mantuvo biodisponible y a concentración constante durante los experimentos; en cambio, el compuesto 4-nonilfenol es hidrofóbico y requiere de un disolvente para estar diluido en agua, la naturaleza hidrofóbica de estos compuestos hace que se adhiera a superficies, ya sea la pared de la pecera o partículas en el agua. Para estos experimentos se utilizó agua de mar filtrada por el sistema de ductos de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, la cual está tratada por filtración (0.45  $\mu$  m), además los organismos no se alimentaron durante el experimento con microalgas. Por lo tanto, el agua en que se encontraban los mejillones no contaba con partículas para que ellos filtraran y el 4-nonilfenol se encontraba a concentraciones bajas, lo cual no permitió que se produjera un efecto observable. Cabe recordar que durante las pruebas de exposición corta en organismos suele mantenerse este tipo de régimen alimenticio, ya que el alimento puede interactuar y modificar la toxicidad de un xenobiótico (Lanno *et al.*, 1989)

El control solvente de la prueba de toxicidad preliminar ocasionó un aumento en los niveles de vitelogeninas encontrados (Figura 7), mientras que en la prueba de toxicidad aguda y la prueba de toxicidad crónica no ocasionó cambios significativos con respecto al control (Figura 11 y 12). Esto puede explicarse mediante las diferencias de los solventes utilizados, ya que en la prueba de toxicidad preliminar se utilizó una mezcla de acetona y acetonitrilo, mientras que en la prueba de toxicidad aguda y la prueba de toxicidad crónica se utilizó solamente acetonitrilo. Conforme a los experimentos realizados, no se encontró una explicación para estas diferencias observadas, sin embargo se estima que el solvente acetonitrilo por sí solo no ejerció un efecto en los niveles ALP en ninguno de los tejidos durante la prueba de exposición aguda definitiva y la prueba de exposición crónica. Con base en lo anterior, se considera que el solvente acetonitrilo es una buena opción como solvente de 4-nonilfenol y no se recomienda utilizar la mezcla de acetonitrilo y acetona, ya que en este estudio causó un aumento en los niveles detectados de ALP, lo anterior ocasionaría respuestas positivas falsas.

Durante la prueba de toxicidad aguda preliminar (Figura 7), las hembras del grupo expuesto a 50 mg/L de NOKOMIS 3-F4 mostraron un aumento significativo en sus niveles ALP, mientras que los machos de este grupo no presentaron un cambio. Aunque en este experimento se esperaba encontrar una similitud entre este grupo y el grupo control positivo (4-nonilfenol), esto no fue así, pues el 4-nonilfenol no ejerció un efecto en los niveles ALP de los mejillones. NOKOMIS 3-F4 es hidrofílico y por consiguiente se disuelve fácilmente en agua de mar, por lo que se encuentra biodisponible y a concentración

constante durante los experimentos. Por otro lado , el compuesto 4-nonilfenol es hidrofóbico y requiere de un disolvente para estar disuelto en agua; la naturaleza hidrofóbica de este tipo de compuestos hace que se adhieran a superficies. ya sea la pared de la pecera o partículas en el agua. En todos los experimentos se utilizó agua de mar filtrada por el sistema de ductos de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, la cual está tratada por filtración (0.45  $\mu$  m); por otro lado durante los experimentos de toxicidad aguda los organismos no fueron alimentados. Por lo tanto, en esta experimentación el agua no contaba con partículas para hacer al xenobiótico más disponible. Por lo anterior el 4-nonilfenol se encontraba disponible a concentraciones bajas, y no generó un efecto observable.

Cabe recordar que durante las pruebas de exposición corta en organismos acuático suele mantenerse en ayuno, ya que el alimento es capaz de interactuar y modificar la toxicidad de un xenobiótico (Lanno *et al.*, 1989). Esto es un factor importante a tomar en cuenta y marca la diferencia que existe entre las pruebas de toxicidad agudas y la prueba de toxicidad crónica en relación a los protocolos establecidos para cada tipo de prueba (US EPA, 1996). Siguiendo estos protocolos, durante las exposiciones agudas, los organismos no fueron alimentados con Isochrysis 1800. Es posible que el 4-nonilfenol no haya estado tan biodisponible durante estas exposiciones ya que el 4-nonilfenol suele adsorberse a superficies como estas microalgas que posteriormente son filtradas por los mejillones. En cambio, durante la exposición crónica, los organismos sí fueron alimentados con Isochrysis 1800, lo cual pudo favorecer la ingestión del xenoestrógeno y su

bioacumulación en *M. californianus*. Esto explicaría por que en la exposición crónica se observa una respuesta de aumento en el hepatopáncreas en los mejillones expuestos a 4-nonilfenol y a NOKOMIS 3-F4, y una disminución de los niveles ALP del grupo expuesto a 4-nonilfenol y el grupo expuesto a NOKOMIS 3-F4 a 10 mg / en la gónada de, mientras que en la exposición aguda preliminar y la exposición aguda definitiva no se observaron respuestas de intensidad similar entre los grupos 4-nonilfenol y los grupos NOKOMIS (Figura 8 y 9).

En relación al aumento observado en el experimento preliminar de toxicidad aguda del grupo control solvente (Figura 7) comparado con la prueba definitiva de toxicidad aguda (Figura 8) en el cual no se observan diferencias en este grupo con respecto al grupo control. Podemos explicarlo mediante el análisis de los solventes utilizados. Debido a que el 4-nonilfenol es hidrofóbico, se utilizaron disolventes no polares para disolverlo en agua de mar, para el experimento preliminar el solvente consistió en una mezcla de acetona y acetonitrilo, mientras que en la prueba definitiva y la crónica, se utilizó solamente acetonitrilo. Lo anterior sugiere que la acetona se comportó como un xenobiótico, capaz de alterar la producción de vitelogeninas. Cabe mencionar que el grupo 4-nonilfenol de la prueba preliminar no manifestó un efecto visible aunque contaba con la misma concentración de la mezcla. Esto puede deberse a que el 4-nonilfenol ejerció una inhibición en la producción de vitelogeninas y este efecto se contrarrestó con el incremento provocado por el solvente. Por otra parte se observa que el solvente acetonitrilo por sí solo no ejerció un efecto en los niveles ALP en ninguno de los tejidos

durante la prueba de exposición aguda definitiva y la prueba de exposición crónica. Considerando esto, se observa que el solvente acetonitrilo es una buena opción como solvente de 4-nonilfenol. No se recomienda utilizar la mezcla de acetonitrilo y acetona, ya que en este estudio causó un aumento en los niveles detectados de ALP.

Para el estudio de exposición aguda definitiva se analizaron dos tipos de tejido, hepatopáncreas y gónada. En ambos tejidos se observó una respuesta de parte de los organismos macho: en gónada se observó una disminución significativa de los niveles ALP en los organismos expuestos a una concentración de 5 mg/L del dispersante y en hepatopáncreas (Figura 9) se observó una disminución significativa de los niveles ALP en los organismos expuestos a una concentración de 10 ppm de NOKOMIS 3-F4. En general, se esperaba encontrar un aumento en los niveles ALP de los organismos macho y no una disminución. Sin embargo, estudios en el salmón atlántico han demostrado que el 4-nonilfenol actúa por varias rutas sobre el sistema endócrino de los organismos, generando diferentes respuestas a diferentes concentraciones, una de ellas es la inducción de altos niveles de proteínas VTG en el plasma a dosis arriba de 10 mg de 4-nonilfenol por kilogramo de peso corporal. Sin embargo el efecto documentado más importante es el incremento de la producción de la enzima progesterona 6-hidroxilasa, e inhibición de la misma actividad a dosis más elevadas (Goksøyr, 2006).

Es importante mencionar que el estudio de exposición aguda definitiva (Figura 8 y 9) se llevó a cabo después del período de desove, los organismos colectados mantuvieron su ciclo anual aún dentro del laboratorio, desovando en el periodo otoño invierno. Los

frotis de tejido de gónada de organismos de la prueba de toxicidad aguda definitiva, mostraron menor cantidad de gametos que los observados en la prueba de toxicidad aguda preliminar (Figura 7), lo que ocurrió durante el periodo de desove. El hecho de que los organismos hayan mantenido su ciclo anual de desove es un indicador del bajo estrés de estos bajo las condiciones de laboratorio. El grupo expuesto a 4-nonilfenol no mostró un cambio en sus niveles ALP comparado con el grupo control, y tampoco mostró una similitud en la intensidad de respuesta con los grupos expuestos a NOKOMIS 3-F4. Es posible que el estadio de la gametogénesis en el que se encontraban los organismos al tiempo de exposición afectó la respuesta que tuvieron al dispersante. Esta hipótesis tiene dos puntos importantes, en primer lugar, hay temporadas en las que el mejillón es más susceptible al efecto de un estrógeno, ya sea por la producción de vitelo u otros componentes, por lo que el efecto de un xenoestrógeno será más marcado; en segundo término, cuando el organismo se está preparando para desovar, el contenido de lípidos en el tejido es mayor, lo cual favorece que en el tejido gonadal se deposite mayor cantidad de compuestos lipofílicos como el 4-nonilfenol, por lo que ocasiona un incremento del mismo en el tejido y por lo tanto, ocasiona un mayor contacto del organismo con el xenobiótico.

Una de las funciones de los ovocitos es proveer al embrión con el alimento necesario para desarrollarse hasta el momento de volverse larva trocófora, por lo que estos gametos tienen un alto contenido de lípidos. Al ocurrir el desove, los organismos hembra tendrían una mayor pérdida de lípidos que los machos, por lo que éstos tendrían

una mayor acumulación de compuestos lipofílicos en sus tejidos, como lo es NOKOMIS 3-F4. Este hecho podría explicar porqué en organismos desovados no se observó efecto en los niveles ALP de hembras, pero sí de machos.

Para la exposición crónica que tuvo una duración de 10 días, se analizaron 3 tipos de muestra, gónada, hepatopáncreas y hemolinfa. En los organismos hembra expuestas a NOKOMIS 3-F4 y a 4-nonilfenol, se observó una disminución significativa de los niveles ALP en el tejido de gónada (Figura 11). En los organismos macho expuestos a 4-nonilfenol y NOKOMIS 3-F4 a una concentración de 5 ppm se observó un aumento de los niveles ALP en el tejido de hepatopáncreas (Figura 12). Para la metodología utilizada, el análisis en hemolinfa (Figura 13) no mostró diferencias significativas entre los grupos expuestos y el control. Posiblemente esto se deba a la menor concentración de proteínas tipo VTG asociado a la baja sensibilidad del método utilizado, ya que posiblemente para detectar diferencias entre estas concentraciones se requeriría un análisis más sensible para este tipo de muestra. Las concentraciones encontradas en hemolinfa fueron alrededor de un orden de magnitud menor que las observadas en los tejidos de gónada y hepatopáncreas. Esto concuerda con las observaciones de Riffeser y Hock (2002), quienes aluden a la poca aplicación de hemolinfa como fuente de vitelogeninas en mejillones, y sugieren que este tipo de proteína no es transportada por la hemolinfa sino que es producida *in situ*, dentro de los ovocitos.

Durante la exposición crónica, las hembras expuestas a 4-nonilfenol y al dispersante disminuyeron sus niveles ALP en gónada, comparadas con el grupo control

(Figura 11), mientras que los machos expuestos a 4-nonilfenol y a NOKOMIS 3-F4 a una concentración de 5 ppm tuvieron un aumento significativo de sus niveles ALP en hepatopáncreas (Figura 12). Lo cual es de gran importancia pues muestra una clara similitud de intensidad de respuesta entre el control positivo (4-nonilfenol) y los grupos expuestos a NOKOMIS 3-F4, y nos sugiere que NOKOMIS 3-F4 está ejerciendo una disrupción endócrina en los organismos de una intensidad similar que el 4-nonilfenol. Una posible hipótesis que se desprende de aquí es que el mecanismo de acción del dispersante es similar al de 4-nonilfenol sobre los organismos, aunque esto debería ser confirmado mediante estudios de biotransformación de NOKOMIS 3-F4.

Durante las pruebas de toxicidad, tanto agudas como crónicas, se observó que en los grupos de mayor concentración de dispersante los organismos mantenían las valvas cerradas, disminuyendo el contacto con el medio contaminado y posiblemente su metabolismo, a diferencia de los grupos de concentración baja que mantenían las valvas abiertas filtrando las partículas en el agua. Este comportamiento ha sido observado por otros autores en *Mytilus edulis* expuesto a aceites y extractos de gasolina (Dunning y Major, 1974; Rand, 1985). Los organismos sésiles han desarrollado estrategias para minimizar el contacto con sustancias dañinas por medio de cambios en el comportamiento, esto lo logran cerrando sus valvas y aislándose del medio ambiente. (Rand, 1985). Al realizar esta acción, los organismos minimizarían el contacto con su medio, a su vez truncando la exposición a NOKOMIS 3-F4, lo cual podría tener efectos en los resultados, para lograr observar la correlación entre la concentración y la respuesta.

En resumen, durante todas las exposiciones se observaron diferentes respuestas de los organismos, es decir, los niveles de ALP en ocasiones aumentaron al ser expuestos al dispersante y en otras disminuían. Estas diferencias se dieron entre machos y hembras (incremento/decremento), por ejemplo durante la exposición crónica se observó una disminución en los niveles ALP de las gónadas de organismos hembra, mientras que se observó un aumento en los niveles ALP en hepatopáncreas de organismos macho. También se detectó una variación asociada a la fecha de exposición, sugiriendo que la diferencia en la respuesta depende del estado de gametogénesis y/o desove en el que se encontraban los organismos.

Lo anterior puede confirmarse haciendo un seguimiento de los valores basales en los organismos no expuestos a ningún tipo de xenobiótico. En relación a los niveles ALP encontrados en los grupos control, éstos resultaron ser variables en cada exposición. En la exposición aguda preliminar, realizada en septiembre, los niveles ALP fueron similares entre machos y hembras (Figura 7), mientras que en la exposición aguda definitiva realizada en noviembre, los niveles de ALP en los organismos macho fueron mayores que los niveles de las hembras (Figura 8 y 9). Por último, en la exposición crónica, realizada en febrero 2011, los niveles de ALP de las hembras fueron mayores que los niveles de los machos (Figura 11 y 12). Como se mencionó anteriormente, es posible que estas variaciones se deban al estadio de la gametogénesis en que se encontraban los organismos, siendo los niveles de VTG más altos cuando los organismos no han desovado y se encuentran en periodo de almacenamiento y producción de vitelo, es decir, durante

el estadio temprano de la gametogénesis, en febrero. Mientras que en noviembre, los organismos ya habían desovado y se encontraban en los últimos estadios de la gametogénesis. Esta observación concuerda con lo reportado por Ciocan y colaboradores (2010), quienes expusieron al mejillón *Mytilus edulis* a xenoestrógenos durante dos etapas de la gametogénesis, mejillones en etapa temprana (febrero) y mejillones en etapa tardía (abril), detectando respuesta en los organismos expuestos en febrero, y no así para los organismos expuestos en abril, concluyendo que el estadio en el que se encuentran los organismos al momento de exponerlos a xenobióticos puede influir fuertemente en las respuestas que presenten los mejillones.

El tejido de gónada femenino contiene ovocitos y en consecuencia vitelo, lo cual lo convierte en buen candidato para medir los niveles de ALP. Además, si la vitelogénesis se da en el hepatopáncreas como sucede con los peces, este tejido también sería un buen candidato para evaluar los niveles de ALP. De acuerdo con estas observaciones, en este estudio, a excepción de la hemolinfa, los tejidos usados resultaron adecuados para el ensayo ALP.

En general, los resultados concuerdan con las observaciones de Goksøsr (2006), quien reporta poca correlación entre la concentración y la respuesta de organismos expuestos a 4-nonilfenol. Este autor plantea que el compuesto funciona sobre varias rutas de disrupción endócrina, actuando como mímico del estrógeno (Arukwe *et al.*, 1997a; citado en Gokøsy 2006), como un disruptor del metabolismo de los esteroides (Arukwe *et al.*, 1997b; citado en Gokøsy 2006) y modulando los niveles del receptor de estrógenos

(ER) (Yadette *et al.*, 1999; Arukwe *et al.*, 2001; citado en Gokosyr 2006). Estas observaciones sugieren que el compuesto puede generar diferentes respuestas a diferentes concentraciones y que el efecto puede variar según la temporada a la que el organismo sea expuesto.

Los resultados de esta investigación indican que el dispersante NOKOMIS 3-F4 ejerce un efecto sobre los niveles de ALP en gónada y hepatopáncreas de *Mytilus californianus*.

## VII. CONCLUSIONES

1. El valor de  $CL_{50}$  96 horas para *Mytilus californianus* hacia el dispersante NOKOMIS 3-F4 es de 76.75 mg/L.
2. El agente dispersante NOKOMIS 3-F4 induce la producción de vitelogeninas en hepatopáncreas de machos *Mytilus californianus* en los primeros estadios de la gametogénesis.
3. Tomando en cuenta los bajos niveles de vitelogeninas encontrados durante los primeros estadios de la gametogénesis, se concluye que NOKOMIS 3-F4 actúa como inhibidor en la producción de vitelogeninas en gónada de hembras *Mytilus californianus*.
4. En base al alto nivel de vitelogeninas encontrado durante el estadio medio, se concluye que el agente dispersante induce la producción de vitelogeninas en gónada de hembras *Mytilus californianus* en esta etapa de la gametogénesis.
5. Con base en la ausencia de cambios significativos en los niveles de vitelogeninas de machos y hembras *Mytilus californianus* desovados expuestos al dispersante con respecto al control, se concluye que NOKOMIS 3-F4 no ejerce inducción de vitelogeninas en organismos desovados e esta especie.

6. Considerando los bajos niveles de vitelogeninas encontrado en hemolinfa de todos los grupos, se concluye que ésta no es una muestra biológica adecuada para el ensayo ALP en *Mytilus californianus*.
7. El dispersante NOKOMIS 3-F4 tiene un efecto como disruptor endócrino en *Mytilus californianus* expuesto durante 10 días a 5 y 10 mg/L, siendo su respuesta variable a lo largo de su estadio en la gametogénesis.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Campbell, C.G., Borglin, S.E., Green, F.B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*. 65: 1265-1280.

Cedre. (2010). Deepwater Horizon, Response at Sea. Obtenida el 5 de Agosto de 2011, [http://www.cedre.fr/en/spill/deepwater\\_horizon/response-atsea.php](http://www.cedre.fr/en/spill/deepwater_horizon/response-atsea.php).

Ciocan, C.M., Puinean, M.A., Leon E.C., Hill E.M., Minier C., Osada M., Itoh N., Rotchell, M. (2010). Endocrine Disruption, Reproductive Cycle and Pollutants in Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Contaminants*. 121-126.

CETS, Commission on Engineering and Technical Systems National Research Council. Committee on Effectiveness of Oil Spill Dispersants Marine Board, (1989). Using Oil Spill Dispersants on the Sea. National Academy Press. Washington D.C.

Daston, G.P., Cook, C.J., Kavlock R.J., (2003). Uncertainties for Endocrine Disrupters: Our View on Progress. *Toxicological Sciences* 74: 245-252.

Granmo, A., Ekelund, R., Magnusson, K., Berggren, M. (1989) Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Pollution*. 59:2, 115-127.

Foster, W.G., Agzarian, J. (2008) Toward less confusing terminology in endocrine disruptor research. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 11: 152-161.

Gagné, F., Blaise, C. (2000). Organic Alkali-Labile Phosphates in Biological Materials: A Generic Assay to Detect Vitellogenin in Biological Tissues. *Environmental Toxicology*. 15: 243-247.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S. (2002). Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Marine Environmental Research*. 53: 295-310.

George-Ares, A., J.R. Clark, (1997) Acute Aquatic Toxicity of Three Corexit Products: An Overview. Proceedings of the 1997 International Oil Spill Conference, American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp 1007-1008.

Giger W., Brunner, P.H., Schaffner C. (1984). 4-nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants. *Science*. 225: 4662, 623-625.

Goksøyr, A. (2006). Endocrine disruptors in the marine environment: Mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 69: 175-184.

Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R. (2006). Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish-Biomarkers As “Signposts”, Not “Traffic Lights,” in Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*. 114: 106-114.

Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., Minier, C., (2008). Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 147 261-272.

Kimbrough, K. L., W. E. Johnson, G. G. Lauenstein, J. D. Christensen and D. A. Apeti. (2008). An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation’s Coastal Zone. Ed. Silver Spring, MD. Reporte Técnico de la NOAA. 105 p.

Lagos, C.I. (1982) Acondicionamiento del mejillón *Mytilus californianus* en laboratorio y su efecto en el índice gonadal. Tesis de Oceanólogo. Universidad Autónoma de Baja California. 68 pp.

Lanno R.P., Hickie, B.E, Dixon, D.G. (1989). Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology. *Hydrobiologia.*, 188/189:525-531.

Lovett, R. (2010) Oil Spill's toxic trade-off. Nature Publishing Group. Consultado el 9 de Febrero de 2012, Página web de Nature, [www.nature.com/news/2010/101110/full/news.2010597.html](http://www.nature.com/news/2010/101110/full/news.2010597.html)

Lowry, O.H., Rosenburgh, N.J. Farr A.L., Randall R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *Journal of Biological Chemistry.* 193: 265-275.

Madigou, T., Le Goff, P., Salbert, G., Cravedi, J.P., Segner, H., Pakdel, F., Valotaire, Y., (2001). Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology.* 53: 173-186.

Marin, M.G., Matozzo, V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin.* 48: 835-839.

McCarthy, J. F., and L. R. Shugart (eds.). (1990). Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers. Chelsea, Mich. 457pp

Oehlmann, J., U. Schulte-Oehlmann. (2003). Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Applied Chemistry*. 75: 2207-2218.

OMS, Organización Mundial de la Salud, Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Kraak, G.V.D. (Eds) (2002). Global Assessment of the State-Of-The-Science of Endocrine Disruptors. Obtenida el 5 de Agosto de 2011, de [http://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/)

Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P. (2006). Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels exposed to Endocrine Disruptors. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*. 50: 361-369.

Puinean, A.M., Labadie, P., Hill, E.M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard I.P., Rotchell J.M. (2006). Laboratory exposure to 17 $\beta$ -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 79: 376-383.

Rand, G.M. (1985) *Behavior*. En Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (221-263). Estados Unidos de America: Hemisphere Publishing Corporation.

Ricciardi F., Matozzo V., Marin, M.G. (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.

Riffeser M., Hock B. (2002). Vitellogenin levels in mussel hemolymph—a suitable biomarker for the exposure to estrogens?. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 132: 75-84.

Robertson, C., Krauss C. (2010, 2 de Agosto). Gulf Spill Is the Largest of Its Kind, Scientists Say. *The New York Times*, p. A14.

Scopes, R.K. (1994). *Protein purification: principles and practice*. Estados Unidos de America: Springer, 380 pp.

Singer, M.M., George, S., Jacobson, S., Lee, I., Weetman, L.L., Tjeerdema R.S., Sowby, M.L.(1995). Acute Toxicity of the Oil Dispersant Corexit 9554 to Marine Organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 32: 81-86.

Smart, R.C., Hodgson, E. (Eds). (2008). *Molecular and Biochemical Toxicology*. Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein C. (1991). p-Nonyl-Phenol: An Estrogenic Xenobiotic Released from "Modified" Polystyrene. *Environmental Health Perspectives*. 92: 167-173.

Toxipedia (2011). NOKOMIS 3-F4. Consultado el 5 de Noviembre de 2011, página web de Toxipedia. <http://toxipedia.org/display.toxipedia/NOKOMIS+3F4>

US EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1740 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Marine. Consultado el 19 de Diciembre de 2011, Environmental Protection Agency, página web de la Agencia de Protección al Ambiente.[http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts/850-1740.pdf](http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-1740.pdf)

US EPA (1997) Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Environmental Protection Agency, página web conmemorativa a las publicaciones de la Agencia de Protección al Ambiente:  
<http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/ENDOCRINE.PDF>

US EPA, Jackson, L.P. (2010a). EPA: BP must significantly scale back the overall use of dispersants. Consultado el 5 de Agosto de 2011, Environmental Protection Agency, página web conmemorativa al derrame de petróleo BP en el Golfo de México:  
<http://www.epa.gov/bpspill/dispersants/Rainey-letter-052610.pdf>

US EPA.(2010c). Technical Overview of Ecological Risk Assessment Analysis Phase: Ecological Effects Characterization, Ecotoxicity Categories for Terrestrial and Aquatic Organism. Consultado el 1 de Diciembre de 2011, Environmental Protection Agency, página web de la Agencia de Protección al Ambiente.  
[http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk\\_ders/toera\\_analysis\\_eco.htm#Ecotox](http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm#Ecotox).

Zar, J.H. (2010). Biostatistical Analysis. 5ta. Estados Unidos. Pearson Prentice Hall. 948 pp.