



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Maestría en Recursos Bióticos

**ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN ESTROGÉNICA Y SUS EFECTOS EN LA
FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA LISA BLANCA *MUGIL CUREMA* EN TRES
SISTEMAS ESTUARINOS DE SINALOA**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN RECURSOS BIÓTICOS**

Presenta

Pablo Alejandro Hernández Solís

Dirigido por

Dra. Teresa García Gasca
Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, México
Junio, 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Maestría en Recursos Bióticos

ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN ESTROGÉNICA Y SUS EFECTOS EN LA FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE LA LISA BLANCA *MUGIL CUREMA* EN TRES SISTEMAS ESTUARINOS DE SINALOA

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN RECURSOS BIÓTICOS

Presenta

Pablo Alejandro Hernández Solís

Dirigido por

Dra. Teresa García Gasca y Dra. Silvia Alejandra García Gasca

SINODALES

Dra. Teresa García Gasca
Presidente

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Secretario

Dr. Edmundo Díaz Pardo
Vocal

Dr. Miguel Betancourt Lozano
Suplente

Dr. Raúl Pineda López
Suplente

Biólogo Jaime Angeles Angeles
Director de la Facultad de Ciencias Naturales

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, México
Junio, 2010

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO (CIAD-MAZATLÁN) BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ALEJANDRA GARCÍA GASCA Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA

Resumen.

Las lagunas costeras son zonas de refugio y criaderos naturales para muchas especies de organismos acuáticos y en los últimos años han sufrido cambios por sobreexplotación y contaminación. Los interruptores endocrinos constituyen un conjunto heterogéneo de compuestos químicos capaces de alterar el equilibrio hormonal. En trabajos previos se han encontrado malformaciones y hermafroditismo de individuos de lisa blanca (*Mugil curema*), lo que sugiere una posible contaminación por este tipo de compuestos. El objetivo del presente trabajo fue determinar si existe contaminación estrogénica en tres estuarios de Sinaloa (Ensenada del Pabellón, Estero de Urías y Estero de Teacapán). Se realizaron 2 colectas de sedimentos, una al final de la época de lluvias: octubre-noviembre del 2005 y otra en época de secas: marzo-abril del 2006, en dos puntos diferentes de cada laguna; además se recolectaron un total de 504 organismos de la especie *M. curema* residentes de los esteros. Se tomaron parámetros morfométricos *in situ* de los individuos, se calculó el índice gonadosomático y se hicieron análisis histológicos de la gónada para determinar la maduración gonádica, posibles malformaciones y buscar hermafroditismo. No se encontraron animales con gónadas intersex, la proporción global entre hembras y machos fue de 8:1, se encontró concordancia entre los estadios de maduración para el caso de Ensenada del Pabellón y Urías. En Teacapán se observaron dos picos reproductivos y elevada expresión de vitelogenina en machos. Se extrajo el agua intersticial de los sedimentos y se realizaron bioensayos con células de cáncer de mama responsivas a estrógeno (ZR-75-1). No se observó efecto estrogénico en las muestras estudiadas por el contrario, todas las muestras presentaron efecto citotóxico hasta una dilución de $1:10^{-6}$ en función de la concentración para el caso de Ensenada del Pabellón y Teacapán mientras que en Urías el efecto no fue dependiente de la concentración. La concentración de lactato deshidrogenasa como indicador de citotoxicidad fue mayor al 70% en casi todos los casos. La expresión del receptor de estrógeno fue alta en el caso de células tratadas con agua intersticial de la época de secas para Ensenada del Pabellón y Teacapán. Los resultados obtenidos sugieren presencia de estrógenos ambientales en el estuario de Teacapán sin embargo, el efecto *in vitro* fue probablemente enmascarado por la presencia de contaminantes citotóxicos. Será necesario aislar los contaminantes de las muestras de agua intersticial para determinar sus efectos biológicos.

Palabras clave: Citotoxicidad, interruptor endocrino, estrógeno, *Mugil curema*, vitelogenina.

Summary.

Coastal lagoons are areas of natural shelter and breeding for many species of aquatic organisms and, in recent years, they have been affected by over-fishing and pollution. Endocrine disruptors are a heterogeneous group of chemical compounds capable of disrupting the hormonal balance. In previous works, gonad malformations and one hermaphrodite individual of the white mullet (*Mugil curema*) were found, suggesting possible contamination by endocrine disruptors. The purpose of this study was to determine estrogenic pollution in three estuaries of Sinaloa (Ensenada de Pabellon, Urias Estuary and Teacapan Estuary). Sediments were collected twice in a one-year period, one during the rainy season: October-November 2005 and the other during the dry season: March-April 2006, at two different sites inside each estuary. Also 504 specimens of *M. curema* were collected from the three estuaries. Morphometric parameters were taken *in situ*, the gonadosomatic index was calculated and histological analysis was performed in order to determine gonadal maturation, possible defects or hermaphroditism. No intersex gonads were found, the overall ratio between females and males was 8:1, and gonadic developmental stages were consistent in Urias and Ensenada del Pabellon. In Teacapan, however, two reproductive peaks were observed, as well as higher expression of vitellogenin in males. Pore water was extracted from sediments and bioassays were conducted on estrogen responsive breast cancer cells (ZR-75-1). No estrogenic effect was observed in the samples; nevertheless, all of them showed a cytotoxic effect up to $1:10^{-6}$ dilution. Except for Urias, cytotoxicity was concentration-dependent. Lactate dehydrogenase concentration as a cytotoxicity indicator was higher than 70% in almost all cases. The expression of the estrogen receptor was higher in cells treated with pore water collected during the dry season from Ensenada del Pabellon and Teacapan samples. These results suggest the presence of endocrine disruptors in the Teacapan estuary; however the *in vitro* effect was probably masked by the presence of cytotoxic contaminants. It will be necessary to isolate the contaminants from pore water samples in order to determine their biological effects.

Key words: Cytotoxicity, endocrine disruptor, estrogen, *Mugil curema*, vitellogenin.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa García Gasca por su apoyo y dirección, gracias a los cuales esta tesis llegó a su término.

A la Dra. Alejandra García Gasca, Dr. Miguel Betancourt Lozano, Rubí Cornejo por su apoyo en el CIAD – Mazatlán.

Al Laboratorio de Biología Molecular de la UAQ: Rosario Botello Pacheco, Josué López Martínez por su colaboración y apoyo técnico.

Al Dr. Edmundo Díaz Pardo, al Dr. Raúl Pineda, por sus acertadas observaciones y su guía. Al Dr. Carlos López y a Heli Coronel, por su guía, su sinceridad y su calidez.

A mis padres Luz María Solís Anzaldo y Adrian Alejandro Hernández Aguiñaga, mi Hermano Rodolfo, mi cuñada Erika Herrera, Luz Adriana, Alejandro, mi abuela, Luz María Anzaldo Arroyo, mi tía Laura Hernández Aguiñaga, por su cariño y empuje, su apoyo y comprensión en cada una de las etapas del camino de este trabajo.

Mis Amigos: Mi segunda familia los Azaola Rodríguez, mi ma Fernanda Rodríguez, mis hermanos Emilio, Meme, Wicha; Pilar Rodríguez, Luis Andrés, Edgar, Alejandro Vázquez Romay, Ricardo Inchaurregui, Elisa, Andrés Rendón, por abrirme las puertas de la amistad y brindarme su cariño y compañía.

En especial a mis ángeles guardianes: Tere, Carmen, Fernanda, Lucy, Alejandro, Laura, Emilio, Carlos, Wera, por estar ahí cuando los necesité, en mis días negros, en mis días blancos, dando ese apoyo particular en el que pude descansar o seguir de pie... ¡a todos gracias!

Tere, gracias por ser quien eres, por los consejos, la guía, el camino, el apoyo, por abrirme las puertas de tu casa y de tu amistad y el ser cálido que te caracteriza.

Lucy y Alejandro: por estar ahí, por sanarme y darme el espacio para crecer, por apoyarme, por su amistad y soporte.

A los Azaola Rodríguez: por las ganas de convivir, gracias por abrirme las puertas y dejarme entrar en la Familia, gracias por el espacio.

A Carmen Mejía por todo su apoyo y cariño, la convivencia y las pláticas, la amistad, y los detalles, las sonrisas y toda tu calidez, gracias.

Al Banco Santander a través del programa UNIVERSIA por el apoyo económico durante la estancia en Mazatlán. A CONACYT por el apoyo para la realización del proyecto CONACYT FOSEMARNAT – 2004-01-199 del cual se deriva esta Tesis.

A mis padres... Para las personas más importantes de mi vida que sin su apoyo no lo hubiera logrado, que gracias a su esfuerzo y cariño incondicional pude terminar esta etapa tan importante de mi vida.

A mi hermano y su familia por darme su apoyo total.

A mis amigos TODOS!!! Se dice que son la familia que se escoge...

no podría estar más de acuerdo.

Con Cariño

Pablo

Índice General

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 <i>Mugil curema</i>	3
2.2 Contaminación de lagunas costeras.....	6
2.2.1 Interruptores o alteradores endocrinos.....	8
2.2.2 Organismos bioindicadores.....	12
2.3 Contaminación en lagunas costeras de Mazatlán, Sinaloa, México.....	13
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Particulares.....	18
6. Materiales y Métodos.....	19
6.1 Área de estudio.....	19
6.2 Colecta de organismos y agua intersticial.....	21
6.3 Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo.....	22
6.4 Estudio del efecto estrogénico en peces.....	22
6.4.1 Procesamiento de organismos y fijación de muestras en campo.....	22
6.4.2 Análisis histológico.....	22
6.4.3 Índices de condición biológica.....	25
6.4.4 Análisis de la expresión de vitelogenina.....	25

6.5 Estudio del efecto estrogénico en células responsivas a estrógenos	26
6.5.1 Extracción de agua intersticial de los sedimentos	26
6.5.2 Bioensayo sobre células responsivas a estrógenos (<i>E-screen</i>).....	27
6.5.3 Expresión del Receptor de estrógeno β	28
6.6 Análisis estadístico.....	29
7. Resultados y Discusión	30
7.1 Estudio de efecto estrogénico en peces.....	30
7.1.1 Descripción de la muestra colectada.....	30
7.1.2 Estadíos de maduración gonádica y ciclos reproductivos.....	32
7.1.3 Índice Gonadosomático (IGS)	39
7.1.5 Expresión de vitelogenina en machos.....	41
7.2 Bioensayo sobre células responsivas a estrógenos (<i>E-screen</i>).....	42
7.2.1. Parámetros experimentales de los controles: Curva dosis-respuesta de estradiol y curva dosis-respuesta de DMSO.....	42
7.2.2 Receptor de Estrógeno	55
8 Conclusiones.....	58
9. Referencias	60

Índice de Figuras

Figura 1 Ecosistemas de estudio en orden latitudinal de norte a sur.....	19
Figura 2 Proporción de sexos de organismo colectados dentro de la zona de estudio.....	31
Figura 3 Cortes histológicos de gónadas de hembras.....	33
Figura 4 Cortes histológicos de gónadas de machos.....	33
Figura 5 Tipos de alteraciones presentes en la zona de estudio.....	34
Figura 6 Proporción de alteraciones presentes en los organismos.....	34
Figura 7 Estadíos de maduración gonádica en el Estero de Ensenada Pabellón.....	35
Figura 8 Estadíos de maduración gonádica en el Estero de Urías.....	36
Figura 9 Estadíos de maduración gonádica en el Estero de Teacapán.....	37
Figura 10 Comparación temporal del Índice Gonadosomático.....	40
Figura 11 Expresión de vitelogenina en machos de las tres zonas de estudio.....	43
Figura 12 Curva Dosis-Respuesta del E2 sobre células de cáncer de mama ZR-75-1.....	44
Figura 13 Efecto del extracto de agua intersticial de Ensenada del Pabellón Mapachera.....	46
Figura 14 Efecto del extracto de agua intersticial de Ensenada Pabellón Guamuchilera.....	47
Figura 15 Efecto del extracto de agua intersticial de Teacapán Boca.....	48
Figura 16 Efecto del extracto de agua intersticial de Teacapán Cruces.....	50
Figura 17 Efecto del extracto de agua intersticial de Urías Juárez.....	52
Figura 18 Efecto del extracto de agua intersticial de Urías Sirena.....	53
Figura 19 Porcentaje de LDH en medios de cultivo de células ZR-75-1.....	54
Figura 20 Expresión del RE β en células de cáncer de mama ZR-75.....	57

Índice de Tablas

<i>Tabla 1 .Plaguicidas detectados dentro de los tres sistemas estuarinos de Sinaloa</i>	15
<i>Tabla 2 Concentración de metales pesados (ppm en peso seco) en tejidos blandos de mejillones (<i>Mytella strigata</i>) en tres lagunas costeras de Sinaloa 2005-2006</i>	16
<i>Tabla 3 Concentraciones de hidrocarburos totales (mg kg^{-1}) encontrados durante los muestreos realizados para las zonas de estudio en verano-otoño del 2005 y primavera del 2006</i>	16
<i>Tabla 4 Volúmenes de DMSO utilizados para la re suspensión de las muestras de agua intersticial</i>	27

1. Introducción

En México, la pesquería de lisa está soportada por dos especies: *Mugil cephalus Linneaus* y *Mugil curema Valenciennes*. Ambas presentan características morfológicas semejantes, habitan ecosistemas comunes y sus hábitos alimenticios y de reproducción son similares (Vasconcelos *et al.*, 1996). Debido a la calidad nutritiva de su carne, constituyen un recurso clave para los países en desarrollo y por su valor proteico es de consumo inmediato en las poblaciones locales. Es objeto de cultivo en algunos países, principalmente en Israel, Taiwán y en la región Indo pacífica (Bardach *et al.*, 1986).

El hábitat natural de *Mugil curema* son las lagunas costeras y estuarios. Entre los factores que pueden afectar a las lisas existen diferentes tipos de contaminantes, con mayor relevancia los bioacumulativos y aquellos que por su naturaleza generan desequilibrio a nivel endocrino. Los compuestos que alteran la función endocrina (entre los que están los estrógenos ambientales) son sustancias ajenas al organismo que alteran el sistema hormonal provocando desde cambios en la morfología, hasta alteraciones en la descendencia o daño genético. Son hormonas o compuestos que mimetizan hormonas en el ambiente y pueden unirse a receptores de estrógenos o andrógenos alterando la transcripción de genes blanco (Santamarta, 2002).

Un gran número de sustancias químicas que se vierten al medio ambiente tienen potencial para perturbar el sistema endocrino de los animales, incluidos los seres humanos. Entre ellas se encuentran las sustancias persistentes, bioacumulativas y órgano halógenas que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), las sustancias químicas industriales, otros productos sintéticos y algunos metales pesados (<http://www.consumaseguridad.com>).

La dispersión de compuestos organoclorados en el ambiente marino tiene sus principales rutas de entrada en los escurrimientos, transporte atmosférico y aportes directos. Los insecticidas (DDT, dieldrin, aldrin, heptacloro, lindano, entre otros) y compuestos bifenilos policlorinados (PCBs, por sus siglas en inglés) utilizados en la industria son de baja

polaridad y alta solubilidad en lípidos, por lo que se concentran en grasas de peces e invertebrados acuáticos directamente o a través de la cadena trófica (Rosales-Hoz, 1979).

Muchas poblaciones de animales han sido afectadas ya por estas sustancias. Entre las repercusiones figuran la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación en aves, peces y tortugas; graves deformidades de nacimiento en aves, peces y tortugas; anormalidades metabólicas en aves, peces y mamíferos; anormalidades de comportamiento en aves y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos. También se ha observado desmasculinización, desfeminización, masculinización o feminización en peces, aves y mamíferos (<http://www.consumaseguridad.com>).

En 1993, se publicó por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces. Los peces macho capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentaron características sexuales masculinas y femeninas. Se observó también la producción de vitelogenina en el hígado de los peces macho, una proteína sintetizada normalmente por las hembras como respuesta a una señal estrogénica. Varias sustancias químicas, especialmente los alquilfenoles encontrados en detergentes y plásticos, se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes (Jobling y Sumpter, 1993). Numerosos estudios han asociado patologías en distintas especies animales con la exposición a contaminantes medio ambientales con actividad hormonal (Colborn *et al.*, 1993; Colborn *et al.*, 1996).

Dentro de las lagunas que se encuentran en el estado de Sinaloa se han reportado cambios en la fisiología reproductiva de *M. curema*, así como en la morfología del organismo en órganos internos y alteraciones en la reproducción, probablemente por la contaminación de desechos urbanos e industriales en los esteros (Ríos-Sicairos, 2005).

En este sentido, el presente trabajo plantea determinar si existe contaminación por alteradores endocrinos y si éstos son de tipo estrogénico, que puedan provocar cambios en la fisiología reproductiva de *Mugil curema*.

2. ANTECEDENTES.

2.1 *Mugil curema*

2.1.1 Producción e importancia económica

La pesquería de lisa se realiza en las aguas costeras, tropicales y templadas del mundo. Posee una importancia considerable en México y regiones de Centro y Sudamérica, entre otras (Nash *et al.*, 1980). En el litoral del Pacífico, las estadísticas de producción registran a *M. curema* como liseta, lisa blanca y lisa plateada y a *M. cephalus* como lebrancha. (SEMARNAT, 1999). Estas especies habitan en la zona costera con fondos de tipo arenoso y areno-lodoso donde forman cardúmenes y realizan desplazamientos periódicos entre el mar y las lagunas costeras, estuarios y aguas continentales. Castro-Aguirre y colaboradores (1999) relacionaron la invasión y abundancia de estos peces en ambientes mixohalinos con cambios neurohormonales y ecofisiológicos, resaltando su desarrollada capacidad osmorreguladora, lo cual les facilita dicha incursión. La tendencia a permanecer gran parte de su ciclo de vida dentro de los sistemas lagunares estuarinos y aguas protegidas hace que esta pesquería sea accesible a las comunidades ribereñas.

La especie tiene sexos separados, sin dimorfismo sexual externo y su fecundación es externa (Bardach *et al.*, 1986). Moe (1966) observó hermafroditismo en *M. cephalus*, señalando que el fenómeno podría ser común, pero no hay información suficiente al respecto. En las lagunas costeras de Sinaloa, algunos ejemplares de 26 cm (Lt) poseen gónadas maduras, no obstante la talla del 50% de primera madurez es de 38 cm (Lt) (Briones-Ávila, 1994).

La importancia de la pesquería de lisa radica en que ha mantenido históricamente valores altos de producción. Desde su inicio en los años sesenta, la pesca se dirige al recurso, hasta alcanzar en la década de los años ochenta cifras por arriba de las 10,000 toneladas anuales. A nivel nacional, sólo unas cuantas especies de escama superan dicho volumen (SEMARNAT, 1999). A partir de 1999, el promedio de la captura ha disminuido progresivamente por debajo de 9,000 toneladas.

El litoral del Pacífico aporta el 34% de la producción nacional de lisa y tan sólo el 2% de lebrancha. Sinaloa es el primer productor de lisa con el 48%, 15% provienen de Nayarit, 15% de Baja California Sur, 4% de Sonora y 4% de Guerrero; el 14% restante corresponde a los otros seis estados del Pacífico. Respecto a lebrancha, el 82% de la captura nacional proviene de Chiapas y sólo otros cuatro Estados, Jalisco, Oaxaca, Colima y Baja California, capturan en total el 18% (SIC, 1971).

La captura de lisa tiene un importante valor social y económico como generadora de alimentos y empleos, porque se destina para abasto popular y carnada (SEMARNAT, 1999). La captura de la especie en Sinaloa se ha venido realizando con intensidad desde 1958, cuando se obtuvieron 165 ton sin embargo, para el año siguiente hubo una disminución a 83 ton. El comercio de la “hueva” (gónada femenina) y otros subproductos se realiza localmente pero también son producto de exportación hacia países asiáticos, constituyendo importantes beneficios para la población humana ribereña (SIC, 1970).

2.1.2 Características y hábitat

Una de las principales características que definen el comportamiento alimentario de los mugílidos es su facilidad para adaptarse a subsistir con alimento del más diverso origen, ajustando sus hábitos alimenticios según las condiciones en que se desarrolla su ciclo vital. Por lo anterior, han sido considerados por diversos autores como detritívoros, iliófagos, vegetarianos, omnívoros, fitófagos y zooplanctófagos. Son capaces de alimentarse de algas uni y pluricelulares, con lo que obtienen su energía del primer nivel trófico y también pueden adaptarse a vivir con material alimentario de muy baja calidad, no utilizado por otras especies (Yáñez-Arancibia, 1976). En 1920, Jacot señaló que *M. curema* tiene hábitos alimenticios similares a los de *M. cephalus* y los pequeños juveniles no comen crustáceos como otras especies del género, sino que sus estómagos se encuentran llenos de fango y materia orgánica.

En 1951, Thompson estudió la alimentación de *M. dobula*, de aguas australianas, encontrando detritus, diatomeas, algas filamentosas y micro fauna de moluscos en el

contenido estomacal (Yáñez-Arancibia, 1976). Drake y colaboradores (1984) estudiaron los hábitos alimenticios y su relación con la morfometría del aparato digestivo en *M. cephalus*, *M. capitto*, *M. aurantus* y *M. saliens* de las salinas de San Fernando (Cádiz, España) y concluyeron que existe una estrecha correlación entre las características morfométricas del aparato digestivo de los mugílidos y la naturaleza del alimento ingerido. Como consumidor primario facultativo, la lisa tiene un espectro trófico amplio que la ubica como especie receptora de una parte importante de micro fauna, micro flora y sedimentos de donde recibe constantemente todo tipo de contaminantes (Yáñez-Arancibia, 1976). Yáñez-Arancibia (1975) indicó que este tipo de alimentación representa un patrón relativamente definido y constante que sin embargo, puede sufrir ligeras variaciones de acuerdo a la zona o lugar, la estación del año y la disponibilidad del alimento.

Durante el período de reproducción (comúnmente conocido como corrida reproductora), las lisas se congregan en cardúmenes para emigrar a la zona pelágica costera a realizar el desove (García, 1982). Larvas y juveniles empiezan la migración de las aguas marinas hacia áreas protegidas en donde se llevará a cabo el desarrollo hasta la fase adulta (Polanco *et al.*, 1987). Cuando la madurez es alcanzada, de octubre a febrero (con mayor intensidad en diciembre y enero), emigran nuevamente hacia las aguas marinas (Briones-Ávila, 1994). Por su parte, Solomon y Ramnarine (2007) reportan que la época reproductiva de *M. curema* en la Republica de Trinidad y Tobago empieza en noviembre con un fuerte incremento en julio, justo después de las lluvias registradas en junio. Posteriormente se registró una drástica disminución en agosto, manteniéndose así los dos siguientes meses y seguido por un fuerte aumento en noviembre. La fecundidad ha sido determinada por varios autores; Thomson (1963) encontró un intervalo de 1,275,000 a 2,781,000 óvulos; Solís (1966) encontró de 1,341,000 a 2,919,000 óvulos en ejemplares de 38 y 44.5 cm de longitud patrón (Lp) respectivamente, y un promedio de 1,820,000 óvulos (Solís, 1966).

El hábitat natural de *Mugil curema*, donde pasa la mayor parte de su vida, son las lagunas costeras y estuarios. En sentido laxo, se denomina estuario a un ambiente costero

producto de la invasión del medio terrestre por aguas marinas. Sin embargo, ese concepto aparentemente sencillo incluye un gran número de accidentes costeros de características ecológicas y geomorfológicas radicalmente distintas, pues la invasión marina del medio terrestre puede producirse por diferentes razones. En costas bajas, el mar puede inundar periódicamente las áreas deprimidas más cercanas al litoral, dando lugar a terrenos pantanosos salobres que suelen denominarse marismas. Cuando se trata de lagunas costeras puntualmente conectadas con las aguas marinas se habla en cambio de albuferas. El elemento más sencillo de este sistema está constituido por la mezcla gradual de agua dulce y agua del mar, según el eje del estuario o la desembocadura del río (Yáñez-Arancibia, 1976). Ecológicamente es la manifestación de un proceso de mezcla en la que el agua dulce se mueve hacia fuera en superficie y se mezcla progresivamente con agua del mar, generándose una corriente profunda de agua marina en dirección al río. De esta forma, el río afecta a la ascensión de aguas marinas que pueden ser ricas en nutrimento. En particular, la combinación de este estuario positivo con un afloramiento costero potencia o acelera la aportación de nutrimento a la zona fótica marina (Margalef, 1983).

La complejidad ambiental de los estuarios y lagunas costeras se debe al flujo de energía que se lleva a cabo dentro y fuera de ellos. Los peces transforman energía desde fuentes primarias conduciéndola activamente a través de la trama trófica e intercambiándola a otros ecosistemas, constituyendo un agente de regulación energética (Yáñez-Arancibia y Nugent, 1977). Por otro lado, las lagunas costeras son zonas de refugio y criaderos naturales para muchas especies de peces, crustáceos y moluscos de interés comercial que en los últimos años han venido sufriendo cambios por presiones pesqueras de sobreexplotación y contaminación a distintos niveles causados por actividades antropogénicas (Álvarez-Cadena, 1983).

2.2 Contaminación de lagunas costeras.

En la actualidad, el acelerado incremento demográfico y tecnológico ha causado la modificación y deterioro de las cuencas hidrológicas y con ello problemas con la calidad de las aguas costeras. Éstas son el receptor final de descargas agrícolas, urbanas e

industriales, donde se presentan graves problemas ecológicos, socioeconómicos y de salud. Los contaminantes de origen antropogénico, principalmente los conocidos como persistentes, están ampliamente distribuidos en el medio ambiente debido a sus largos tiempos de residencia y a su habilidad para ser transportados por las cadenas alimentarias, aire y agua (Livingstone *et al.*, 2000). Desde el punto de vista biológico, una de las características más importantes de algunos xenobióticos es su lipofilicidad ya que, en función de ésta, se acumulan en los tejidos de los organismos y también son adsorbidos en las partículas suspendidas y de esta manera forman parte de los sedimentos y fondos de los cuerpos acuáticos (Safe, 1990; Widdows y Donkin, 1992; OECD, 1993). Una vez en los sedimentos, la tasa de degradación de algunos compuestos ocurre de 10 a 100 veces más lenta que en el agua (Colborn *et al.*, 1993).

Entre los plaguicidas más ampliamente utilizados alrededor del mundo se encuentran los componentes organofosforados y carbamatos (Hill, 1995), utilizados como herbicidas, nematicidas, fungicidas, insecticidas, entre otros los cuales han sustituido prácticamente a los insecticidas organoclorados en las últimas décadas (Smith, 1999). A pesar de que éstos compuestos son más fácilmente biodegradables y menos persistentes en los diferentes compartimentos ambientales (lo que disminuye su acumulación en las cadenas tróficas), muchos de ellos son muy tóxicos a organismos no blancos, como peces e invertebrados acuáticos (Mineau, 1991).

Además de problemas como anegamiento, desertificación, salinización y erosión que repercuten en las superficies regadas, otro efecto ambiental grave es la degradación de la calidad de los recursos hídricos, aguas abajo, por efecto de las sales, productos agroquímicos y lixiviados tóxicos. Recientemente se ha reconocido que la salinización de los recursos hídricos es un fenómeno importante y de gran alcance, con efectos quizá más graves para la sustentabilidad del riego que la misma salinización de los suelos. De hecho, en los últimos años se ha hecho patente que los oligoelementos tóxicos, como selenio, molibdeno y arsénico en las aguas procedentes del drenaje agrícola pueden provocar problemas de contaminación que representan una amenaza para el riego (Smith, 1987).

2.2.1 Interruptores o alteradores endocrinos.

El término interruptor endocrino (tomado del inglés *endocrine disruptor chemical*) define un conjunto diverso y heterogéneo de compuestos químicos capaces de alterar el equilibrio hormonal. Un interruptor endocrino es una sustancia ajena al organismo que altera el sistema hormonal provocando, desde cambios en la morfología, hasta alteraciones en la descendencia o daño genético (Santamarta, 2002).

El catálogo de interruptores endocrinos está experimentando un incremento constante y comprende desde productos químicos de síntesis hasta sustancias naturales. Para que un compuesto sea considerado como tal, debe causar una respuesta realmente adversa que exceda el rango normal de la homeostasis hormonal. En este contexto es preciso matizar el concepto de interruptor endocrino, los compuestos químicos que son activos *in vitro* sin haberse probado aún *in vivo*, deben considerarse interruptores endocrinos potenciales. Los interruptores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos: 1) suplantando a las hormonas naturales, 2) bloqueando su acción o 3) aumentando o disminuyendo sus niveles (Santamarta, 2002).

Las sustancias químicas alteradoras de la función endocrina no son venenos clásicos ni carcinógenos típicos, se atienen a reglas diferentes. Algunas sustancias químicas hormonalmente activas apenas parecen plantear riesgos de cáncer. En los niveles que se encuentran normalmente en el entorno, las sustancias químicas alteradoras hormonales no matan células ni atacan el ADN. Su objetivo son las hormonas, los mensajeros químicos que se mueven constantemente dentro de la red de comunicaciones del cuerpo. Los contaminantes estrogénicos interfieren con el sistema endocrino de los seres vivos, incluido el del ser humano. Un efecto visible de los estrógenos se ha visto en la fauna marina, en la que se ha observado fenómenos de feminización de peces y de invertebrados. La contaminación por estrógenos ambientales es una de las más importantes, no tan solo por sus efectos, sino por la persistencia que presenta dentro del ecosistema. Entre las sustancias químicas de efectos alteradores sobre el sistema endocrino figuran (Santamarta, 2002):

- ❖ Las dioxinas y furanos, que se generan en la producción de cloro y compuestos clorados, como el cloruro de polivinilo (PVC, por sus siglas en inglés) o los plaguicidas organoclorados, el blanqueo de la pasta de papel con cloro y la incineración de residuos.
- ❖ Los bifenilos policlorados (PCBs, por sus siglas en inglés), actualmente prohibidos. Las concentraciones en tejidos humanos han permanecido constantes en los últimos años aun cuando la mayoría de los países industrializados pusieron fin a la producción de PCBs hace más de una década. Dos tercios de los PCBs producidos en todas las épocas continúan en uso en transformadores u otros equipos eléctricos y, por consiguiente, pueden ser objeto de liberación accidental. A medida que van ascendiendo en la cadena alimentaria, la concentración de PCBs en los tejidos animales puede aumentar hasta 25 millones de veces.
- ❖ Numerosos plaguicidas, algunos prohibidos y otros no, como el DDT y sus productos de degradación, el lindano, el metoxicloro, piretroides sintéticos, herbicidas de triazina, kepona, dieldrín, vinclozolina, dicofol, clordano, el plaguicida endosulfán, entre otros.
- ❖ El hexaclorobenceno, empleado en síntesis orgánicas, como fungicida para el tratamiento de semillas y como preservador de la madera.
- ❖ Los ftalatos, utilizados en la fabricación de PVC. Los alquilfenoles, antioxidantes presentes en el poliestireno modificado y en el PVC y como productos de la degradación de los detergentes. El p-nonilfenol pertenece a la familia de sustancias químicas sintéticas llamadas alquilfenoles. Los fabricantes añaden nonilfenoles al poliestireno y al PVC, como antioxidante para que estos plásticos sean más estables y menos frágiles. Un estudio descubrió que la industria de procesamiento y envasado de alimentos utilizaba PVC que contenían alquilfenoles. Otro informó del hallazgo de contaminación por nonilfenol en agua que había pasado por cañerías de PVC. La descomposición de sustancias químicas presentes en detergentes industriales, plaguicidas y productos para el cuidado personal pueden dar origen asimismo a nonilfenol.

- ❖ El bisfenol-A, de amplio uso en la industria agroalimentaria (recubrimiento interior de los envases metálicos de estaño y envases de plástico), y por parte de los dentistas (empastes dentarios).

En 1993, se publicó por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces. En efecto, los peces machos capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentaron características sexuales masculinas y femeninas. Se observó también la producción de vitelogenina en el hígado de los peces macho, una proteína sintetizada normalmente por las hembras como respuesta a una señal estrogénica. Varias sustancias químicas, especialmente los alquilfenoles encontrados en detergentes y plásticos, se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes (Jobling y Sumpter, 1993). En resumen, en numerosos estudios se han asociado las patologías observadas en distintas especies animales con la exposición a contaminantes medio ambientales con actividad hormonal (Colborn *et al.*, 1993; Colborn *et al.*, 1996). En 1952, se documentó que las águilas calvas de Florida (EU) perdieron el instinto natural de aparearse y de crianza, así mismo se descubrió que un 80% de las águilas eran estériles. En 1970 se observó que el 80% de los polluelos de gaviotas argéneas del Lago Ontario (Grandes Lagos, EU) moría antes del salir del huevo y presentaban deformidades muy similares a los observados en pollos tratados con dioxinas en experimentos de laboratorio (Olea, 2001)

Otras observaciones medio ambientales relacionadas con la exposición masiva de poblaciones animales han ayudado a entender el problema de la alteración hormonal. Los casos recogidos en la literatura científica son múltiples. Sirva de ejemplo lo ocurrido con la población de caimanes del lago Apopka en Florida, que se expusieron al plaguicida dicofol (Keltano) tras un vertido accidental en 1980. Diez años más tarde, la población de caimanes había descendido significativamente, había aumentando la mortalidad en los huevos y la mitad de las crías nacidas languidecían y morían antes de los diez días. Se encontraron además hembras adolescentes que tenían anormalidades severas en los ovarios y presentaban niveles de estrógenos en sangre dos veces más altos de lo normal.

Por otro lado, los caimanes machos jóvenes estaban fuertemente feminizados, presentaban penes anormalmente pequeños y tenían niveles de estrógenos más altos en su sangre que los normales (Galindo-Reyes *et al.*, 2001). En los años 1990's en Inglaterra se observó la feminización de peces que vivían a la salida del vertido de depuradoras de aguas municipales. Estos peces presentaban anomalías que no se encontraban en peces de aguas abajo (Greenpeace, 1996). Aunque los efectos varían de una especie a otra y son específicos de cada sustancia química, pueden formularse cuatro enunciados generales (Santamarta, 2002):

- ❖ Los efectos de los contaminantes pueden ser distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto.
- ❖ Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto.
- ❖ El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y su evolución.
- ❖ Aunque la exposición crítica tenga lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no ser evidentes hasta la madurez del individuo.

En este sentido, la Comisión para la Cooperación Ambiental de Argentina ha hecho estudios relacionando al sector industrial con emisiones de mercurio, principalmente aquellas que requieren de procesos de incineración y plantas eléctricas, siendo transportado a través de la atmósfera, además de compuestos PCBs y subproductos indeseables (como dioxinas y furanos) en procesos de incineración de residuos municipales o médicos (Santamarta, 2002).

En cuanto a efectos cancerígenos, existe la teoría de que ciertos xenoestrógenos sintéticos pueden incrementar el riesgo de cáncer de mama por afectación inversa del metabolismo estrogénico, como algunos insecticidas que al combinarse con receptores a estrógenos en el tejido mamario, pueden inducir mutaciones de algunos genes (BRCA₁, BRCA₂ y p53) (Canales *et al.*, 2003).

2.2.2 Organismos bioindicadores

El grave impacto que estos problemas de contaminación tiene en los ecosistemas ha despertado el interés por monitorear a distintos niveles los componentes que los integran, tanto abióticos como bióticos. Estos últimos son relevantes por evidenciar directamente los efectos en las comunidades biológicas. Alrededor del mundo se han hecho estudios de organismos como bioindicadores de agentes contaminantes sobresaliendo los grupos que interactúan directamente con ellos, como es el caso de anélidos, moluscos, crustáceos y peces entre otros (Amjad y Gray, 1983; Hall *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 1999; Mihelic *et al.*, 1999; Smith y Suthers, 1999; Lester, *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2003).

Los bioindicadores son organismos que pueden reflejar cambios biológicos, químicos o físicos atribuidos a condiciones ecológicas, así como también indicar problemas de estrés ambiental. Estos cambios pueden ser la pérdida de crecimiento, fluctuación asimétrica, bioacumulación de contaminantes, daños al hígado y otros órganos, cambios en diversidad parasitaria del hospedero, alteración endocrina, cambios en la función reproductiva y/o hermafroditismo, pérdida de coordinación, condición biológica y mortalidad. En algunas enfermedades de los peces, que normalmente son benignas, la relación enfermedad-contaminante causa un factor de estrés en el organismo y la enfermedad alcanza niveles letales. Las anomalías morfohistopatológicas pueden ser cuantificadas para conocer el estado del organismo en un medio estresor. De igual manera los parásitos no solo pueden ser evaluados por su influencia en la salud del pez, sino también por sus cambios en diversidad, prevalencia, riqueza intensidad y abundancia en respuesta a estresores ambientales (Lankford, 1974).

En 1999 Körner y colaboradores propusieron el uso de células de cáncer de mama para la detección de compuestos estrogénicos en agua intersticial. Las células de cáncer de mama MCF-7 responden a la presencia de estos compuestos aumentando su proliferación.

2.3 Contaminación en lagunas costeras de Mazatlán, Sinaloa, México

Como en muchos lugares del mundo, en los últimos años el puerto de Mazatlán, Sinaloa se ha convertido en un claro ejemplo de zona contaminada, especialmente el estero de Urías que es el sistema lagunar más importante del puerto. Grandes volúmenes de desechos domésticos se descargan anualmente al sistema, tales descargas son fuente de materia orgánica, detergentes, metales pesados, compuestos endocrino-alteradores entre otros (Páez-Osuna y Osuna López, 1990; Osuna-López *et al.*, 1997).

En el parque industrial Alfredo V. Bonfil se encuentran asentadas la mayor parte de las industrias y cooperativas pesqueras del puerto, además del canal de descargas de PEMEX al que se conectan cuatro industrias, la planta de Petróleos Mexicanos, el taller de Ferrocarriles Nacionales y el rastro. Todos, sin el trato adecuado, emiten sus descargas al sistema donde se reportan altas concentraciones de cobalto, manganeso, cobre, plomo y otros metales pesados, además de ser una fuente importante de sustancias plastificantes como PCBs y derivados del aceite (Páez-Osuna y Osuna-López, 1990). La agricultura y la acuicultura también afectan al sistema con el arrastre de sustancias químicas, como insecticidas, por acción de las lluvias y recambios de agua que contienen productos utilizados para el control de enfermedades, reportando la presencia de PCBs e insecticidas en organismos. El sector naval emite descargas de combustibles, aceites y sus derivados y pinturas anti-incrustantes, provocando síntomas evidentes de degradación ambiental, lo cual pone en riesgo las especies acuáticas y, finalmente, a la población humana (Galindo-Reyes *et al.*, 2001)

Osuna-López y colaboradores (1997), midieron la distribución y la concentración de materia orgánica y metales pesados en 21 muestras de sedimento superficial del sistema Arroyo Jabalíes-Estero del Infiernillo de Mazatlán, Sinaloa. Esta zona recibe los desfuegos del drenaje municipal, urbano e industrial del 30% de la población. Los sedimentos de la zona del canal de transición y el Arroyo Jabalíes mostraron menores concentraciones de cobre, cromo, hierro, níquel, plomo y zinc, respecto a la zona del estero, la cual actúa como cuenca receptora de materiales.

Ríos-Sicairos (2005) encontró que la contaminación por desechos urbanos e industriales en el Estero de Urías en Mazatlán, Sinaloa, causa efectos como malformaciones, problemas de desarrollo, pérdida de la capacidad reproductiva máxima, alteración morfológica de órganos como el hígado y desequilibrios en la ecología parasitaria de la lisa *Mugil curema*. Estos efectos pueden ser detectados con la utilización de indicadores biológicos, por lo tanto *Mugil curema* resulta un buen bioindicador o centinela de estrés o calidad ambiental. Dentro de los factores que pueden afectar a las lisas existen diferentes tipos de contaminantes, de los cuales cobran mayor relevancia aquellos que son bioacumulativos y aquellos que por su naturaleza generan desequilibrio a nivel endocrino en de los organismos que habitan la zona de estudio. Como consumidor primario facultativo, la lisa tiene un espectro trófico amplio que la ubica como especie receptora de una parte importante de microfauna, microflora y sedimentos de donde recibe constantemente todo tipo de contaminantes (Yáñez-Arancibia, 1976).

En la región del estero de Urías, se lleva a cabo agricultura de temporal, pesca ribereña y cultivo de camarón (Berlanga, 1999). El Estero recibe contaminación por plaguicidas debido a las actividades agrícolas que se llevan a cabo en la zona (Galindo-Reyes, 2000). Otros estudios han detectado la presencia de DDVP, insecticida utilizado para el control de algunos minadores frutales, principalmente en los cultivos de mango aledaños al sistema. Recientemente se han reportado altas concentraciones de mercurio en músculo de *Mugil curema* provenientes del estero de Teacapán. Esta condición puede estar relacionada con la práctica de la minería de oro y plata de la zona serrana del sur de Sinaloa, la cual utiliza mercurio en el tratado de estos metales, siendo probablemente arrastrado por los ríos Baluarte, Cañas y sus arroyos tributarios hasta el sistema (Rodríguez-Preciado, 2004).

Estudios llevados a cabo entre 2004 y 2006 en las mismas zonas de estudio del presente trabajo mostraron la presencia de hidrocarburos como: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(123-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno (Piña-Chacón, 2008) además de los

plaguicidas mostrados en la Tabla 1 (Alejandre-Grimaldo, 2007; Garcia-Gasca et al., 2008). La concentración de metales pesados detectados entre 2005 y 2006 en tejido blando de mejillones se muestra en la Tabla 2 (Pasos-Mandujano, 2008) y la Tabla 3 muestra las concentraciones de hidrocarburos totales encontrados durante los muestreos realizados en verano-otoño del 2005 y primavera del 2006 (Garcia-Gasca *et al.*, 2008).

Tabla 1 .Plaguicidas detectados dentro de los tres sistemas estuarinos de Sinaloa

Compuesto	
Alicíclicos	Alfa-HCN
	Beta HCN
	Gamma-HCN
	Delta-HCN
Aromáticos	p, p'-DDT
	p, p'-DDD
	p,p'-DDE
Ciclodienicos	Heptacoloro
	Epóxido de heptacoloro
	Aldrin
	Dieldrin
	Endrin
	Endrin aldehido
	Endosulfán I
	Endosulfán II
Sulfato de endosulfán	
Organofosfatados	Carbofenothion
	Chlorpyrifos
	Diazinon
	Ethion
	Ethoprophos
	Fenitrothion
	Guthion
	Malathion
Parathion methilico	
Organoclorados	Aldrin
	BCH alpha
	BCH beta
	Captan
	Chlorothalon
	Cis Clordano
	Endosulfan alpha
	Endosulfan beta
	Endosulfan sulfato
	HCB
	Heptachlor
	Heptachlor epoxide
	Heptachlorobenceno
	Lindano
	Metoxychlor
op DDE	
op DDT	

Compuesto	
	pp DDE
	pp DDT
	Propaclhor
	Trans clordane

Tabla 2 Concentración de metales pesados (ppm en peso seco) en tejidos blandos de mejillones (*Mytella strigata*) en tres lagunas costeras de Sinaloa 2005-2006

Metal	PM	PG	UJ	US	TB	TC
Cu	16.474	25.389	54.180	15.650	10.412	5.844
Zn	49.122	76.394	61.834	55.761	40.882	48.532
Cd	1.013	1.219	.510	.217	2.639	.215
Pb	2.067	2.934	2.267	1.183	1.601	.709

PM: Ensenada Pabellón Mapachera. PG: Ensenada Pabellón Guamuchilera. UJ: Estero de Urías Juárez. US: Estero de Urías Sirena, TB: Estero de Teacapán Boca. TC: Estero de Teacapán Cruces.

Tabla 3 Concentraciones de hidrocarburos totales (mg kg^{-1}) encontrados durante los muestreos realizados para las zonas de estudio en verano-otoño del 2005 y primavera del 2006

	Otoño 05	Primavera 06
PM	2209.2	3435.2
PG	6950.4	3489.2
UJ	3987.4	1949.4
US	7466	1152.6
TB	1681.8	3247.2
TC	550.6	4653.2

PM: Ensenada Pabellón Mapachera. PG: Ensenada Pabellón Guamuchilera. UJ: Estero de Urías Juárez. US: Estero de Urías Sirena, TB: Estero de Teacapán Boca. TC: Estero de Teacapán Cruces.

3. JUSTIFICACIÓN

Mugil curema es la segunda especie que sostiene a la industria pesquera a nivel nacional y gran parte de esta pesca se realiza en las zonas costeras de Sinaloa. Dicha zona se encuentra en estado de deterioro por actividades antropogénicas. Debido a que los contaminantes están mayormente concentrados en la materia orgánica y sedimentos de los estuarios, éstos pueden no estar distribuidos de manera uniforme (Weis y Weis, 1994), por lo que son necesarios monitoreos integrales que incluyan una gama de biomarcadores en especies con diferente grado de sensibilidad para obtener información representativa del ecosistema.

Por lo anterior, este estudio propone conocer si existe contaminación estrogénica y, en su caso, cuantificar sus efectos sobre la alteración hormonal y reproductiva de esta especie en estuarios de la región. Esto es importante ya que es bien sabido que las pesquerías de la zona se encuentran en gran riesgo por el descenso en la producción en los últimos 20 años como consecuencia del aumento de asentamientos humanos costeros y de infraestructura pesquera e industrial.

4. HIPÓTESIS

Si existe alteración endocrina como producto de la contaminación en estuarios de Sinaloa y ésta es de tipo estrogénica, entonces los efectos pueden ser determinados mediante el uso de células responsivas a estrógeno y parámetros reproductivos de organismos residentes (en este caso la lisa blanca *M. curema*).

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si existe contaminación estrogénica en tres estuarios de Sinaloa.

Objetivos Particulares

1. Determinar las posibles malformaciones y cambios histológicos en gónadas de machos y hembras de los estuarios estudiados.
2. Determinar si existen cambios en los patrones reproductivos de la especie.
3. Calcular el Índice Gonasodomático como posible marcador de alteraciones reproductivas.
4. Determinar la expresión de vitelogenina en machos como marcador de disfunción endocrina.
5. Medir la actividad estrogénica que presentan los contaminantes presentes en agua intersticial de tres lagunas costeras de Sinaloa mediante análisis de proliferación de células humanas responsivas a estrógenos (E-screen).
6. Determinar si la exposición a los contaminantes afecta la expresión del receptor de estrógeno en las células utilizadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

Con la finalidad de definir el grado de alteración que presentan de forma individual, realizar comparaciones entre ellos, y medir las condiciones de contaminación presentes a nivel regional, se seleccionaron tres sistemas lagunares-estuarinos del sureste del Golfo de California (Figura 1).

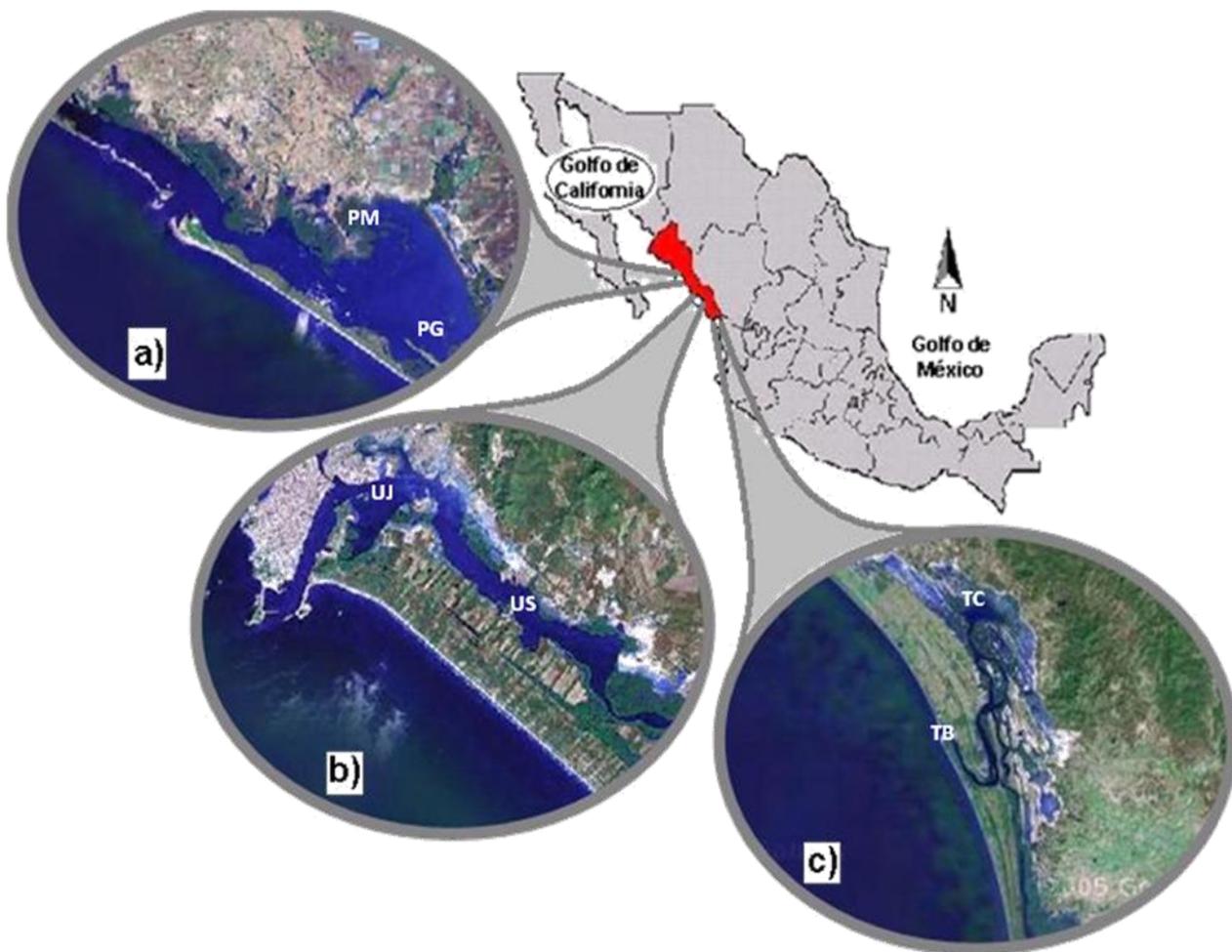


Figura 1 Ecosistemas de estudio en orden latitudinal de norte a sur. a) Ensenada del Pabellón, en donde se consideraron dos sitios: Pabellón Mapachera (PM) y Pabellón Guamuchilera (PG); b) Estero de Urías en donde se consideraron dos sitios Urías Juárez (UJ) y Urías Sirena (US) y c) Estero Teacapán en donde se consideraron los puntos de Teacapán Cruces (TC) y Teacapán Boca (TB) (Ríos-Sicairos. 2005).

- a) Ensenada del Pabellón (zona agrícola). Está localizado en el litoral costero del centro del estado de Sinaloa, entre los 24° 20' y 24° 50' de latitud norte y los 107° 20' y 107° 58' de longitud oeste. El sistema lagunar se encuentra asociado a varios esteros y lagunas interiores, de las cuales destacan por su tamaño Bataoto, Caimanero y Chiricahueto y forman un complejo estuarino de aproximadamente 460 km², incluyendo 100 km² de manglar. El complejo recibe diversas descargas agrícolas a través de distintos canales de drenaje. Se han reportado plaguicidas y metales pesados en el sistema (Izaguirre-Fierro *et al.*, 1985) y recientemente también recibe desechos de granjas de camarón (Galindo-Reyes, 2000, Ríos-Sicairos, 2005).
- b) Estero de Urías (zona urbana-industrial). Está localizado al sur de Sinaloa, entre los 23° 10' y 23° 13' de latitud norte y los 106° 20' y 106° 25' de longitud oeste. Está conformado por varios esteros tributarios de los cuales resaltan el Estero del Infiernillo, Estero Confites y Estero de la Sirena. El sistema tiene una extensión de 17 Km. y un área de 880 hectáreas, cuenta con una profundidad menor a 1 metro en los márgenes y llanuras de inundación y alcanza los 10 metros en el canal de navegación. Los agentes causantes de la contaminación son muy diversos, entre los cuales se encuentran: la planta tratadora de aguas negras, las plantas procesadoras de alimentos pesqueros, el canal de PEMEX y los embarcaderos que albergan las flotas pesqueras y comerciales, la planta termoeléctrica, agricultura de temporal, camaronicultura y el turismo (Páez-Osuna *et al.*, 1990; Ríos-Sicairos, 2005).
- c) Estero Teacapán (zona agropecuaria-minera). Forma parte del complejo lagunar llamado Teacapán-Agua Brava-Marismas Nacionales, localizado al sur del estado de Sinaloa. Colinda con el estado de Nayarit y sus coordenadas son entre los 22° 28' y 22° 45' latitud norte y los 105° 38' y 105° 46' longitud oeste. El Estero Teacapán se comunica al norte con el sistema litoral del Estero de Majahual mediante el Estero del Maíz. El sistema de Majahual está conformado por las

lagunas de: Cerritos, Grande, Cañales, Sábalos y Agua Grande, recibiendo los afluentes de los ríos Baluarte y Cañas constituyendo un ecosistema de aproximadamente 5 mil hectáreas (Contreras, 1993). Geológicamente, el origen de este sistema lagunar costero se clasifica como tipo III-A, (Lankford, 1977) esto es, depresiones inundadas al borde continental, protegidas por barreras arenosas producidas por el oleaje y la corriente litoral (Ríos-Sicairos, 2005).

6.2 Colecta de organismos y agua intersticial

Se realizaron colectas de organismos en cada sitio de estudio entre verano del 2005 y verano del 2006. Se utilizaron lanchas de fibra de vidrio con motor fuera de borda equipadas con un vivero de flujo continuo de agua para mantener a los organismos vivos en condiciones adecuadas y similares al medio externo hasta su análisis. Se recolectaron 30 lisas dentro de cada sistema en julio 2005, octubre-noviembre 2005, marzo-abril 2006 y julio 2006 empleando una atarraya con luz de malla de dos pulgadas y nueve metros de diámetro, operando entre 40 y 50 cm. de profundidad. Por otro lado, se tomaron dos litros de sedimento en épocas climáticas contrastantes: final de la época de lluvias (octubre-noviembre, 2005), época de secas o estiaje (marzo-abril, 2006). Para el caso de Ensenada del Pabellón se recolectó sedimento de un punto cercano a la zona de descargas antropogénicas (PM) y el otro punto se localizó en más alejado de la actividad antropogénica (PG). En el caso de Urías se consideraron los puntos UJ y US, los dos próximos a la actividad antropogénica pero de fuentes distintas: UJ asociado a contaminación doméstica e industrial (plantas procesadoras de pescado) y US asociado a contaminación derivada de la planta termoeléctrica y de una granja de camarón. Para el caso de Teacapán se consideró el punto de Cruces (TC), cercano a la actividad antropogénica y uno más alejado (TB). Los sedimentos se recolectaron con draga y se almacenaron en frascos de vidrio, en hielo para su transportación.

6.3 Parámetros fisicoquímicos de los sitios de muestreo

Los parámetros fisicoquímicos que se registraron fueron la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la columna de agua. Para medir la temperatura se utilizó un termómetro marca Brannan (0 a 400 °C; ± 1 °C). La salinidad fue tomada con un refractómetro (Fisher) con compensador automático de temperatura (1 a 100 ups; ± 1 ups). El oxígeno disuelto se registró con un oxímetro (YSI modelo 95; ± 0.1 mg/L).

6.4 Estudio del efecto estrogénico en peces

6.4.1 Procesamiento de organismos y fijación de muestras en campo

Se procesaron por muestreo y localidad, de forma inmediata a su captura, 30 lisas para la obtención tanto de registros morfométricos como de los tejidos que fueron analizados a nivel molecular e histológico. Se tomaron los datos biométricos de longitud total (Lt), longitud patrón (Lp) y altura máxima (A) con la ayuda de un ictiómetro convencional de 60 ± 0.1 cm (Hubbs y Lagler, 1958). Asimismo, se registró el peso del organismo con una balanza marca OHAUS E1D110 (± 0.1 g). Posteriormente los peces fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los hígados y las gónadas utilizando solución salina para evitar contaminación de los tejidos con el medio. Las gónadas se pesaron y una muestra de tejido fue fijada en formaldehído al 4 % para su análisis histológico (Luna, 1968). Los hígados fueron preservados en solución RNAlater (Ambion) para extracción de RNA total. Todos los organismos se etiquetaron y fueron trasladados al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán para análisis posteriores.

6.4.2 Análisis histológico

Los tejidos fijados se transfirieron a alcohol al 70%, fueron deshidratados en un histocasette e introducidos en un histoquinet marca Tissue Tek II mod. 44640-B. Se embebieron con parafina en un molde utilizando un histoembebedor marca Leica Jung Histoembedder. A continuación se cortaron a 5 micras de grosor en un microtomo marca Jung Biocut Shandon 820 y fueron desparafinados a 50 °C. La rehidratación y tinción de los

tejidos se realizó en el tren de tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Se montaron los tejidos teñidos con resina sintética en cubreobjetos y finalmente se dejaron secar a 37 °C.

Los cortes histológicos fueron observados en un microscopio óptico marca OLYMPUS Bx60 a 5x, 10x, 40x y 60x. La identificación de los estadios de maduración gonádica fue realizada histológicamente para los organismos de cada muestra tomando como base los estadios de maduración testicular establecidos por Gutiérrez-Rivera (2002) para *Sphoeroides annulatus* (Tabla 4) y los estadios de maduración ovárica establecidos por Solomon y Ramnarine (2007) para *Mugil curema* (Tabla 5), con las modificaciones necesarias.

Tabla 4 Descripción de los estadios de maduración testicular de *M. curema* identificados en el Estero Teacapán, Ensenada Pabellón, y Estero de Urías, Mazatlán Sinaloa.

<i>Estadio</i>	<i>Descripción</i>
Espermatogénesis temprana	Tejido conjuntivo color rosa que adquiere con la tinción H&E, presenta espermatogonias y espermatocitos ambas estructuras basófilas por su tamaño. Estructuras como vasos sanguíneos se aprecian en esta etapa.
Espermatogénesis intermedia	Avanzada actividad espermiática. Túbulos con actividad espermiática generan espermatogonias que maduran hasta espermatozoos (parches de esperma). Todas las estructuras celulares presentes desde la etapa espermatogénica, espermatocitos tempranos y esperma maduro.
Espermatogénesis avanzada	Abundante generación de esperma. Tejido conectivo no visible por estar cubierto por espermatozoos maduros. Ninguna otra estructura celular visible.
Post-eyaculado	Túbulos sanguinolentos, flácidos y contraídos; la gónada ocupa la mitad de la longitud de la cavidad abdominal. Paredes flojas. Espermatocitos residuales.

(Gutiérrez-Rivera, 2002)

Tabla 5 Descripción de los estadios de maduración ovárica de *M. curema* identificados en el Estero Teacapán, Ensenada Pabellón, y Estero de Urías, Mazatlán Sinaloa

<i>Estadio</i>	<i>Descripción</i>
Desarrollo primario	Los ovocitos primarios se subdividen en tres categorías: 1) nucleolo-cromatina, en el cual el citoplasma de los ovocitos se tiñe rosa claro y forma un anillo alrededor del núcleo que contiene varios nucleolos basofílicos; 2) perinucleolo temprano, en el cual el diámetro de los ovocitos incrementa, tienen un citoplasma basofílico que varía en forma, el núcleo es central y contiene varios nucleolos, las células foliculares son evidentes; 3) perinucleolo tardío, en el cual el citoplasma es menos basofílico, un anillo denso se desarrolla alrededor del núcleo y muchos nucleolos están presentes en la periferia; la zona radiata puede ser visible alrededor del ovocito.
Pre-vitelogénesis	Los nucleolos basofílicos se mantienen en la periferia, el citoplasma es menos basofílico y contiene pequeñas vesículas, las cuales aparecen en la periferia y se van trasladando hacia el núcleo. Se distinguen las dos capas de células foliculares.
Vitelogénesis primaria	Los ovocitos se caracterizan por la presencia de pequeños gránulos proteicos en el citoplasma, los cuales son muy acidofílicos, aparecen primero en el cortex externo y se transportan gradualmente hacia el cortex interno, ya no se aprecian vesículas en el citoplasma.
Vitelogénesis secundaria	Los ovocitos incrementan en diámetro, el núcleo esta presente y los gránulos de yema y gotas lipídicas se llegan a fusionar.
Post-desove	Los ovocitos hidratados se colapsan, ovocitos post-ovulatorios y atrésicos están presentes.

(Solomon y Ramnarine, 2007)

6.4.3 Índices de condición biológica

Se calculó el índice gonadosomático (IGS) por medio de la ecuación propuesta por Rossenblum y colaboradores (1987), tomado de Rodríguez-Gutiérrez (1992).

$$\text{IGS} = (\text{Wg} / \text{Wt}) \times 100$$

Donde:

Wg = Peso de la gónada en g

Wt = Peso eviscerado del ejemplar en g

6.4.4 Análisis de la expresión de vitelogenina

La extracción de RNA total del hígado de peces machos y hembras se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen), seguida por un tratamiento con DNAsal (Promega). Se sintetizó el cDNA a 45° C utilizando 5 µg de RNA total en presencia de random primers y transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Las muestras de cDNA fueron después amplificadas por PCR utilizando oligos específicos para el gen de vitelogenina de *M. curema*: mcVTG-F 5' GTC AGC AGC AAA GTT CTC ATC AGC 3' y mcVTG-R 5' TCA AAC TTG ATG GGA GTC ACA AGC 3' generando un producto de 170 pb. Como control interno de la calidad y cantidad de RNA se utilizó el gen 28S rRNA de *M. curema* con los siguientes oligos: mc28S-F 5' GCG GTA CAC CTG TCA AAC GT AAC 3' y mc28S-R GAC ACC TCC TGC TTA AAA CCC AAA 3' generando un producto de 178 pb.

La cuantificación de expresión génica relativa se llevó a cabo por PCR en tiempo real utilizando SYBR green® y el método de curva estándar de acuerdo a Garcia-Gasca y colaboradores (2006). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador en tiempo real SmartCycler (Cepheid). Las reacciones de PCR fueron realizadas por duplicado bajo las siguientes condiciones: 95° C por 150 segundos y 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. Se realizaron diluciones seriadas de amplificación de Vtg y 28S rRNA para construir la curva estándar de cada gen. La curva estándar fue calculada por análisis de regresión lineal usando los valores de amplificación

(Co) del ciclo umbral (C_T) obtenidos del análisis de diluciones seriadas. Los Co de muestras desconocidas fueron calculados con la ecuación de regresión lineal: $a+b*C_T$ donde a= intersección y b=pendiente. Los valores normalizados de Co de vitelogenina para cada muestra fueron determinados dividiendo el Co de estos genes entre el Co del gen 28S rRNA, y cada muestra normalizada se dividió entre el calibrador (gónadas de hembras en desarrollo primario).

6.5 Estudio del efecto estrogénico en células responsivas a estrógenos

6.5.1 Extracción de agua intersticial de los sedimentos

La extracción del agua intersticial se llevó a cabo utilizando el método de Thomas y colaboradores (2002) con modificaciones. El sedimento fue colocado en una cubeta ligeramente inclinada a la cual previamente se le colocó un piedra de aireación de 10 cm con una manguera conectada a un sistema de vacío, que consistió en un matraz kitazato con un tapón horadado en el cual está colocada una varilla de vidrio y en la salida del matraz se conectó la manguera de la bomba de vacío. Se extrajo el agua intersticial hasta que se observara que el sedimento ya no tuviera agua. Alternativamente, el agua fue extraída por centrifugación a 3500 rpm y se pasó a través de una columna de teflón empacada con fibra de vidrio para remover el material particulado. Después, la muestra se pasó por columnas de extracción de fase sólida (C18) tratadas previamente con metanol y agua a un flujo de 10 mL/min para extraer los compuestos orgánicos. Posteriormente se eluyó con 10 mL de metanol y hexano, y el volumen se redujo a 5 mL con flujo de nitrógeno, para luego ser transferidas a viales de vidrio y secadas al vacío sin calor. Los extractos secos fueron procesados en Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se re suspendieron en DMSO de acuerdo al volumen final de extracción. Se preparó la solución stock para cada extracto en medio de cultivo libre de estrógenos con la finalidad de que la concentración final de DMSO fuera máxima del 1% de acuerdo a las concentraciones de la Tabla 6.

Tabla 4 Volúmenes de DMSO utilizados para la re suspensión de las muestras de agua intersticial

Fecha	Estación	Volumen Extraído (mL)	Vol. DMSO (μ l)
31/10/05	PM	127	12.7
31/10/05	PG	175	17.5
3/11/05	UJ	350	35
3/11/05	US	300	30.0
6/11/05	TC	194	19.4
6/11/05	TB	450	45
29/03/06	PM	494	49.4
29/03/06	PG	487	48.7
31/03/06	UJ	244	24.4
31/03/06	US	746	74.6
02/04/06	TC	517	51.7
02/04/06	TB	197	19.7

6.5.2 Bioensayo sobre células responsivas a estrógenos (*E-screen*)

El bioensayo se realizó de acuerdo a Körner y colaboradores (1999) con modificaciones. Se utilizaron células ZR-75-1 (cáncer de mama ductal humano, responsivas a estrógenos), cultivadas en medio de EAGLE Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco 12100-038) con 10% de suero fetal bovino (Gibco ref. 16000-044), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco 11140), 2 mM L-Glutamina (Gibco 25030) y 1 mM piruvato de sodio (Gibco 11360) Al medio de cultivo se le agregó Penicilina G (6.27 mg /100 mL) (SIGMA 200-710-2), estreptomycin (10 mg/100 mL) (SIGMA 223-286-0) y anfotericina B (2.5 μ g/mL) (Gibco 5290-018). Las células se incubaron a 37° C bajo atmósfera húmeda al 10% de CO₂ en cajas de cultivo de 100 mm de diámetro hasta que se lograra una confluencia de al menos el 80%

Para los experimentos, las células se sembraron en placas de 24 pozos (3x10⁴ células/pozo) y a las 24 horas se cambió el medio por las condiciones experimentales en medio de trabajo (medio libre de rojo de fenol (DMEM Gibco Cat. No.21063)) al 5% de Albumina Sérica de Bovino (ASB, Serologicals 81-006-4), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco 11140), 2 mM L-Glutamina (Gibco 25030) y 1 mM piruvato de sodio

(Gibco 11360), Penicilina G, estreptomycin y anfotericina B.

Se realizó una curva dosis–respuesta para estradiol (E2) utilizando diluciones de 1×10^{-6} mM hasta 1×10^{-10} mM con el fin de encontrar la concentración y el tiempo adecuados para provocar proliferación celular. Se realizó un recambio de medio y tratamiento al 3º y 5º días durante 6 días. La proliferación celular se determinó por recuento al microscopio utilizando un hemocitómetro.

Una vez determinada la concentración de E2 adecuada para lograr la mayor proliferación celular, se realizaron las pruebas con las muestras de agua intersticial extraídas de las zonas de estudio de acuerdo al protocolo previamente descrito. Fue necesario determinar la dosis no tóxica de DMSO sobre las células, lo que delimitó la concentración más alta utilizada para cada muestra, por lo que las diluciones probadas fueron de $1:10^2$ hasta $1:10^6$.

Para la determinación de citotoxicidad se cuantificó la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo de las células tratadas con la dilución que presentara aproximadamente el 50% de muerte celular. La LDH se determinó utilizando un kit comercial (BioVision, LDH-Cytotoxicity Assay, cat K311-400) y se comparó el nivel de LDH de las células tratadas con respecto al control.

6.5.3 Expresión del Receptor de estrógeno β

El análisis de la expresión del receptor de estrógeno (RE β) en las células de cáncer de mama ZR-75-1 se realizó mediante la extracción de RNA total de las células con Trizol (Invitrogen), seguida por un tratamiento con DNAsal (Promega). Se sintetizó cDNA a 45 °C utilizando 5 μ g de RNA total en presencia de random primers y transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Las muestras de cDNA fueron después amplificadas por PCR utilizando oligos específicos para el receptor de estrógeno β : primer izquierdo 5' - ACA GCA TTC CCA GCA ATG TCA CTA – 3' y primer derecho 5' – TCT AGC GAT CTT GCT TCA CAC CAG – 3' generando un producto de 175 pb. Las condiciones de amplificación fueron: Un ciclo a

94°C 2 min y 35 ciclos de 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72 °C 1 min.

6.6 Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre las muestras se realizaron análisis de varianza simple (ANOVA de una vía) seguidos por pruebas de comparaciones pareadas mediante el método de Tukey ($p \leq 0.05$) y entre cada tratamiento y su control mediante el método de Dunnett ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Estudio de efecto estrogénico en peces

7.1.1 Descripción de la muestra colectada

De acuerdo con Devlin y Nagahama (2002), el análisis histológico de desarrollo gonadal corresponde a estadios de maduración avanzada con el IGS mayor, tanto en hembras como en machos, por lo que puede ser utilizado para comparar la salud reproductiva de las poblaciones de cada ecosistema. En el presente estudio se prepararon cortes histológicos de gónada de 480 organismos (27.3 ± 1.4 cm de longitud total y 187.1 ± 32.7 g de peso) pertenecientes a *Mugil curema* (lisa) provenientes de los esteros de Ensenada del Pabellón (132), Urías (171), Teacapán (177), colectados entre verano del 2005 y verano del 2006. De forma global, para el caso del estero de Ensenada Pabellón, la proporción de organismos de acuerdo al sexo fue de 88.6% hembras y 11.4% machos, para Urías fue de 75% hembras y 25% machos y para el estuario de Teacapán fue de 87.5 % hembras y 12.5% machos. En el caso de la colecta realizada en julio del 2005, no se capturaron especímenes en el estuario de Ensenada Pabellón.

Se puede observar que en todos los casos existió dominancia del número de hembras sobre el de machos, incluso no se encontraron individuos macho en el estero de Urías durante el otoño del 2005 (Figura 2). Se ha establecido que la proporción de sexos en otras latitudes del Océano Pacífico y Atlántico, sin importar la época del año en la que se encuentre, tiende a ser 1:1 (Yáñez-Arancibia 1976; Collins, 1985). Aunque no se descartan alteraciones por toma de muestra, o comportamientos poblacionales propios, la proporción de sexos en este estudio de manera general fue de 8 hembras a 1 macho. Se ha demostrado que en algunas especies en estadios tempranos, que han sido expuestas a compuestos estrogénicos y otras mezclas de contaminantes, presentan alteraciones a nivel bioquímico y fenotípico en la diferenciación sexual, induciendo la feminización y el hermafroditismo (Devlin y Nagahama, 2002). La predominancia del número de hembras sobre machos no es por sí misma evidencia de feminización por estrógenos ambientales,

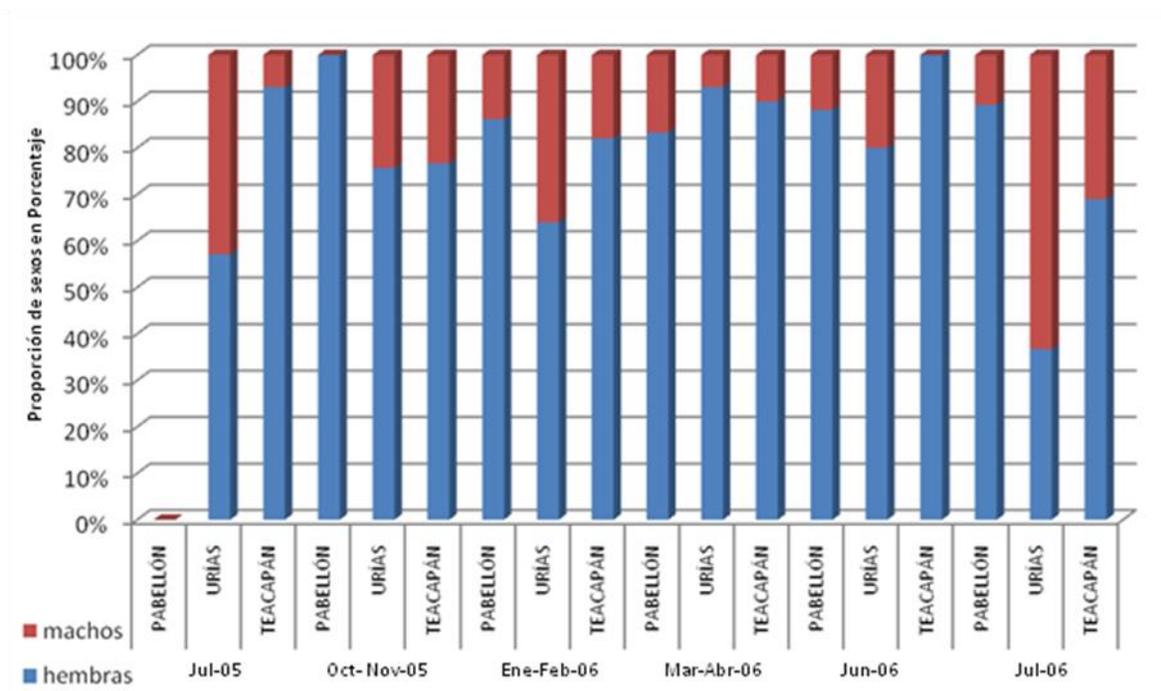


Figura 2 Proporción de sexos de organismos colectados dentro de la zona de estudio. Se colectaron individuos en las tres zonas de estudio y se clasificaron por sexo. Se observa predominancia de hembras en todos los estuarios estudiados y en todas las épocas con excepción de Uriás en el mes de julio de 2006

pero si puede considerarse como un indicador de la presencia de este tipo de compuestos, sobre todo cuando otros factores son eliminados (ej. selectividad del arte de pesca) y se cuenta con datos complementarios que aporten la evidencia (ej. biomarcadores, parámetros reproductivos, análisis químicos, entre otros) (Ríos-Sicairos, 2008).

7.1.2 Estadíos de maduración gonádica y ciclos reproductivos.

Como no existe dimorfismo sexual evidente en *Mugil curema* se disectaron los peces para observar las gónadas al microscopio y determinar el sexo por la forma, consistencia del tejido y presencia o ausencia de huevos. El análisis histológico permitió distinguir cinco estadíos de maduración gonádica para las hembras (Figura 3) y cuatro para los machos (Figura 4). Se observaron alteraciones físicas en las gónadas en el 3% del total de los organismos capturados. En la Figura 5 se observa el tipo de alteración física de acuerdo al sistema estuarino y en la Figura 6 se muestra la proporción de alteraciones totales sin embargo, los análisis histológicos realizados no mostraron alteraciones funcionales en las gónadas tanto de hembras como de machos

Los estadíos de maduración gonádica y ciclos reproductivos de los organismos colectados en Ensenada del Pabellón, en los que no se observaron alteraciones en el patrón de maduración gonádica a lo largo de un año se muestran en la Figura 7. Cabe destacar que no se colectaron especímenes en el muestreo de lluvias del 2005 ni machos en otoño del mismo año. La Figura 8 muestra los estadíos de maduración gonádica para los organismos colectados en Urías. De igual forma, no se observaron alteraciones en los patrones de madurez gonádica y el pico de maduración gonádica (vitelogénesis secundaria) para las hembras se presentó en los meses de marzo y abril en ambos estuarios. En la Figura 9 se observan las fases de maduración en individuos capturados en Teacapán. En este caso se observó un doble pico de maduración con una mayor proporción de hembras en vitelogénesis secundaria, tanto en verano-otoño del 2005 como en primavera del 2006, que podría ser debida a la presencia de estrógenos ambientales (Canales *et al.*, 2003).

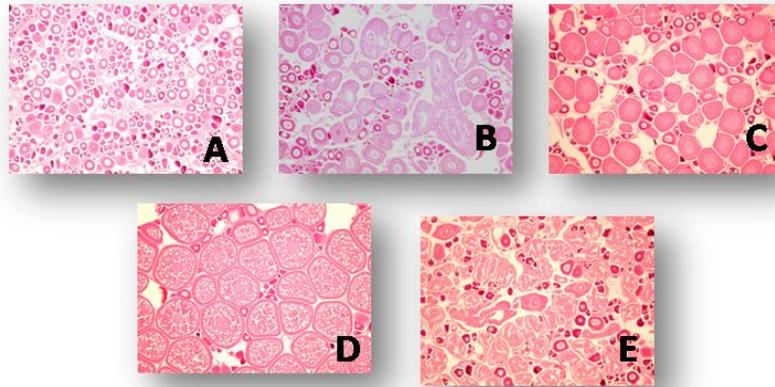


Figura 3 Cortes histológicos de gónadas de hembras. a) Hembra en estadio de desarrollo primario (100X): Presenta algunos nucleolos grandes o núcleos basofílicos, ausencia de inclusiones citoplásmicas, se observan pocas o ninguna gota lipídica. b) Hembra en estadio de previtelogénesis (100X): Presenta pequeñas gotas lipídicas y el alveolo cortical disperso en el citoplasma. c) Hembra en vitelogénesis primaria (100X): Las gotas lipídicas llenan el núcleo y se funden en el centro, el alveolo cortical en desarrollo folicular. d) Hembras en estadio de vitelogénesis secundaria (100X): los glóbulos proteínicos están presentes en la yema. e) Hembras en pos-desove (100X): se observan folículos post-ovulatorios, oocitos atrésicos o en reabsorción.

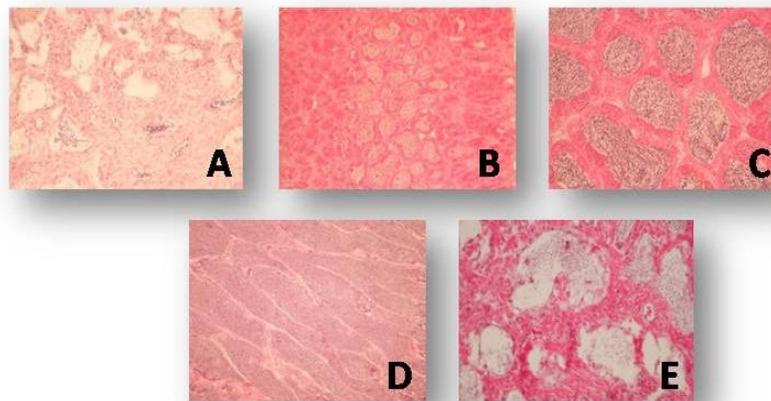


Figura 4 Cortes histológicos de gónadas de machos. a) Macho en post-eyaculación y espermatogénesis temprana (400X): Tejido conjuntivo color rosa que adquiere con la tinción H&E, presenta espermatogonias y espermatocitos ambas estructuras basófilas. Nótese algunos túbulos vacíos en una parte de la gónada. b) Espermatogénesis temprana (100 X): Inicia la actividad espermática, se observan espermatogonias y espermatocitos, con mayor maduración en el centro de la gónada. c) Espermatogénesis intermedia (400X): Avanzada actividad espermática. Túbulos con actividad espermática generan espermatogonias que maduran hasta espermatozoos (parches de esperma). Todas las estructuras celulares presentes desde la etapa espermatogénica, espermatocitos tempranos y esperma maduro. d) Espermatogénesis avanzada-madurez (400X): Abundante generación de esperma. Tejido conectivo no visible por estar cubierto por espermatozoos maduros. Ninguna otra estructura celular visible. e) Macho post-eyaculado (400X): Túbulos sanguinolentos y flácidos, contraídos cerca de la mitad de la longitud de la cavidad abdominal. Paredes flojas. Espermatoocitos residuales.

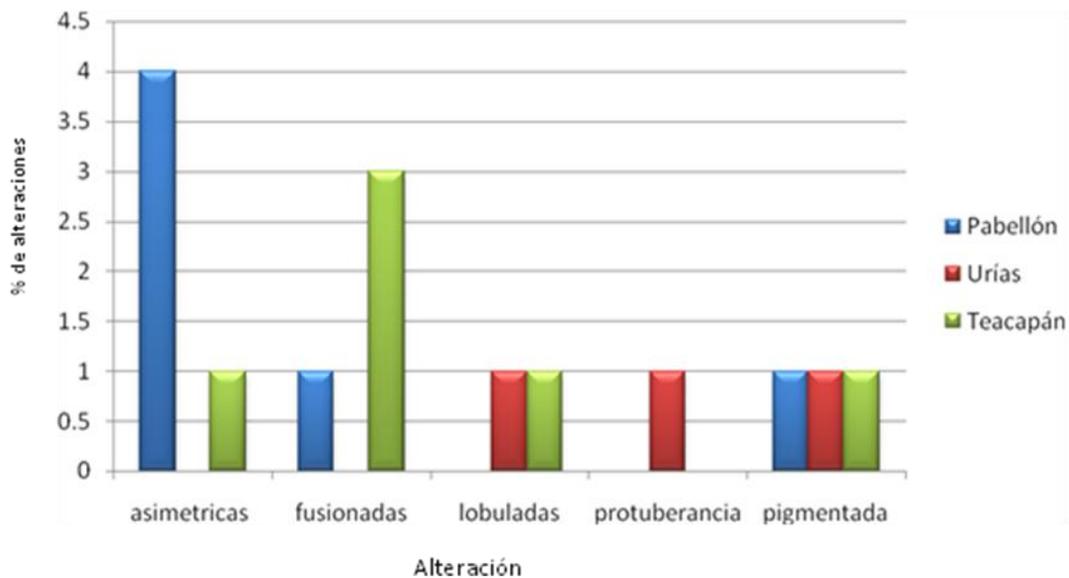


Figura 5 Tipos de alteraciones en las gónadas observadas en la zona de estudio En esta gráfica se observan las alteraciones físicas presentes en el 3% del total de las gónadas en cada uno de los sistemas estuarinos observados

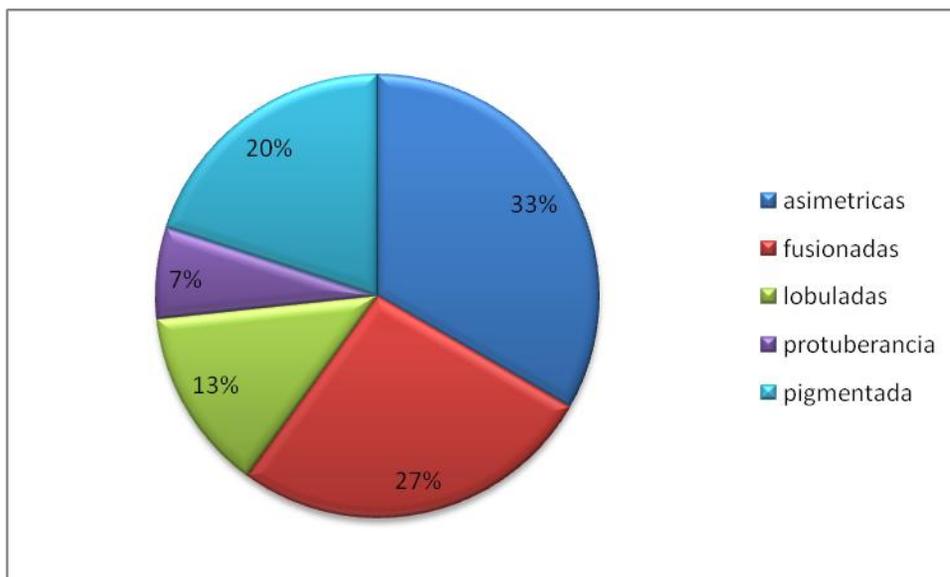
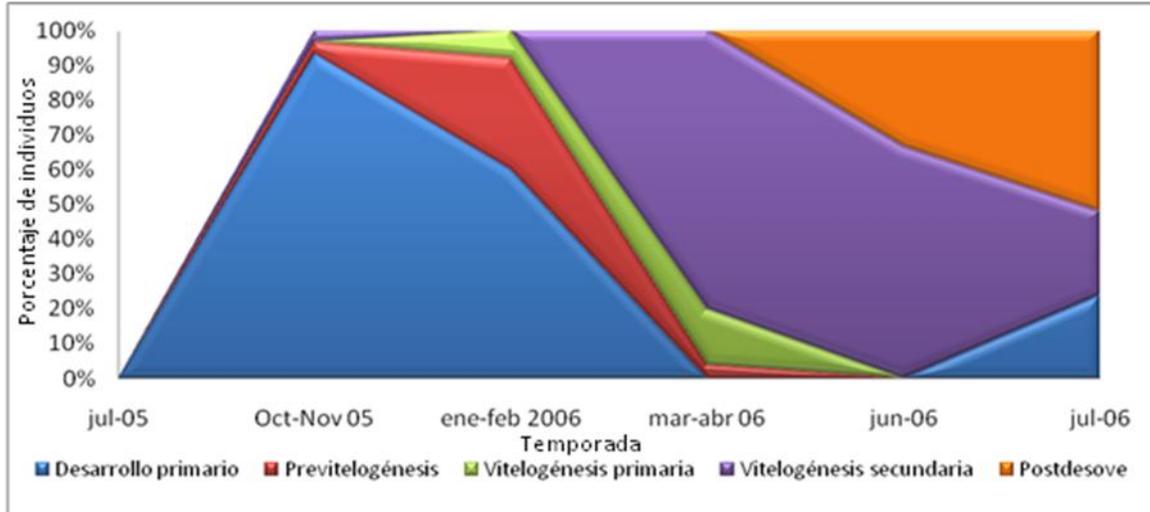


Figura 6 Proporción de alteraciones en las gónadas de los organismos. En esta gráfica se muestra el porcentaje de las alteraciones físicas en las gónadas,

A



B

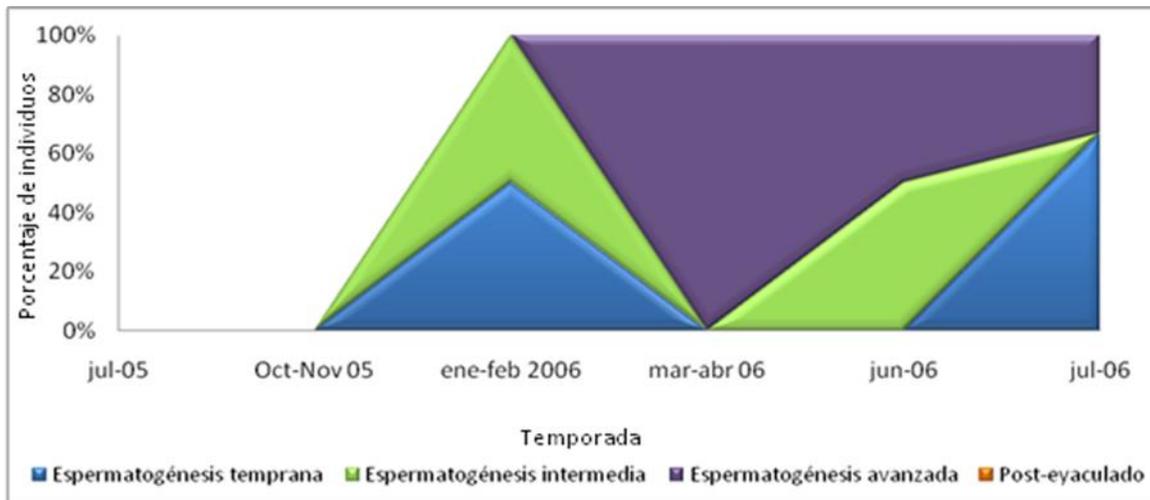
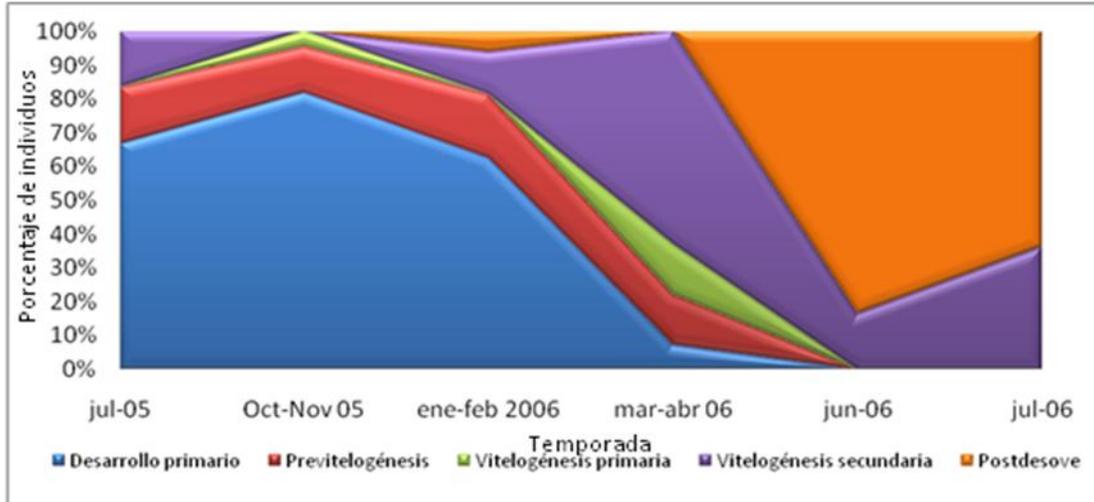


Figura 7 Estadíos de maduración gonádica en el Estero de Ensenada Pabellón. En estas gráficas se muestran los estadíos de maduración para hembras (A) y machos (B) de Ensenada del Pabellón a lo largo de un año. No se capturaron individuos machos en los meses de julio a noviembre del 2005.

A



B

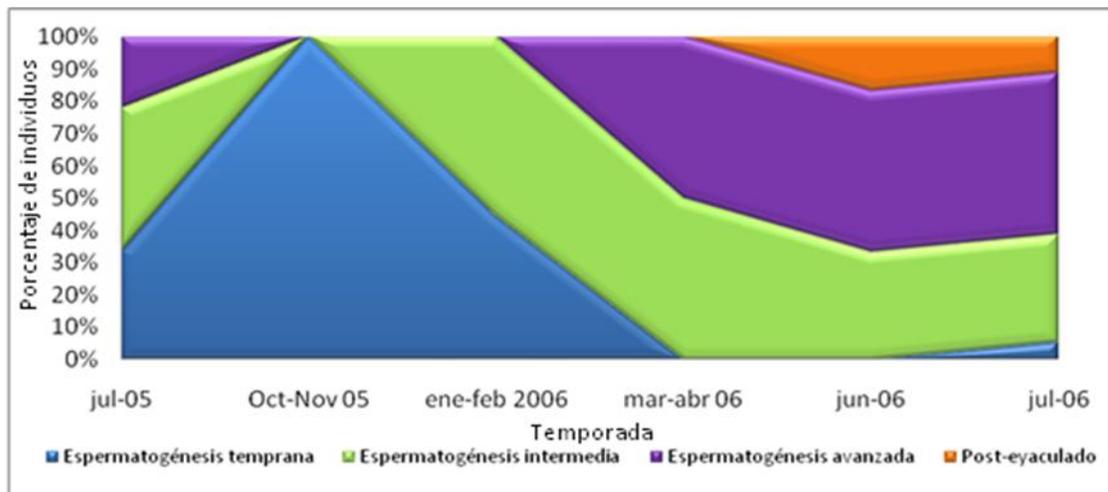
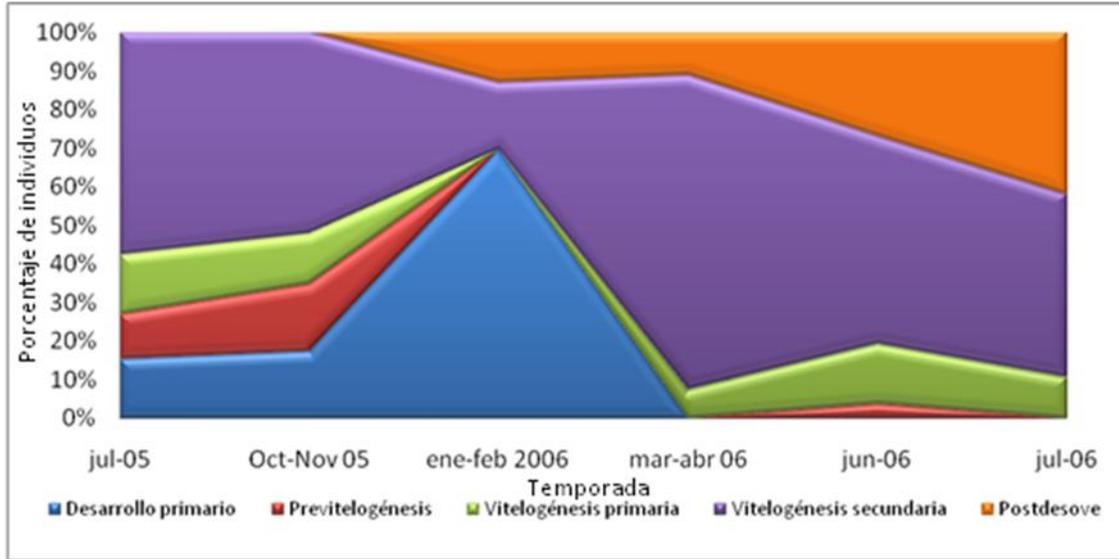


Figura 8 Estadios de maduración gonádica en el Estero de Urías. En estas gráficas se muestran los estadios de maduración para hembras (A) y machos (B) de Urías a lo largo de un año.

A



B

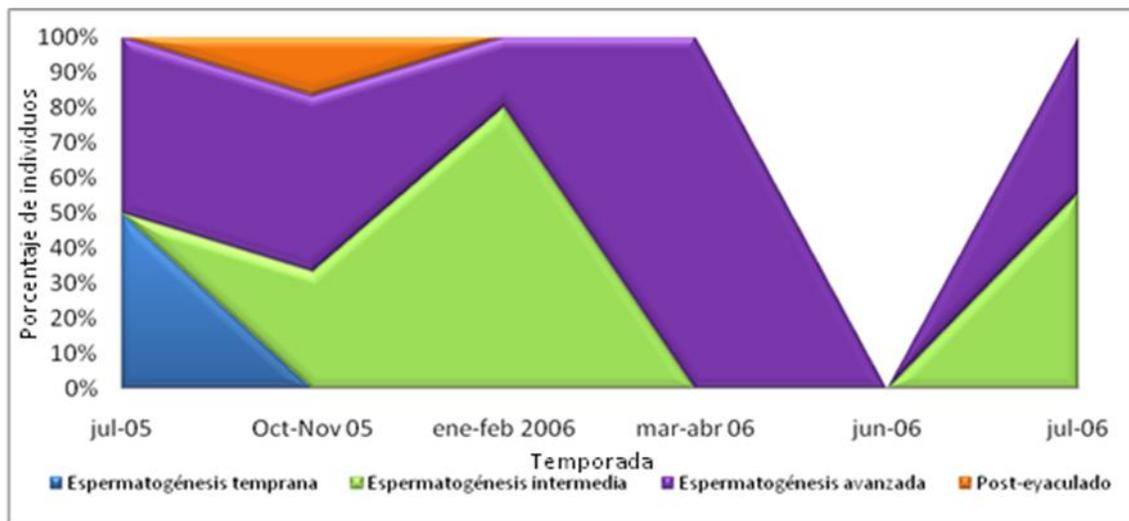


Figura 9 Estadíos de maduración gonádica en el Estero de Teacapán. (A) Hembras, se observa un pico en la vitelogénesis secundaria en los meses de julio-noviembre de 2005 y otro en los meses de marzo-julio de 2006. (B) Machos, se observa que el ciclo reproductivo concuerda con el de las hembras presentándose doble maduración gonádica en primavera y en verano-otoño En el mes de mayo a junio de 2006 no se capturaron machos.

El comportamiento de los machos coincidió con el de las hembras, presentando una doble maduración gonádica durante las mismas estaciones que las observadas para las hembras mientras que en Ensenada Pabellón y en el Estero de Urías solo se observó en primavera (abril a junio). Es importante mencionar que Ríos-Sicarios (2008) reportó que en el Estuario de Teacapán, estación de Boca, se dio una condición de baja salinidad en otoño de 2005 (19 ppm) posiblemente debido a un inhabitual incremento en la precipitación pluvial registrada a finales del verano de 2005 (CNA, 2005). Lo anterior podría tener relevancia en las condiciones fisiológicas de los organismos (Innes y Haley, 1977).

Respecto a la madurez sexual, García (1980) reportó que, para el Golfo de México, la primera madurez de las machos y hembras se alcanza a los 3 años. Sin embargo, tanto la talla como el peso de la primera madurez presentan diferencias por sexos: en los machos ocurre cuando tienen una longitud de 20 cm y un peso de 208 g, mientras que para las hembras se inicia en longitud y peso de 37.4 cm y 217 g, respectivamente. Por lo que se refiere a *Mugil curema*, reportó que la temporada óptima para la reproducción de la especie se ubica entre febrero y marzo.

De acuerdo a Pérez (1980), la época de reproducción de *Mugil curema* en Veracruz se da de finales de febrero a principios de abril de ahí que su ciclo de vida se desarrolle de acuerdo a ésta etapa. Así, en diciembre, la mayor parte de la población se ubica en vitelogénesis primaria, que corresponde a dos estadios de desarrollo gonadal previo al desove: En la zona de Tamiahua Veracruz, la proporción de hembras, al igual que en el resto de los muestreos excepto agosto, fue mayor que la de machos; lo que parece indicar que las hembras son las dominantes en esta población a lo largo del año y sólo cuando la población se encuentra en estado de recuperación tras el desove la proporción es similar entre los dos sexos.

En un estudio más reciente, Ríos-Sicarios (2005) determinó que el pico reproductivo para *M. curema* en los esteros de Urías y Teacapán se da entre abril y junio, coincidiendo con Collins (1985) para la misma especie en las costas de Florida. Lo anterior coincide también con el periodo de veda establecido por la Norma Oficial Mexicana (NOM-016-PESC-1994)

para las lisas del Océano Pacífico. Solomon y Ramnarine (2007) reportaron que en República de Trinidad y Tobago, al sur del Caribe la época reproductiva de *M. curema* empieza en noviembre con un fuerte incremento en julio, justo después de las lluvias registradas en junio, seguido de una drástica disminución en agosto, manteniéndose así los dos siguientes meses para reiniciar en noviembre.

Por lo anterior, los estuarios de Ensenada del Pabellón y Urías presentaron ciclos reproductivos acordes con lo observado por otros autores. Sin embargo, Teacapán registró un periodo reproductivo extendido, ya que se encontraron hembras en vitelogenénesis secundaria de junio a noviembre. La Comisión Nacional del Agua (CNA) (2005) menciona que la capacidad de las hembras de presentar dos épocas de reproducción en un año, puede ser un indicador de buena salud reproductiva de la población que es capaz de invertir energía en la reproducción cuando las condiciones ambientales son favorables.

7.1.3 Índice Gonadosomático (IGS)

Este índice representa el grado de madurez sexual de un individuo particular. Está en función de la proporción del tejido gonadal respecto al peso corporal del organismo, lo que es directamente proporcional al desarrollo y maduración gonadal (Rodríguez y Marañón, 1993) y puede ser utilizado para comparar la salud reproductiva de las poblaciones de cada ecosistema (Devlin y Nagahama, 2002).

En la Figura 10 se presentan las variaciones del IGS a lo largo de un año, de hembras y machos en los tres ecosistemas de la zona de estudio. El pico reproductivo de la especie se observa en los meses de abril a julio en Urías y Pabellón; mientras que en Teacapán se presentó otro pico en marzo. En el caso de los machos, estos no fueron numerosos en la captura en comparación con las hembras y su IGS no mostró un pico de maduración gonádica en todo el año excepto en Pabellón en junio del 2006. El IGS de machos en general fue bajo respecto a las hembras.

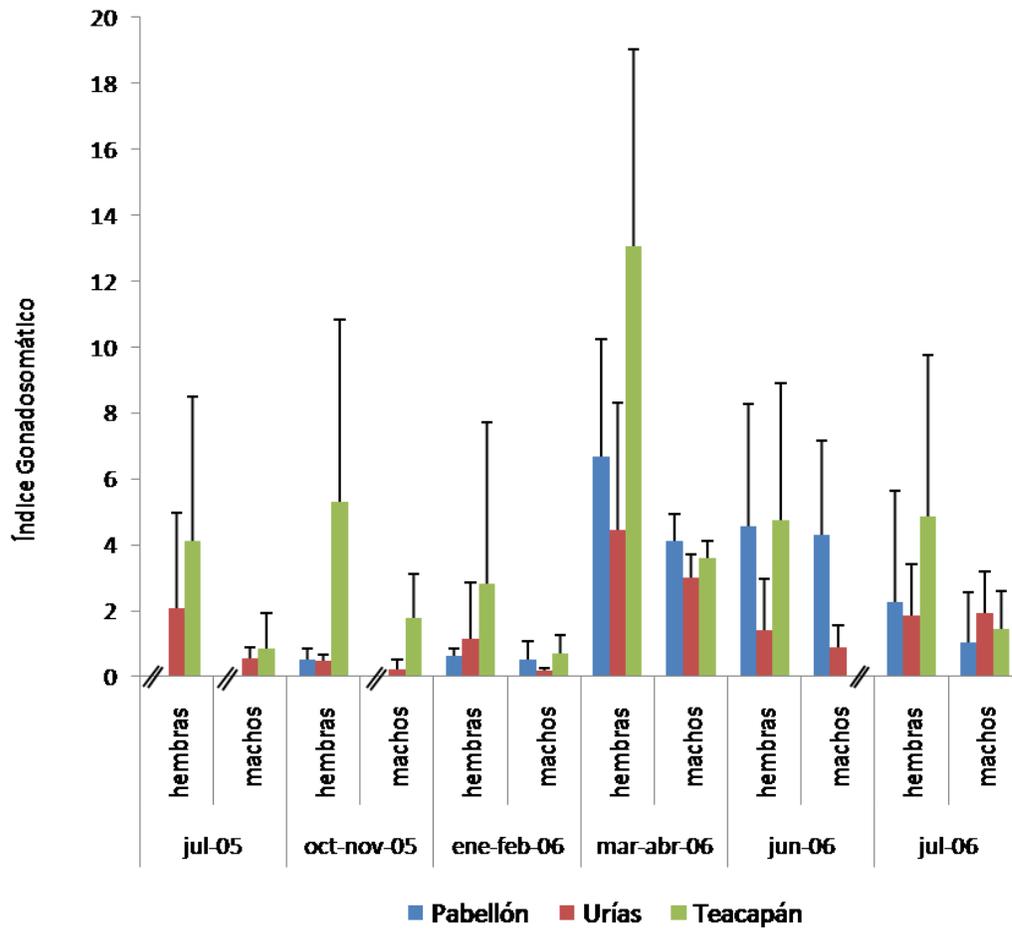


Figura 10 Comparación temporal del Índice Gonadosomático de hembras y machos de *Mugil curema*. Se muestran los resultados obtenidos en el periodo 2005-2006

7.1.5 Expresión de vitelogenina en machos

La fase de vitelogénesis se caracteriza por la acumulación de material de reserva en forma de vitelo. En vertebrados no mamíferos, los ovocitos crecen mientras están detenidos en la primera profase meiótica. El crecimiento del ovocito implica la captación de los derivados de una glicolipofosfoproteína hepática, la vitelogenina, y su incorporación en los gránulos de vitelo (Petersen *et al.*, 1983). Un biomarcador de exposición a compuestos estrogénicos ampliamente aceptado es la presencia en peces macho de la proteína plasmática vitelogenina. Esta proteína tiene un papel fisiológico importante en peces hembra, ya que es un precursor de la yema del huevo (Sumpter y Jobling, 1995).

La vitelogenina no tiene ninguna función biológica en los peces macho y su síntesis puede producir efectos negativos tanto de carácter individual como poblacional (Petersen *et al.*, 1983). Sin embargo, si el gen es activado por el receptor de estrógeno (el cual es a su vez inducido por el estradiol, hormona sexual femenina), puede producir vitelogenina aunque normalmente los machos carecen de suficiente estrógeno para activar dicho gen (Copeland *et al.*, 1986; Ding *et al.*, 1989). Además de la inducción de la síntesis y secreción de vitelogenina, el E2 presenta otros efectos metabólicos en el hígado. En algunas especies se ha comprobado que el E2 altera el metabolismo de carbohidratos, estimulando la degradación del glucógeno hepático, que aporta glucosa para la oxidación aeróbica en diversos tejidos. Así, se ha observado un incremento de las enzimas metabólicas de la glucólisis y un descenso del glucógeno hepático en peces tratados con E2 (Petersen *et al.*, 1983; Ng *et al.*, 1984). El descenso del glucógeno hepático parece estar relacionado, entre otros aspectos, con los requerimientos energéticos para la síntesis de vitelogenina (Korsgaard y Mommsen, 1993).

Se ha observado que peces macho capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentan características sexuales masculinas y femeninas, así como producción de vitelogenina en el hígado. Varias sustancias químicas, como los alquilfenoles encontrados en detergentes y el bisfenol-A encontrado en plásticos, se identificaron como responsables de causar estos efectos feminizantes. La presencia de

vitelogenina en los peces macho fue señalada como un indicador de exposición a alteradores endocrinos a través de múltiples mediciones de la producción de vitelogenina como se puede detectar fácilmente en suero (Jobling y Sumpter, 1993).

No se encontró en la literatura algún valor de expresión basal de vitelogenina en peces macho, por lo que arbitrariamente en este trabajo se tomó el nivel de expresión de vitelogenina de hembras en desarrollo primario como indicador de los niveles basales. En la Figura 11 se muestra la expresión de vitelogenina en machos comparada con hembras en desarrollo primario y vitelogénicas (niveles máximos de expresión). En todos los casos hubo una mayor expresión de vitelogenina en machos con respecto a las hembras en desarrollo primario, pero ningún caso fue diferente estadísticamente diferente, salvo en los niveles detectados para machos de Teacapán (Dunnett, $p \leq 0.05$). Lo anterior sugiere que, en este estuario, la contaminación por compuestos estrogénicos pudiera ser mayor.

7.2 Bioensayo sobre células responsivas a estrógenos (*E-screen*)

7.2.1. Parámetros experimentales de los controles: Curva dosis-respuesta de estradiol y curva dosis-respuesta de DMSO

Las células humanas ZR-75-1 de cáncer de mama ductal son responsivas a estrógenos y expresan los receptores para dicha hormona (<http://www.atcc.org>). Se determinó la concentración útil de E2 para estimular la proliferación celular (Figura 12) en dichas células, la cual resultó de 1×10^{-9} mM, que después de 5 días de tratamiento estimuló la proliferación 1.57 veces ($p \leq 0.05$). Debido a que este tipo de células es sensible a compuestos estrogénicos, pueden ser utilizadas como bioindicadores de contaminación por alteradores endocrinos (Körner 1999).

Se realizaron curvas dosis-respuesta para cada muestra de agua intersticial a 5 días de tratamiento con un cambio de medio al 3^{er} día, de acuerdo a la metodología propuesta por Körner (1999). Se observó efecto citotóxico en función de la concentración pero en ningún caso se logró recuperar el nivel de proliferación celular, posiblemente por la presencia de contaminantes citotóxicos que enmascaren algún efecto estrogénico.

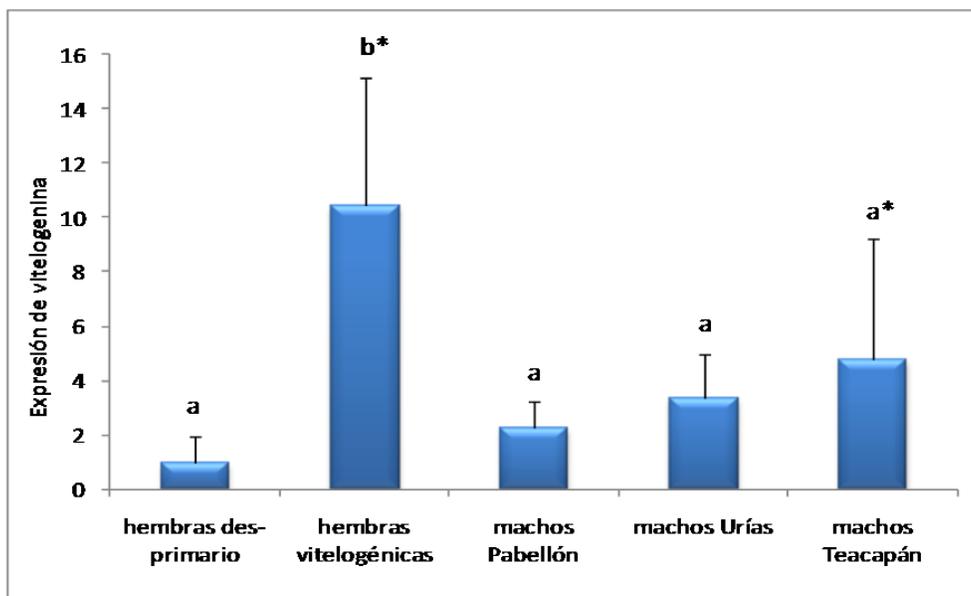


Figura 11 Expresión de vitelogenina en machos de las tres zonas de estudio. Se determinó la expresión de vitelogenina mediante PCR cuantitativa. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre grupos (Tukey $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia entre cada grupo con respecto a las hembras en desarrollo primario (Dunnett, $p \leq 0.05$).

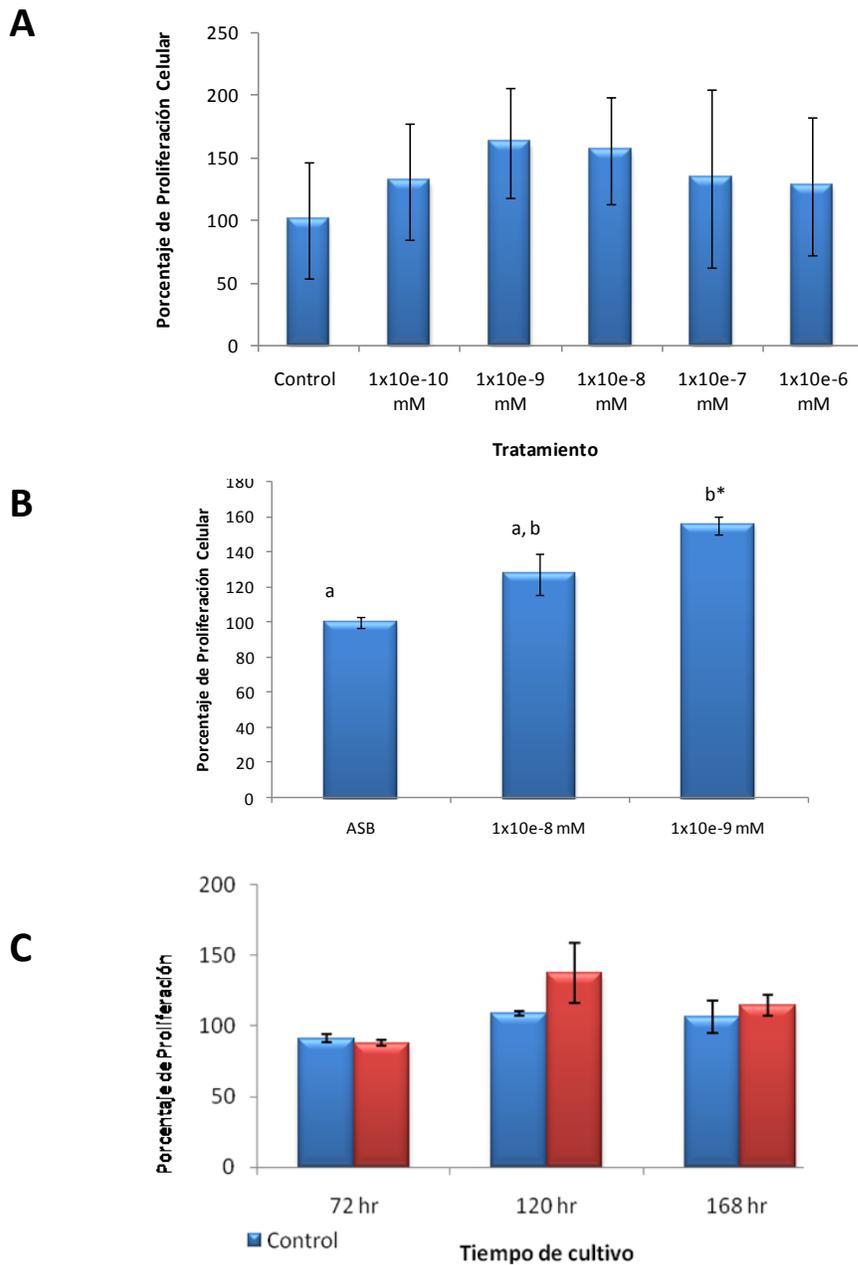


Figura 12 Curva Dosis-Respuesta del E2 sobre células de cáncer de mama ZR-75-1. Se determinó la concentración a la que el E2 provocó mayor proliferación celular (A) y posteriormente se determinó la diferencia entre las concentraciones con mayor efecto proliferativo (B). Se determinó el tiempo para provocar la máxima proliferación celular (C). Se muestra el promedio de al menos dos experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnet, $p \leq 0.05$).

En la Figura 13 se observa el efecto del agua intersticial recuperada de los sedimentos en Ensenada del Pabellón. Las muestras colectadas en el sitio Mapachera (PM, línea costera) en la época de lluvias provocaron un efecto citotóxico con las concentraciones más altas probadas. Sin embargo, conforme la dilución era mayor, la proliferación celular llegó a un nivel de aproximadamente 80% y no fue posible observar incremento. Las muestras colectadas en época de secas mostraron un perfil similar pero sólo la concentración más alta probada mostró un pronunciado efecto citotóxico y las diluciones mayores mostraron niveles de proliferación celular aproximadamente del 50%. Lo anterior muestra un efecto citotóxico mayor en época de estiaje que en lluvias posiblemente debido a que la concentración de contaminantes se incrementa al bajar la afluencia de los ríos.

Los perfiles obtenidos de las curvas dosis-respuesta para lluvias en el sitio Guamuchilera (PG, punto más alejado de efluentes provenientes de la zona urbana) se muestran en la Figura 14. Nuevamente se observó un efecto dependiente de la concentración que llegó hasta aproximadamente el 90% de proliferación celular en época de lluvias mientras que las muestras de época de secas llegaron al 70%.

La Figura 15 muestra la curva dosis respuesta para Teacapán Boca (TB, línea costera) con un perfil similar al observado en Ensenada del Pabellón. Se observó efecto citotóxico con las concentraciones más altas probadas pero la máxima proliferación celular llegó a 60% en época de lluvias y 76% en época de secas. Un comportamiento similar se encontró en Teacapán Cruces (TC) (Figura 16) con proliferación celular máxima de 63% en época de lluvias y 84% en época de secas. Como ya se mencionó, esto pudiera ser efecto del incremento de contaminantes al bajar la afluencia de los ríos.

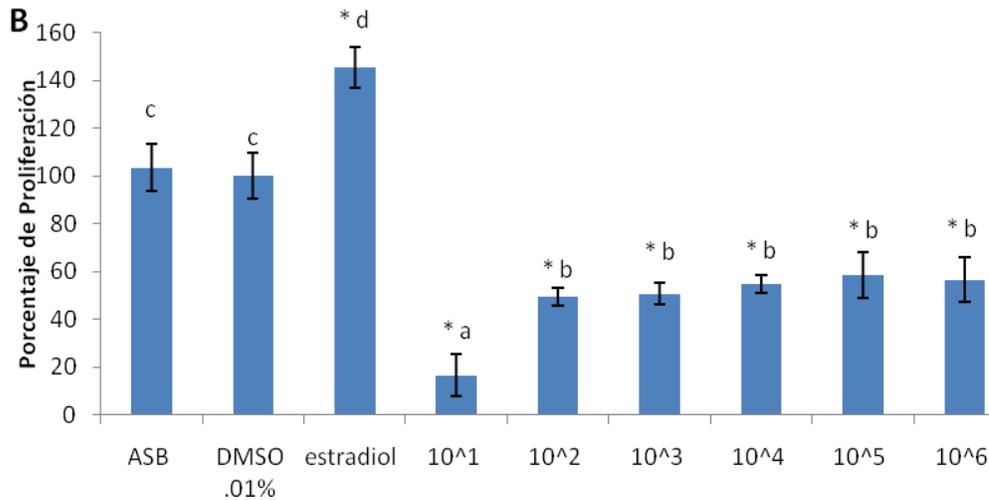
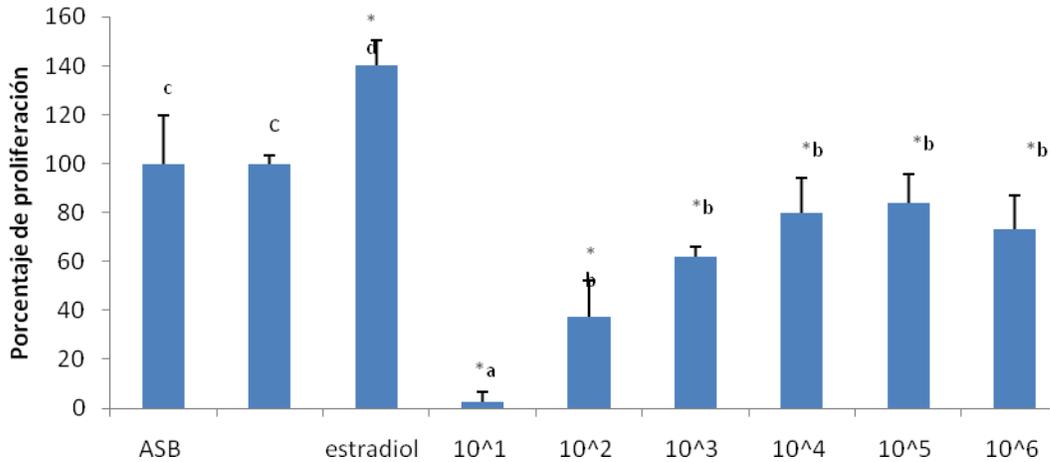


Figura 13 Efecto del extracto de agua intersticial de Ensenada del Pabellón Mapachera sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).

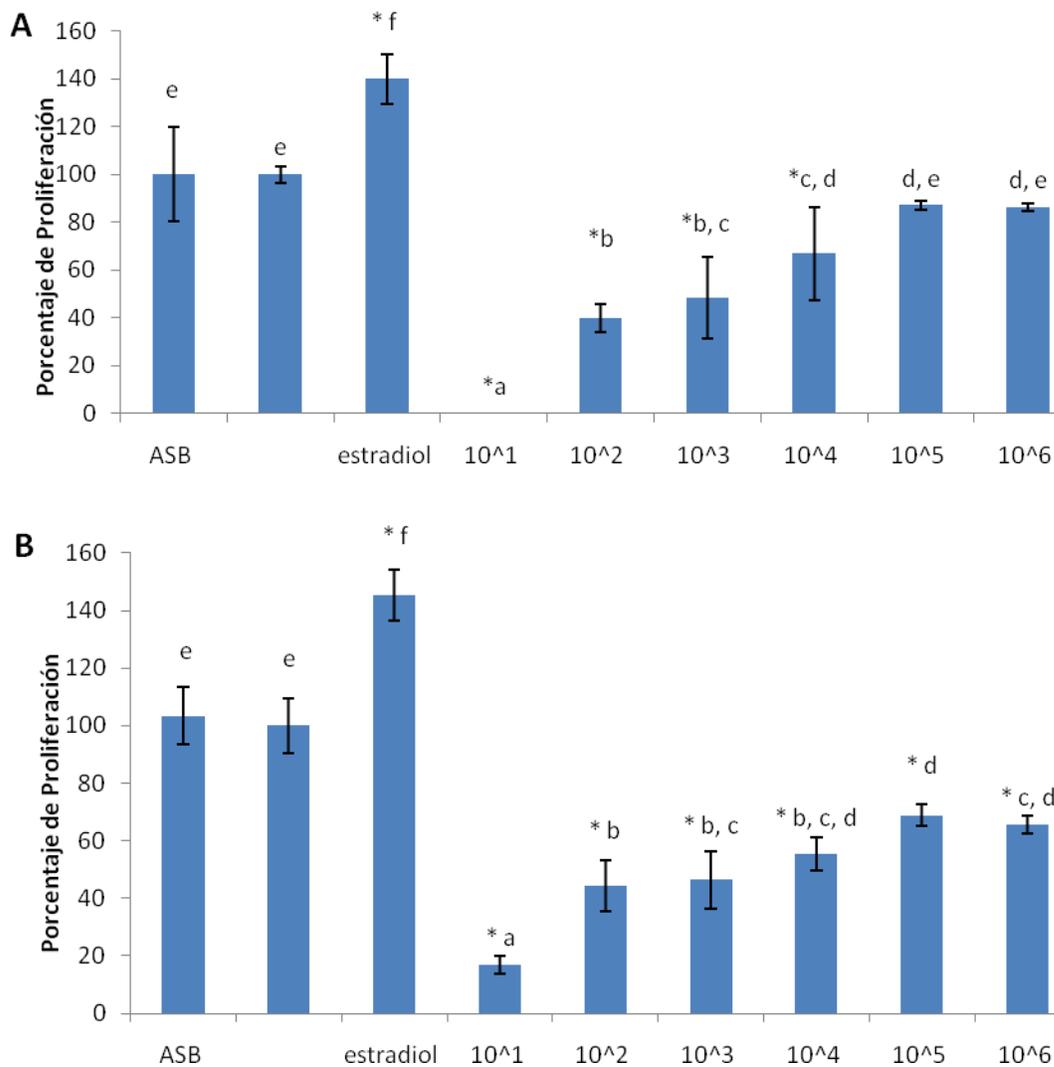
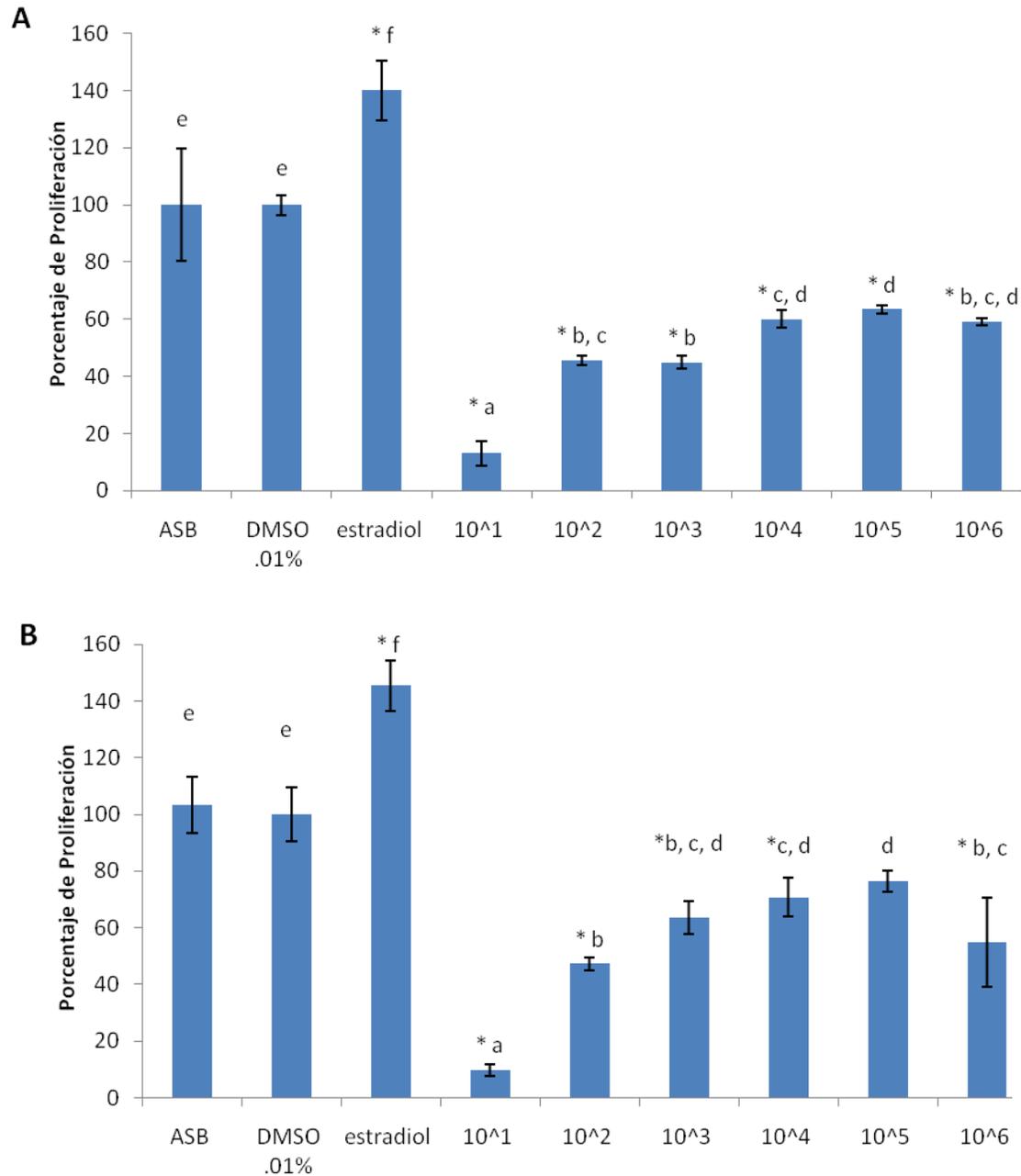


Figura 14 Efecto del extracto de agua intersticial de Ensenada Pabellón Guamuchilera sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).



F
figura 15 Efecto del extracto de agua intersticial de Teacapán Boca sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa

entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).

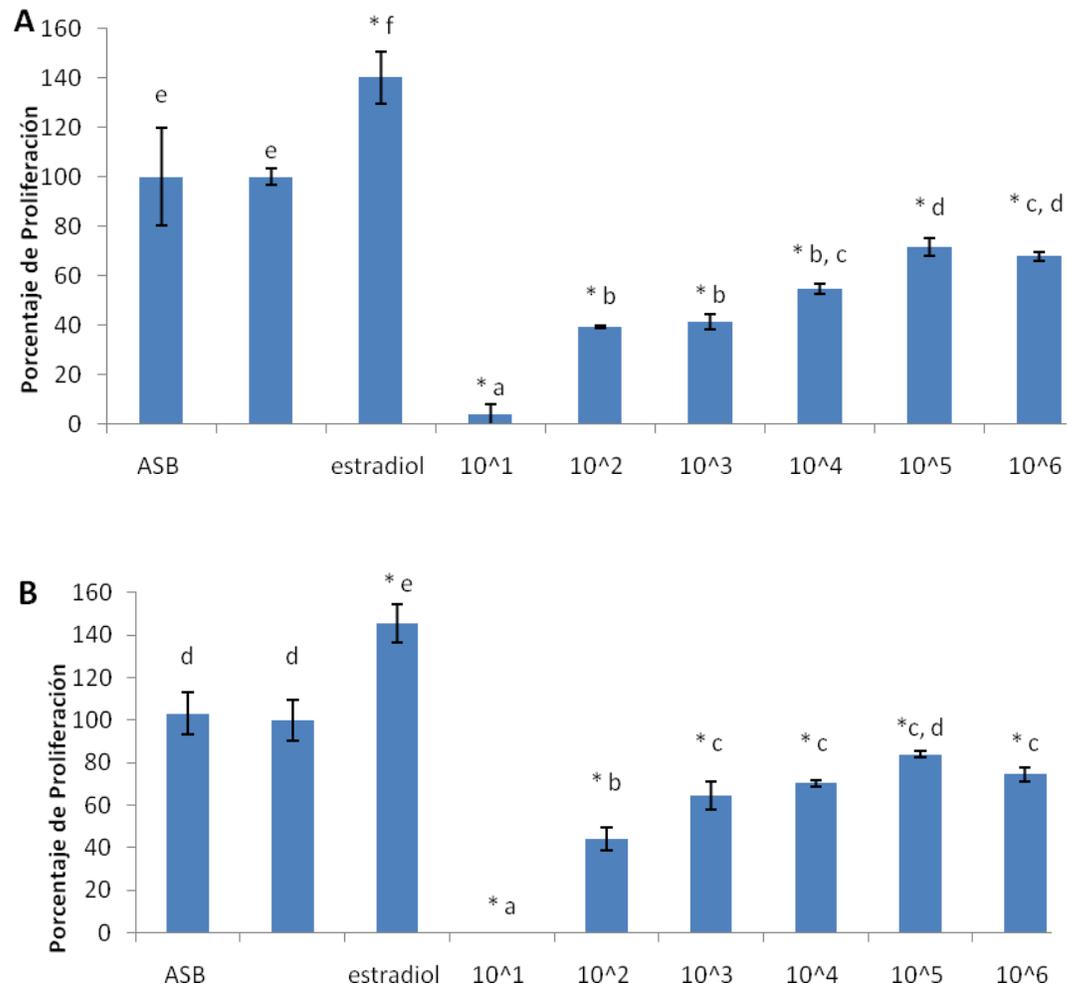


Figura 16 Efecto del extracto de agua intersticial de Teacapán Cruces sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).

En la Figura 17 se observa la curva dosis-respuesta para Urías Juárez (UJ) y en la Figura 18 para el caso de Urías Sirena (US). En los dos casos se observó efecto citotóxico pero éste no fue dependiente de la concentración. El máximo valor de proliferación celular fue de 66% en época de lluvias y 63% para la época de secas para Urías Juárez y 90% de en época de lluvias y 68% para las muestras de la época de secas para Urías Sirena. Ambos puntos se encuentran dentro del puerto de Mazatlán y es probable que no se encuentren diferencias marcadas entre ellos. Llama la atención que el efecto se observara de forma independiente a la concentración debido posiblemente a que el estero de Urías se encuentra completamente inserto en la zona urbana del puerto de Mazatlán. En este caso pudiera encontrarse una mezcla de contaminantes, incluyendo los de origen doméstico e industrial.

Los resultados anteriores sugieren que el agua intersticial de los sedimentos de los tres estuarios estudiados contiene compuestos inhibidores de la proliferación celular y no fue posible observar algún efecto estrogénico, si lo hubiere. El nivel de citotoxicidad puede calcularse a través de la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo. En la Figura 19 se muestra la concentración de LDH para las muestras de Ensenada del Pabellón y Teacapán (dilución del agua intersticial 1:1000) que mostraron aproximadamente un 50% de inhibición de la proliferación. Para el caso de Urías no se determinó este marcador debido a que no se observó tendencia en función de la concentración. Se observó que todas las muestras de agua intersticial presentaron niveles superiores al 70 % de citotoxicidad con respecto a las células control. Sin embargo, sólo resultaron estadísticamente diferentes las muestras de Pabellón Guamuchilera, Teacapán Boca y Teacapán Cruces, todas en época de secas. Lo anterior confirma la presencia de compuestos citotóxicos que, además de inhibir la proliferación celular, provocan la muerte por necrosis de las células, sobre todo en las muestras colectadas en época de sequía, lo cual pudiera deberse a un efecto de concentración de contaminantes que se presenta en esta época.

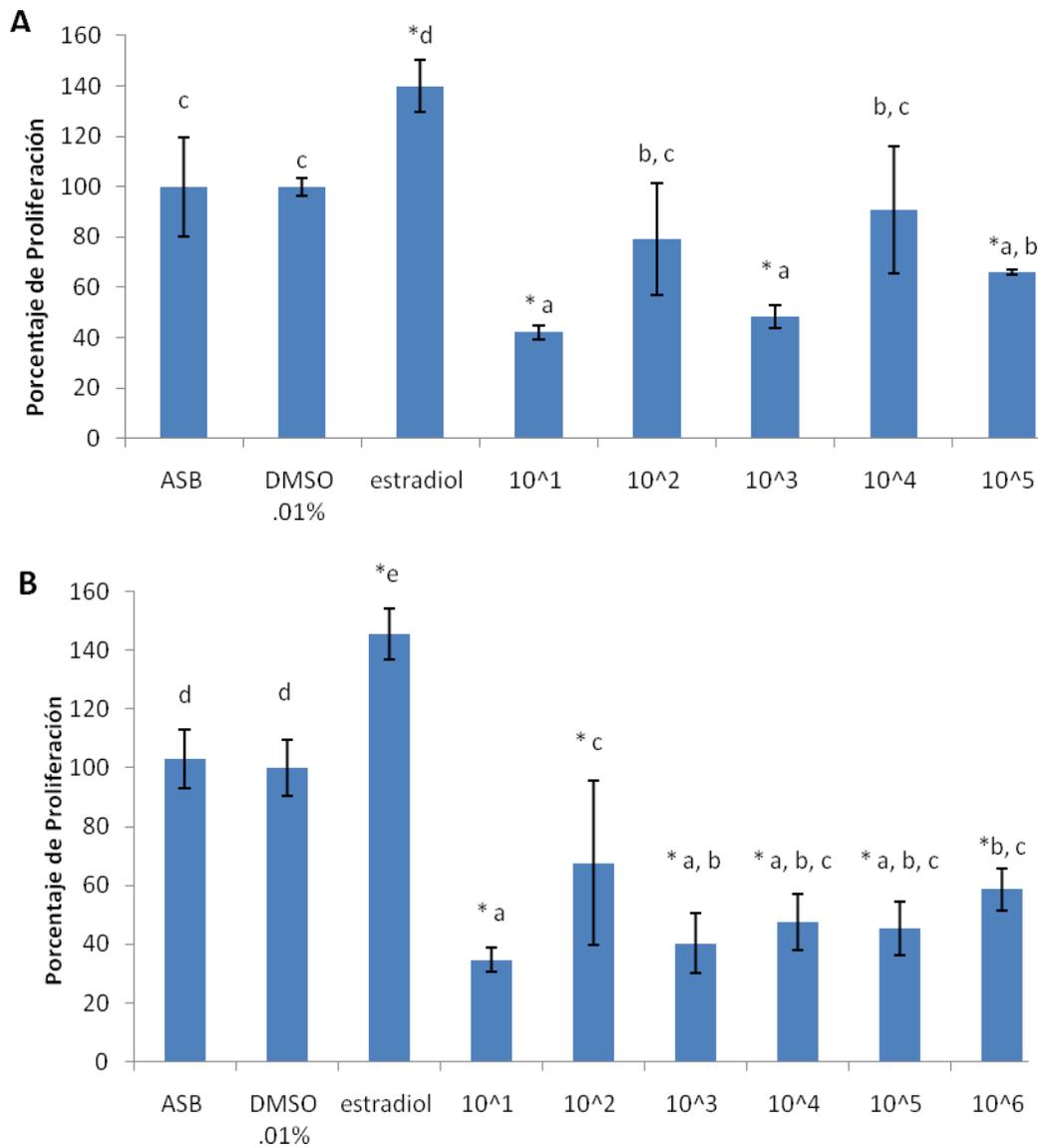


Figura 17 Efecto del extracto de agua intersticial de Urías Juárez sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).

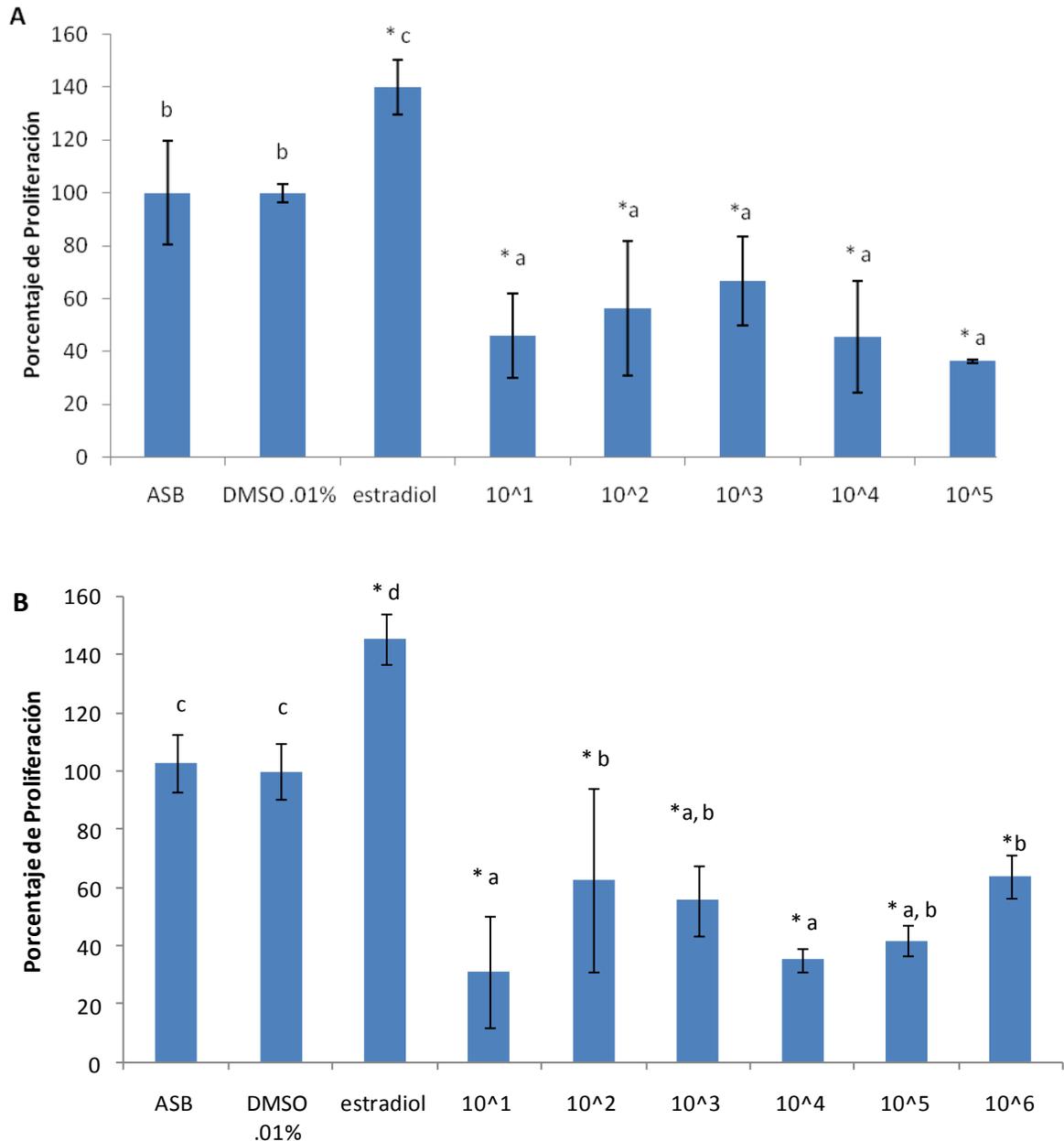


Figura 18 Efecto del extracto de agua intersticial de Urías Sirena sobre la proliferación de células ZR-75. (A) Época de lluvias y (B) época de secas. Las células ZR-75 se sembraron a 3×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. A las 24 horas se cambiaron condiciones y se incluyeron diferentes diluciones (desde 1:10 hasta 1:1000,000) del extracto en medio de cultivo así como los siguientes controles: 0.5% ASB, 0.5% ASB/0.01% DMSO y 0.5% ASB/ 1×10^{-9} mM de estradiol. A las 72 horas se refrescó el medio de cultivo para cada tratamiento y a las 96 horas se determinó el número de células final por recuento al microscopio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$) y los asteriscos representan diferencia estadística significativa entre cada tratamiento y el control con estradiol (Dunnett, $p \leq 0.05$).

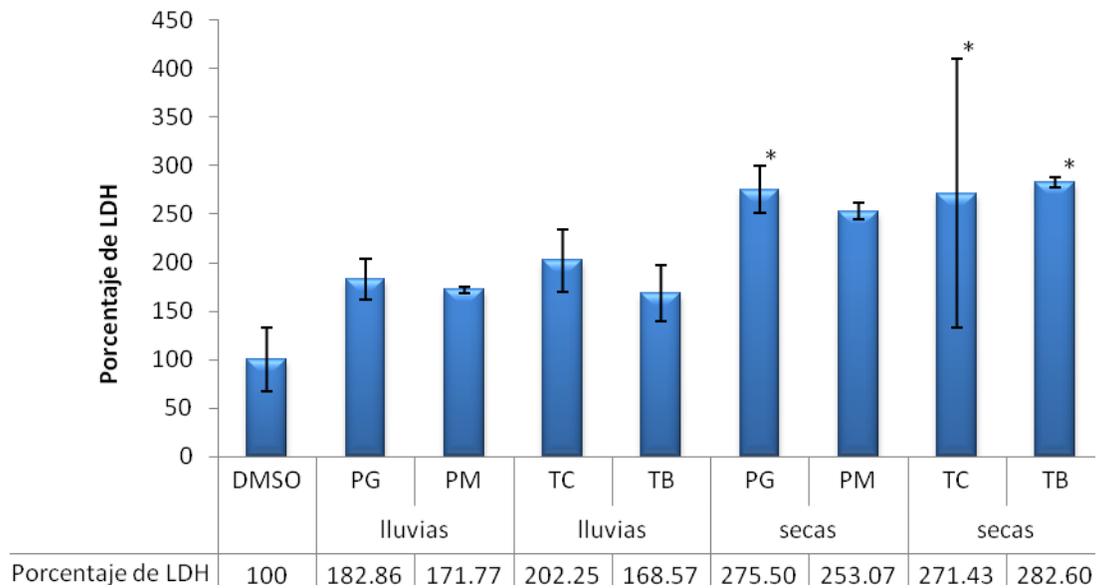


Figura 19 Porcentaje de LDH en medios de cultivo de células ZR-75-1 tratadas con agua intersticial. Los medios de cultivo de células tratadas con la dilución de 1:1000 se utilizaron para la determinación de LDH. Los asteriscos representan diferencia significativa respecto al control (Dunnett, $p \leq 0.05$).

7.2.2 Receptor de Estrógeno

Los receptores de hormonas esteroideas pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción inducidos por un ligando, que también incluye a los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico y Vitamina D3. El complejo hormona-receptor modula la transcripción génica de forma directa, mediante la unión a un elemento específico, o de forma indirecta, mediante la interacción con otras proteínas nucleares implicadas en mecanismos transcripcionales específicos (Evans, 1988).

En peces teleósteos, los esteroideos gonadales desempeñan un importante papel en los procesos de gametogénesis. Estas acciones pueden ser ejercidas directamente sobre las gónadas o pueden ser el resultado de una acción indirecta de estas hormonas sobre el hígado, la hipófisis y/o el cerebro, que poseen también receptores de esteroideos (Pakdel *et al.*, 1989; Salbert *et al.*, 1991; Valotaire *et al.*, 1993; Anglade, 1994).

Así, como sucede en otros vertebrados, las hormonas esteroideas ejercen una regulación mediante retroalimentación sobre el eje cerebro-hipófisis-gónada. Esta retroalimentación, tanto positiva como negativa, incide sobre la síntesis y secreción de gonadotropinas y de las gonadoliberinas (GnRH) (Kobayashi y Stacey, 1990). Las hormonas esteroideas gonadales inciden de forma directa o indirecta sobre los procesos de ovogénesis, esto es, la proliferación de las ovogonias, el crecimiento, la maduración de los ovocitos y la emisión de los óvulos (Kobayashi y Stacey, 1990).

Si bien la síntesis de la vitelogenina hepática es dependiente de E2, la incorporación al ovocito no parece estar regulada de forma directa por E2 (Tyler, 1991; Shibata *et al.*, 1991). El proceso de la maduración de los ovocitos (división meiótica, ruptura de la vesícula germinal) está claramente controlado por esteroideos C21. Numerosos estudios señalan a la 17 α ,20 β -dihidroxiprogesterona (17 α 20 β DHP) como la principal hormona inductora de la maduración (MIH, por sus siglas en inglés) en salmónidos y en otros teleósteos (Yamauchi *et al.*, 1984; Petrino *et al.*, 1993; Nagahama, 1994). Sin embargo, en especies como *Micropogonias undulatus* y *Cynoscion nebulosus*, la 17 α 20 β 21-trihidroxi-4-

pregnen-3-ona parece ser la MIH funcional (Thomas y Trant, 1989). Además existen metabolitos de estos esteroides que son potentes estimuladores de la ruptura de la vesícula germinal, como los 5α y 5β pregnanos (Kime *et al.*, 1992).

De forma preliminar se determinó la expresión del RE β en las células tratadas con las muestras de Ensenada del Pabellón y Teacapán para las dos épocas del año. En la Figura 20 se observa que en todos los casos, excepto para Pabellón Guamuchilera en lluvias, se presentó un aumento de la expresión de RE β . Los mayores valores se obtuvieron para los dos muestreos de Teacapán. Dicho resultado coincide con los valores aumentados de vitelogenina en machos y las alteraciones del ciclo reproductivo en hembras.

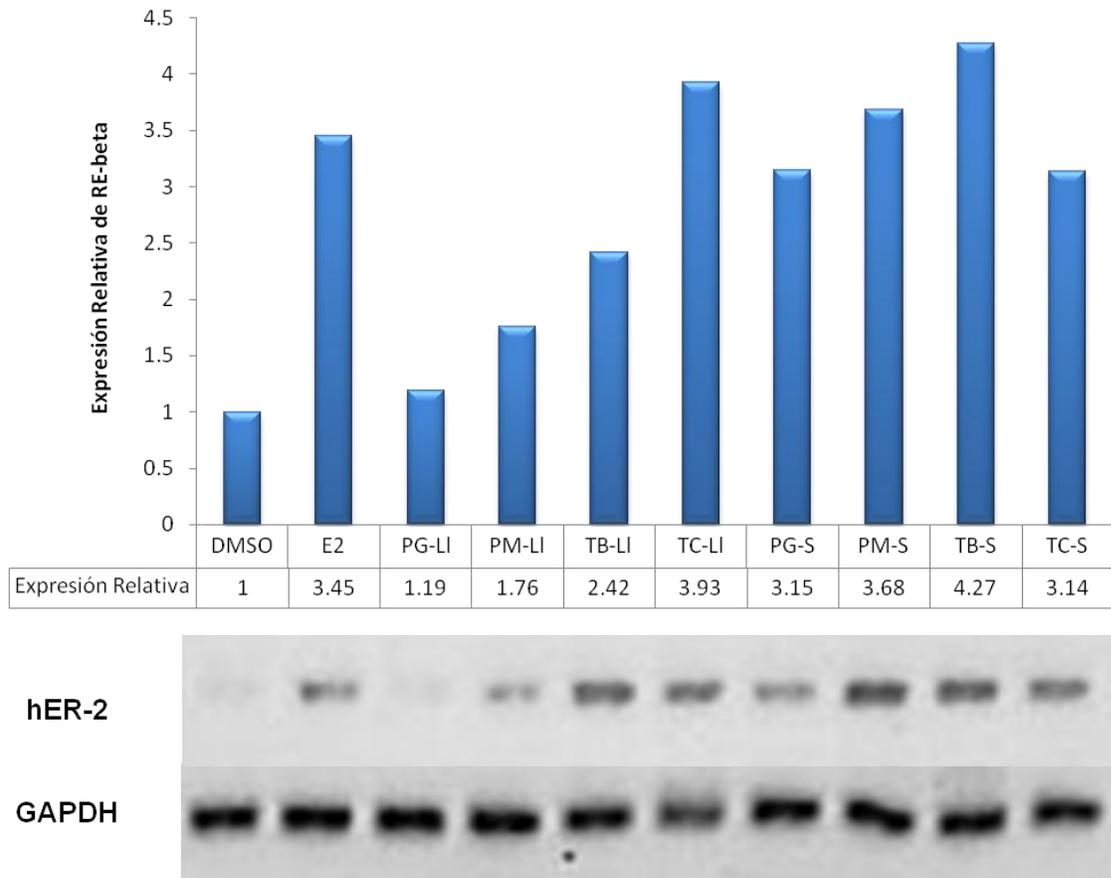


Figura 20 Expresión del RE β en células de cáncer de mama ZR-75 tratadas con el agua intersticial de dos estuarios de Mazatlán, Sinaloa. Se llevó a cabo RT-PCR de punto final del RE β . La intensidad de las bandas fue determinada por densitometría, es decir, se cuantificó la intensidad de fluorescencia del bromuro de etidio del RE β en relación al control interno (GAPDH). DMSO: células no tratadas con estradiol (control negativo), E2: células tratadas con estradiol (control positivo), PG-LI: células tratadas con agua intersticial de Ensenada del Pabellón Guamuchilera en época de lluvias.

8 Conclusiones

1. La proporción de sexos a lo largo de un año en los tres sistemas estuarinos estudiados en este trabajo mostró dominio del número de hembras en relación 8:1. Lo anterior no es necesariamente evidencia de feminización por exposición a estrógenos ambientales pero sugiere la existencia de algún factor selectivo que favorece la población de hembras.
2. No se observaron daños patológicos en los cortes histológicos realizados a las gónadas de machos y de hembras, tampoco se observó en ningún caso alguna gónada intersex. Los machos encontrados se encontraron biológicamente sanos, sin evidencia de feminización. Sin embargo, sería importante determinar el estado de feminización que se pudiera presentar en organismos juveniles dado que los efectos de compuestos estrogénicos pueden ser mayores en organismos jóvenes cuyas gónadas no se han desarrollado completamente.
3. La maduración gonádica y ciclos reproductivos de los organismos colectados en Ensenada del Pabellón no presentaron diferencias con respecto a estudios previos a lo largo de un año, no se observaron tampoco alteraciones en los organismos provenientes del Estero de Urías. En ambos casos se observó un sólo pico reproductivo en los meses de marzo a junio. Para el caso de Teacapán se observaron dos picos reproductivos en los meses de junio y julio y en el periodo de marzo a abril. Lo anterior sugiere un periodo reproductivo extendido que algunos autores identifican como síntoma de salud reproductiva y no necesariamente producto de alteraciones endocrinas. También pueda presentarse debido a condiciones ambientales como la baja de salinidad.
4. El IGS en las hembras mostró adecuada relación con la madurez gonádica y ciclos reproductivos. El IGS de los machos colectados sugiere la presencia de gónadas más pequeñas salvo en el caso de machos de Teacapán colectados en verano del 2006.

5. La elevada expresión de vitelogenina en machos colectados en el estero de Teacapán sugiere presencia de estrógenos ambientales en este sistema.
6. Las células de cáncer de mama ductal ZR-75-1 mostraron evidencia de citotoxicidad en los tres estuarios estudiados y en ningún caso se observó efecto estrogénico. Posiblemente dicho efecto se haya enmascarado bajo la presencia de contaminantes citotóxicos.
7. De manera preliminar, los resultados de expresión del receptor de estrógeno mostraron aumento en Ensenada del Pabellón y Teacapán en época de secas. Lo anterior sugiere presencia de estrógenos ambientales.
8. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran algunas alteraciones que podrían estar vinculadas con la exposición a compuestos estrogénicos, como la desproporción de hembras y machos, la elevación de los niveles de vitelogenina en machos (principalmente del Estero de Teacapán) y el aumento en los niveles de expresión del receptor de estrógeno.

Futuros estudios podrían enfocarse a:

1. Establecer los niveles basales de vitelogenina en machos.
2. Aislar contaminantes específicos para determinar sus efectos individuales en células responsivas a estrógenos y evitar así enmascaramientos por mezclas de contaminantes.
3. Caracterizar el efecto citotóxico de los contaminantes presentes en el agua intersticial.
4. Determinar de manera cuantitativa la inducción de los diferentes receptores de estrógeno para establecer el efecto estrogénico con mayor precisión.
5. Determinar otros marcadores de alteración endocrina.

9. REFERENCIAS

Alejandro-Grimaldo, S. 2007. Evaluación del efecto de plaguicidas en *Mytella strigata* del Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa: exposición *in situ*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 105 p.

Álvarez-Cadena JN. 1983. Composición y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar Huizache-Caimanero. Parte I agua dulce 1970. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. 11(1):301

Amjad S, Gray J. 1983. Use of the nematode: copepod ratio as an index of organic pollution. Mar. Poll. Bull. 14(5):178-181.

Anglade I. 1994. Étude morphofonctionnelle des systems neuroendocriniens impliqués dans le contrôle de la fonction gonadotrope chez les poissons osseux. Tesis Doctoral. Universidad de Bourdeaux I,

Bardach JE, Ryter JH, Mc. Larney WO. 1986. Crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. AGT Editor, S. A. 5ª edición. México. pp 741.

Berlanga CA. 1999. Evaluación de las condiciones actuales y del cambio en los paisajes de humedales de la costa sur de Sinaloa, México: una aproximación con el uso de datos provenientes de sensores remotos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. p 111.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: Prop. for a prot. to assess aqua. poll. J. Fish Dis. 22:25-32.

Briones-Ávila E. 1994. La regulación de la pesquería de las lisas (*Mugil cephalus* y *Mugil curema*), en Sinaloa y Nayarit. Res. IV Congreso Nacional de Ictiología. Morelia, Michoacán. p 523.

Canales A, De Celis R, Salado H, Feria A. 2003 Xenoestrógenos, función y efectos e-Gnosis 1 (2). www.e-gnosis.udg.mx Última visita enero de 2009

Castro-Aguirre JL, Espinosa PH, Scmitter SJJ. 1999. Ictiofauna lagunar estuarina y vicaria de México. Editorial Trillas. 6ª edición. México. p 708

CNA. 2005. Análisis mensual de precipitación por entidad federativa. Red climatológica de tiempo real. www.smn.cna.gob.mx fecha de consulta 12 de enero de 2008

Colborn T, vom Saal F, Soto A. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. Env. Hth. Pers. 101:378-84.

Colborn T, Smolen M, Rolland R. 1996. Taking a lead from wildlife. *Neurotoxicol Teratol* 18:235-237.

Collins MR. 1985. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida). White Mullet. U.S. Fish Wild. Ser. Biol. Rep. 82:11-39.

Contreras EF. 1993. Los ecosistemas costeros Mexicanos. CONABIO/UAM. p 413.

Copeland PA, Sumpter JP, Walker TK, Croft M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B:487-493.

Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208:191-364.

Ding JL, Hee PL, Lam TJ. 1989. Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 363-370.

Drake P, Arias A, Gallego L. 1984 Biología de los mugílidos (*Osteichthyses, Mugilidae*) en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz). III. Hábitos alimenticios y su relación con la morfometría del aparato digestivo. *Inv. Pesq.* 48(2):337-367.

Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240: 889-895.

Galindo-Reyes JG, Guerrero-Ibarra MA, Villagrana G, Quesada-Urenda G, Angulo-Escalante S. 2001. Contaminación por plaguicidas en agua, sedimentos, camarón y almeja, de dos ecosistemas costeros de Sinaloa, México. *Trop. I Ecol.* 33(2):172-180.

Galindo-Reyes JG. 2000. Condiciones ambientales y de contaminación en los ecosistemas costeros. SEMARNAT–Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán. p 158.

García SS. 1982. Evaluación de las capturas de lisa en el NE del Golfo de México. Periodo 1965–1979. CRIP-Tampico. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca. p 376.

García-Gasca A, Galaviz MA, Gutiérrez JN, García-Ortega A. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*, 251: 366-376

García-Gasca A, Betancourt-Lozano M, García de la Parra LM, García-Gasca T, Márquez-Rocha F, Vanegas-Pérez RC. 2008. Informe Técnico FOSEMARNAT-2004-01-199, Anexo 3A, 24 pp.

Greenpeace. 1996. Alteraciones hormonales y PVC. Recuperar nuestro futuro robado. Madrid, Greenpeace. p 32.

Gutiérrez-Rivera JN. 2002. Clonación y expresión de un receptor de hormona glicoproteico en el ovario del botete *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán.

Hall JA, Frid CL, Gill ME. 1997. The response of estuarine fish and benthos to an increasing discharge of sewage effluent. *Mar. Poll. Bull.* 34(7):527-535.

Hill EF. 1995. Handbook of Ecotoxicology. Hoffman D.J. Tattner B.A., Burton G.A. Jr. Cairns J. Jr editores. Lewis, Boca Raton, FL. EU. pp 243-274.

<http://www.atcc.org>. Última consulta 17 de abril del 2009

<http://www.consumaseguridad.com>. Última consulta 15 de enero de 2007

Hubbs CL, Lagler KF. 1958. Fishes of the Great Lakes region. Univ. Mich. Press. Ann Arbor. Mich. p 213.

Izaguirre-Fierro G, Osuna-López I, Zazueta-Padilla H, López-López G, Frías-Espiricueta M. 2001. Plaguicidas organofosforados en sedimentos de lagunas costeras con importancia ecológica pesquera de Sinaloa. Primer Foro Estatal de Ciencia y Tecnología. CECyT. pp 251-263.

Jacot AP, 1920. Age, growth and scale characters of the mullets. *Mugil cephalus* and *Mugil curema*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 39 (3):119-229.

Jobling S, Sumpter J. 1993. Detergent Components in Sewage Effluent are Weakly Oestrogenic to Fish: in *vitro* Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27:361-72.

Kime DE, Scott AP, Canario AVM. 1992. In vitro biosynthesis of steroids, including 11-deoxycortisol and 5 α -pregnane-3 β ,7 α ,17,20 β -tetrol, by ovaries of the goldfish *Carassius auratus* during the stage of oocyte final maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 87: 375-384.

Kobayashi M, Stacey NE. 1990. Effect of ovariectomy and steroid hormone and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool. Sci.* 7: 715-721.

Körner WV, Hanf W, Schuller C, Kempter J, Metzger H, Hagenmaier M. 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *The Sci of the Tot Envir.* 225:33-48.

Korsgaard B, Mommsen TP. 1993. Gluconeogenesis in hepatocytes of immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): control by estradiol. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89: 17-27.

Lankford RR. 1974 Informe Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Informe del estudio de reconocimiento de la región costera de los estados de Michoacán y Guerrero. Subprograma de Geología. Descripción general de la zona costera de Guerrero y Michoacán. p 42.

Lankford RR. 1977. Coastal lagoons of México. Their origin and classification. UNESCO y Centro de Cienc. Mar y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp 182-215.

Lester RJT, Thomson C, Moss H, Barker SC. 2001. Movement and stock structure of narrow-barred Spanish mackerel as indicated by parasites. *J. Fish Biology.* 59:833-842.

Livingstone DR, Motchellmore CL, Peters LD, O'Hara SCM, Shaw JP, Chesman BS, Doyotte A, McEvoy J, Ronisz D, Larsson DGJ, Förlin L. 2000. Development of hepatic CYP1A and blood vitellogenin in eel (*Anguilla anguilla*) for use as biomarkers in the Thames estuary, UK. *Marine Envir. Rese.* 50:367-371

Luna LG. 1968. Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology. Mc Graw-Hill. 3ª edición. New York (EU). pp 5-38.

Margalef R. 1983. Ecología. Editorial Omega, S. A. 6ª edición. Barcelona, España. p 951.

Merson RR, Casey CS, Martinez C, Soffientino B, Chandlee M, Speaker JL. 2000. Oocytes development en summer flounder: seasonal changes and steroids correlates. *J. Fish Biol.* 57:182-196.

Mihelic D, Slavica A, Gjurcevic-Kantura V, Janicki Z, Babic K. 1999. The influence of sea pollution on the histoenzymatic activity in the gills and some other organs of the digestive system in mullet (*Mugil cephalus*) and coast crab (*Carcinus aestuari* Nardo). *Veti Archiv.* 69(3):115-124.

Mineau P. 1991. Chemicals in Agriculture Vol. 2. Editorial Elsevier Science. 2º edición. New York, EU. p 348.

Moe AM, 1966. Hermaphroditism in Mullet, *Mugil cephalus* Linnaeus. Fla. Bd. Conserv. Quart J. Fla. Acad. Sci. 29(2):111-116.

Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol., 38: 217-229.

Nash CE, Shehadeh Z, Shehadeh H. 1980. Review of breeding and propagation techniques for grey mullet, *Mugil cephalus* L. ICLARM. Stdis and Review. 3:1-387.

Ng TB, Woo NYA, Tam PPL, Au CYW. 1984. Changes in metabolism and hepatic ultrastructure induced by estradiol and testosterone in immature female *Epinepholus akaara* (Teleostei, Serranidae). Cell Tiss. Res., 236: 651-659.

NORMA Oficial Mexicana NOM-016-PESC-1994. Para regular la pesca de lisa y liseta o lebrancha en aguas de jurisdicción federal del Golfo de México y Mar Caribe, así como del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California. Diario de la Federación. 24-04-1995.

OECD. 1993. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Volume 1, Paris, France.

Olea N. 2001. La exposición a disruptores endocrinos. Ponencias del Curso de Verano de El Escorial. "Riesgo Tóxico Protección Ambiental, Salud Laboral Y Seguridad Alimentaria". Fundación General de la Universidad Complutense de Madrid. <http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?idarticulo=325> Última consula 10 de noviembre del 2006.

Osuna-López JI, Zazueta-Padilla H, Frias-Espiricueta M, Izaguirre-Fierro G, López-López, G. 1997. Metales pesados en sedimentos superficiales del sistema Arrollo Jabalines-Estero del Infiernillo, Mazatlán, Sinaloa, México. Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa. 15:43-49

Páez-Osuna F, Osuna-López JI. 1990. Distribución de metales pesados en fracciones geoquímicas de sedimentos superficiales del Bajo Golfo de California. An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México. 17(2):287-298.

Pakdel F, Le Gellec C, Vaillant C, Leroux MG, Valotaire Y. 1989. Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER)messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. Mol. Endocrinol. 3: 44-51

Pasos-Mandujano RA. 2008. Calidad alimentaria en relación a la concentración de metales esenciales y no esenciales en el mejillón *Mytella strigata* de la zona costera de Sinaloa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mazatlán, 57 pp.

Pérez Mellado J. 1980. Análisis de la fauna de acompañamiento del camarón capturado en las costas de Sonora y Sinaloa, México. Tesis Maestría. Esc. Cienc. Marinas, Inst. Tec. de Est. Sup. de Monterrey, Guaymas, Son., México, 98p.

Petersen IM, Sand O, Korsgaard B. 1983. A time course study of the effect of repetitive doses of estradiol-17 β on serum glucose and lipids, liver glycogen and some carbohydrate metabolizing enzymes in liver of male flounder (*Platichthys flesus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 74: 459-466.

Petrino TR, Lin Y-WP, Netherton JC, Powell DH, Wallace, R.A., 1993. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* V: Purification, characterization, and metabolism of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 92: 1-15.

Piña-Chacón LE. 2008. Efecto de hidrocarburos poliaromáticos en el mejillón *Mytella strigata* del Estero de Urías, Sinaloa. Tesis de Maestría. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 151 p.

Polanco J, Mimbela S, Beléndez L. 1987. Pesquerías Mexicanas: Estrategias para su administración. Secretaría de Pesca. pp 943–1007.

Ríos-Sicarios J. 2005. Análisis Comparativo de la Condición Biológica de la Lisa Blanca (*Mugil curema valenciennes*, 1836) como Indicador de Estrés Ambiental en dos Sistemas de la Costa Sureste Del Golfo De California. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa. 65 p.

Ríos-Sicarios J. 2008 Utilización de Biomarcadores en peces y moluscos como indicadores de estrés ambiental en lagunas costeras. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 115 p.

Rodríguez-Gutiérrez M. 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT. Editor S. A., 5ª edición. México, D. F. pp 8-18.

Rodríguez-Gutierrez M, Marañon-Herrera S. 1993. Relación del factor de condición múltiple con la reproducción de machos en la carpa *Cyprinus carpio*. *An. Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. Mexico*. 20(1): 105-113.

Rodríguez-Preciado A. 2004. Bioacumulación de mercurio (Hg) en tejido muscular de la lisa *Mugil curema* (Valenciennes, 1938) de los esteros Urías y Teacapán, Sinaloa. Tesis Facultad de Ingeniería Pesquera. Universidad. Autónoma de Nayarit. San Blas, Nayarit. 56 p.

Rosales-Hoz MTL. 1979. Sobre la dispersión de compuestos organoclorados en el medio ambiente marino: Nota científica. An. Centro Cienc. Mar y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México. 6(1):33-36.

Roy LA, Armstrong L, Sakamoto K, Steirner S, Perkins E, Lomax DP, Johnson LL, Schilenk D. 2003. The relationships of biochemical endpoints to histopathology and pollution metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater out fall off Orange County, California, USA. Environ. Toxicol. Chem. 22(6):1309-1317.

Safe S. 1990. Crit. Rev. Toxicol. 21:51-58

Salbert G, Bonnec G, LeGoff P, Baoujard D, Valotaire Y, Jego P. 1991. Localization of estradiol mRNA in the forebrain of the rainbow trout. Mol. Cell. Endocrinol., 78: 173-180.

Santamarta J. 2002, La amenaza de los disruptores endocrinos Editorial Española 1ª edición, España. pp 53

SEMARNAT. 1999. Avisos de arribo. Subdelegación de Pesca. Dirección de Administración de Pesquerías. Mazatlán, Sinaloa 1ª edición. México. p 547.

Shibata N, Yoshikuni M, Nagahama Y. 1991. Effects of hormones on vitellogenin incorporation into oocytes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro. Zool. Sci. 8: 1071.

SIC. 1970. Situación actual y posibilidades de la pesca en Guerrero. Secretaría de Industria y Comercio Comisión Nacional Consultiva de Pesca, México. p 36.

SIC. 1971. Estado de Sinaloa. Dirección General de Relaciones Públicas. Comisión Nacional Consultiva de Pesca, México, D. F. p 39.

Smith AK, Suthers IM. 1999. Effects of sewage effluent discharge on the abundance, condition and mortality of hulafish, *Thachinops taeniatus* (Plesiopidae). J. Environ. Poll. 106:97-106

Smith GJ. 1987. Pesticide use and toxicology in relation to wildlife: organophosphorus and carbamate compounds. Fish and Wildlife Service Resource Publication. 5ª edición. EU. p 170.

Solís RJM. 1966. Fecundidad en lisa (*Mugil cephalus Linnaeus*). Inst. Nal. Inv. Biol. Pesq. Sría. Ind. y Com. Trabajos de Divulgación 11(105):1-6.

Solomon F, Ramnarine I. 2007 Reproductive biology of white mullet, *Mugil curema* (Valenciennes) in the Southern Caribbean The University of the West Indies, Fisheries Research 88:133–138.

Sumpter JP, Jobling S. 1995. Environ. Health Prespect. 103:173-178.

Thomas P, Trant JMP. 1989. Evidence that 17 α , 20 β ,21 trihydroxy-4- pregnen-3-one is a maturation inducing steroid in spotted seatrout. Fish Physiol. Biochem. 7: 185-191.

Thomas F, Hurst M, Matthiessen P, McHugh M, Smith A, Waldock M. 2002. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens on United Kingdom estuaries. Env. Tox. Chem. 21(7):1456-1461.

Tyler CR, Sumpter JP, Campbell PM. Uptake of vitellogenin into oocytes during early vitellogenic development in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). J. Fish Biol., 38: 681-689.

Valotaire Y, Le Roux MG, Jegou P. 1993. Estrogen receptor gene: structure and expression in rainbow trout. En Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Vol 2, pp 373-390.

Vasconcelos J, Sánchez S, Shultz L. 1996. La Pesquería de lisa. En: Pesquerías relevantes de México. SEMARNAP/INP. pp 581-594

Weis JS, Weis P. 1994. Impacts of xenobiotics on estuarine ecosystems. In: Cockerham LG y S Shane editores. Basic Environmental Toxicology. 2ª edición. Boca Raton, Florida, EU. pp 384-408.

Widdows J, Donkin P. 1992. The Mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics, and culture. Elsevier Science Publishers. Gosling, D.E. Editores. 1 edición. Amsterdam. p.75

Yamauchi K, Kagawa H, Ban M, Kasahara N, Nagahama Y. 1984. Changes in plasma estradiol-17 β and 17 α ,20 β - dihydroxy-4-pregnen-3-one 53 levels during final oocyte maturation of the masu salmon *Oncorhynchus masou*. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 50: 2137.

Yáñez-Arancibia LA. 1975. Sobre los estudios de los peces en las lagunas costeras: Nota científica. Anales. Centro Ciencias del Mar y Limnología., Universidad. Nacional. Autónoma de México. 2(1):52-572

Yáñez-Arancibia LA. 1976. Observaciones sobre *Mugil curema* Valenciennes en áreas naturales de crianza. México: Alimentación, crecimiento, madurez y relaciones ecológicas. An. Centro de Ciencias del Mar y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México. 3 (1):93-124.

Yáñez-Arancibia A, Nugent RS. 1977. El papel ecológico de los peces en estuarios y lagunas costeras. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología. 4(1):412.