



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Dra. Isela Hernández Plata

**Tesis: Búsqueda de biomarcadores para conocer la salud de roedores silvestres
expuestos a metales pesados**

Alumna que lo presenta a revisión: **Damaris Amairani Santana Flores**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2020-06-15 12:59:55 | Firmante

XJ9eUYOX4T++LbJWy0Jnp2XJWIOUYcl0oOkfARuQz9ycMID7IkSKo9fOfPcCPg3fP1IHVym8mpMpuZr15HJeGTJBQRH0ioQD2ALzzXDjHxmYRhl7q5ODlyhkJUUhGuMZz7x3gHy
Zgx5uo1cpx8ehoHMzcRHVYQGInsgnb8Vxeu7zj1uMkkQcLBzs1UAZlnGqNhuJA1rf4PlnGUxzle0C35ajRtEb+E+6PHTTnWTOIO7cwcVhZBBZexqESL0dmr2FoHBF+auKH0/AR+N
8sDf4YxtA12KYbwnJyO9qoxL0/AIY9KDsJZwBzXnAfLZI+BlfHpAVkiTKXTE2OdBpppZRuw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[gxa2Eh](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HGrNJPSgrpnliqFAVSoxZzFe4jLnkQS4J>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Dra. Isela Hernández Plata

**Tesis: Búsqueda de biomarcadores para conocer la salud de roedores silvestres
expuestos a metales pesados**

Alumna que lo presenta a revisión: **Damaris Amairani Santana Flores**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EFRAIN TOVAR SANCHEZ | Fecha:2020-06-15 12:03:24 | Firmante

hyKSMfHIdD9U+xCZBD0ezZ4vpmubhjaxlPHBIYK4aok1F1itFnkSM3SO47Rn7E3plZ5DmJJ2G8YT88mPBVmRWsc05qwf2HECINyLPCZEI8AAw1egqQ+mt+Flw+jotywtjC0SSr1J
DY7BbBX4wxWzQ/G9YXuFu4CP3QS7oVwWkZqD7AN3drRV3Us1JII9OtiZ9Yz7k0JAXp6QJQ54qqYmZWkQ/hZjE8wT/wfn4u91ON7r/Azp4jH8zeGAYpSAqlgTD0+2BYs3KkCIPY
SSoglujW83FzOW6M/hFyzmzBB4xOUACoBULK6pQIIC8RhUNjHKdPOfI0i0eb7Sbi3vZQB+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



otypme

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/eTYISBKXSiY2ljBPtvp8GUjTHE6z5rCP>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Dra. Isela Hernández Plata

**Tesis: Búsqueda de biomarcadores para conocer la salud de roedores silvestres
expuestos a metales pesados**

Alumna que lo presenta a revisión: **Damaris Amairani Santana Flores**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2020-07-07 08:32:47 | Firmante

iJRoeYTQtoAloiwKYi0lebcwNS49i58/qY48qgyhEPttTSWIE+tLIOKz/Ef/Zu+BCLfP2CEOI9xQUeIKs8p9BZZQEEMkRTPJYbtAFjV159uePYKpVuh5k2m6wNx8lXR2dN1s8sYjM2P
cR6qegFNBfSCDqA23m0J+iBsGyrQBZrEfT+32GMEryWqBCbhHsQQYD3fAjbZynFpTvOMR1TDFvYvqkJjakmhl0o4PuWvs6OGAf5z3hatfDtc9SaGjyfr1xVqpRQh6F9UfVRii3HK
9lrbnwF3G+CssFOF6/j12q6GW7ZYwu48c3yg7AymntcUzlCzFi3TA/i8j/95ImTCw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hcD9zX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gBGDUdAptaz6oNNCNSZMsoSbLst2crh2>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Dra. Isela Hernández Plata

**Tesis: Búsqueda de biomarcadores para conocer la salud de roedores silvestres
expuestos a metales pesados**

Alumna que lo presenta a revisión: **Damaris Amairani Santana Flores**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-06-27 14:56:20 | Firmante

hYeOBKrp8555/v7HeaLSS+B7niloaXllyuekxQ7+Gv6eU6dMmTMgDNFU00AncNGTq042NDZQXfk+S8l8Zt6QKXdwY5IVSLbr5XbMWNUKr7UrS0cxRitIV8QBOfMkwCuRZOyg4xYmFfOLLOCJvgbv3T2Z0Pmxt7F8GRtgxwLhYFvsY33hgxm0BA0U/TYliuPfbHtAqg7HT8Bil+4eLSHY8Gj/t3HcRFUOqKEDUPT1JOMMBRxEAxI5MLW0oFxoLXu0jpQOjJXVF3pnn2X1+nYCx+hvUxO91KcJ53YU1B3VL+u4bfp6CxOzWFOhwe8lWsdROPbROoBgp6QCjAD8Gmw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hnCTWz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qPnTAfdbnryUfrComaPkGujqiJsOkacT>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 5 de junio 2020

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Dra. Isela Hernández Plata

**Tesis: Búsqueda de biomarcadores para conocer la salud de roedores silvestres
expuestos a metales pesados**

Alumna que lo presenta a revisión: **Damaris Amairani Santana Flores**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE,

DRA. ISELA HERNÁNDEZ PLATA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ISELA HERNANDEZ PLATA | Fecha:2020-07-06 13:11:18 | Firmante

UAY1U44ZlxBZFwZT6UVmrOaWfapBMdnG7S3pwuygA+O/m2wevBJpES9+4VYAmnSmt04Rly7f4wRMT8x7QLanOMGPGkuDhcUzbHejqxJNLXYXA+t21sVn4a6rq876WshIOQ
VcJ10gV4A7vN27y6lIBceRwe81qXlyF4o6/nTe5h5vcphjdUuxRy9p3OnKzrpsgKNX6BX/Eb7WdjiVCjlr+Bj/D8kPQwohK8T+qdS1CcyzeqHspLdonWh7QduCpfEFjSvbkroVU+ZvXr1
+vT4ThRx2dtONWKN6WiapT2+H4EAILXnNDwBrBPvEwAvxdlcuJByyknMdh6qhRL20JX2IA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9VSyzK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M4BFEnAnSYfNK7BPDbb0t3SDQndJJQHi>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA
CONOCER LA SALUD DE ROEDORES
SILVESTRES EXPUESTOS A METALES
PESADOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

QBP. DAMARIS AMAIRANI SANTANA FLORES

DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE

DIRECTORA DE TESIS



CUERNAVACA MORELOS, AGOSTO DEL 2020.

Agradecimientos

A la maestría en biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de la maestría.

A la **Dra. Patricia Mussali Galante** por permitirme realizar mi proyecto de investigación bajo su cargo, por el tiempo y dedicación para dicho proyecto y por siempre estar al pendiente de las necesidades requeridas para la conclusión de mi posgrado.

Al **Dr. Efraín Tovar Sánchez**, por todo el esfuerzo y la dedicación que le puso a mi proyecto, por todas sus críticas y aportaciones a lo largo de la maestría.

Al **Dr. Ramon Suarez Rodríguez**, al **Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís** y a la **Dra. Isela Hernández Plata**, miembros del jurado comité revisor de mi tesis, por cada una de sus aportaciones.

Al **QBP. Gibran Orozco Lopez** por compartir conmigo sus conocimientos, tiempo y sobre todo sus consejos cuando se presentó alguna adversidad.

A la **M en B. Karen Flores Trujillo**, por su ayuda y aportaciones a nivel experimental a lo largo de mi proyecto.

Al **M en C. A. Juan Ramírez Zamora**, por su gran ayuda en las salidas de campo y sobre todo por el tiempo dedicado en algunas dudas que se me presentaron durante el posgrado.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB en especial al **Biol. Marcos Rosas Ramírez** por hacer la estancia más amena durante la realización de mi proyecto.

A Dios y mis padres

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Impacto de la minería en México.....	7
1.2 Jales de la localidad de Huautla Morelos.....	7
1.2.1 Peligrosidad de los jales para el medio ambiente.....	8
1.3 Generalidades de los metales pesados	9
1.3.1 Toxicidad de los metales pesados	10
1.4 Uso de biomarcadores en ecotoxicología	12
1.4.1 Definiciones y tipos de biomarcadores	12
1.5 Rompimiento de las cadenas de ADN como biomarcador de efecto temprano	15
1.6 Relación entre biomarcadores de exposición y efecto en organismos expuestos a metales pesados	16
II. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Estudios toxicológicos en la localidad de Huautla Morelos.....	18
2.2 Exposición de los roedores a metales pesados provenientes de los jales	18
2.2.1 Roedores como especies centinela	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Sitios de estudio:	24
6.1.1 Sitio expuesto: Jales de Huautla Morelos.....	24
6.1.2 Sitio control: Quilamula, Morelos.....	24
6.2 Especies de estudio	25
6.3 Colecta de roedores y extracción de órganos.....	27
6.4 Cuantificación de metales pesados en órganos de roedores	28
6.5 Evaluación del daño genotóxico (rompimiento de cadena sencilla) en sangre periférica de roedores.....	28
6.6 Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS.....	31

7.1 Categoría de influencia entre la concentración de metales pesados y los niveles de daño genético: comportamiento sigmoidal	32
7.2 Relación entre la bioacumulación de metales pesados y los niveles de daño genético en roedores silvestres (machos y hembras) asociados a jales	34
7.3 Niveles de riesgo e impacto genético generados por la bioacumulación de metales en roedores silvestres que habitan en los jales de Huautla.....	44
XIII. REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categorías de influencia entre la concentración de metales y los niveles de daño genético.....	3
Tabla 2. Relación entre la bioacumulación de metales en hígado y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores silvestres.....	33
Tabla 3. Relación entre la bioacumulación de metales en riñón y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores silvestres.....	35
Tabla 4. Relación entre la bioacumulación de metales en hueso y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores silvestres.....	37
Tabla 5. Relación entre la bioacumulación de metales en cerebro y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores silvestres.....	39
Tabla 6. Relación entre la bioacumulación de metales en intestino y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores silvestres.....	41
Tabla 7. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en hígado y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores machos y hembras.....	42
Tabla 8. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en riñón y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores machos y hembras.....	43
Tabla 9. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en hueso y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores machos y hembras.....	46
Tabla 10. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en cerebro y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores machos y hembras.....	48
Tabla 11. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en intestino y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en roedores machos y hembras.....	50

Tabla 12. Daño genético medido por el rompimiento de cadena sencilla ($\bar{X} \pm e.e$) en las tres especies de roedores silvestres *Peromyscus melanophrys*, *Baiomys musculus* y *Liomys irroratus* en los sitios control (Quilamula) y expuestos a metales pesados en los Jales de Huautla, Morelos.....51

Tabla 13. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en intestino y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la localización geográfica de los sitios de estudio.....25

Figura 1. Especies de roedores utilizadas en este estudio. A) *P. melanophrys*, B) *B. musculus* y C) *L. irroratus*..... 27

Figura 2. Modelo de valores tangenciales, valores angulares y normalizados por regiones de influencia: muy baja, baja, medio, alta y muy alta (modificado de Ramos-Quintana, 2016).....30

Figura 4. Categorías de influencia entre la concentración de metales y los niveles de daño genético a través de un modelo sigmoidal. MP = metales pesados, DG= daño genético.....33

RESUMEN

La minería es una de las principales actividades económicas de nuestro país, sin embargo, la explotación de los recursos mineros conlleva a la generación de residuos denominados jales, que contienen altas concentraciones de metales pesados (MP) y que generalmente no reciben ningún tratamiento posterior a su disposición. A pesar de que los jales contienen MP, son un hábitat para la vida silvestre. Existen especies que habitan en o cerca de los jales entre los que se encuentran los roedores. Este grupo de animales está expuesto a MP de manera crónica y tienden a bioacumular estos elementos en sus órganos promoviendo un incremento en los niveles de daño genético (P. ej., rompimientos de cadena sencilla y doble, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, formación de micronúcleos, entre otros). Debido a lo anterior, es importante determinar biomarcadores específicos que nos permitan conocer a fondo el impacto de los MP bioacumulados en los distintos órganos sobre los niveles de daño genético. Por lo tanto, en este proyecto se utilizó como modelo de estudio individuos de roedores que habitan en los jales de la localidad de Huautla (sitio expuesto) y Quilamula (sitio control) pertenecientes a las especies *P. melanophris*, *B. musculus* y *L. irroratus*. Asimismo, para cada especie se recolectaron hembras y machos, de los cuales se extrajeron los riñones, hígado, hueso, cerebro e intestino para determinar la bioacumulación de los MP, además, de cada individuo se extrajo la sangre para el análisis de daño genético en linfocitos de sangre periférica. En general se encontró que los niveles de bioacumulación de MP en los distintos órganos evaluados presentaron el siguiente patrón por especie: *B. musculus* > *P. melanophris* > *L. irroratus*, además el mismo patrón se presentó para los niveles de daño genético. En cada especie de roedor las hembras presentaron los mayores niveles de bioacumulación de MP y de daño genético en comparación con los machos. En este estudio se observó que el género y la especie de roedor juegan un papel importante en la bioacumulación de MP y en los niveles de daño genético, debido a esto es de gran importancia determinar el mejor biomarcador de exposición-efecto para cada órgano, género y especie de roedor.

Palabras clave: minería, jales, metales pesados, roedores, bioacumulación, biomarcadores.

ABSTRACT

Mining is one of the main economic activities in our country, however, the exploitation of mining resources leads to the generation of waste called tailings, which contain high concentrations of heavy metals (HM) and which normally do not receive any treatment subsequent to your disposal. Although tailings contain HM, they are a habitat for wildlife. There are species that inhabit or near tailings, among which are rodents. This group of animals is exposed to HM in a chronic way and affected to bioaccumulate these elements in their organs promoting an increase in the levels of genetic damage (eg, single and double chain breaks, chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, formation of micronuclei, among others). Due to the above, it is important to determine specific biomarkers that specify the background of the impact of bioaccumulated HM in the different organs on the levels of genetic damage. Therefore, in this project we will consider rodent individuals that inhabit the tailings of the locality of Huautla (exposed site) and Quilamula (site control) belonging to the species *P. melanoprys*, *B. musculus* and *L. irroratus*, for each species, females and males were collected, from which the kidneys, liver, bone, brain and intestine were extracted to determine the bioaccumulation of the HM, in addition, each individual's blood was collected for damage analysis. genetics in peripheral blood lymphocytes. In general, it is found that the levels of bioaccumulation of HM in the different organs evaluated are considered the following pattern by species: *B. musculus* > *P. melanoprys* > *L. irroratus*, in addition the same pattern was presented for the levels of genetic damage. In each rodent species, the females of the evaluation showed the highest levels of bioaccumulation of HM and genetic damage in comparison with males. In this study it will be seen that the genus and the rodent species play an important role in the bioaccumulation of HM and in the levels of genetic damage, due to this it is of great importance to determine the best biomarker of exposure-effect for each organ, genus and species of rodent.

Key words: mining, tailings, heavy metals, rodents, bioaccumulation, biomarkers.

INTRODUCCIÓN

1.1 Impacto de la minería en México

La minería es una de las actividades más antiguas de la humanidad y se define como la obtención selectiva de minerales y otros materiales de la corteza terrestre. Debido a su riqueza en recursos minerales, México es un país altamente atractivo para el sector minerometalúrgico. México inicio sus actividades mineras a principios del siglo XI con la extracción de oro (Au) y cobre (Cu). Sin embargo, en el siglo XVIII se registró el máximo esplendor de la minería. Actualmente, se encuentra en el primer lugar en la producción de plata (Ag), quinto lugar en plomo (Pb), sexto en zinc (Zn) y molibdeno (Mo), noveno en Au y undécimo en Cu. La minería contribuye con el 4% del producto interno bruto nacional y es la fuente laboral de alrededor de 352,666 familias de manera directa y 1.6 millones de manera indirecta en todo el país (INEGI, 2011). Los minerales se utilizan como materia prima en un gran número de ramas industriales en las que destacan la petrolera, la siderúrgica, la química, la electrónica, la del vidrio, la cerámica y la construcción. Sin embargo, la explotación de dichos minerales conlleva a la generación de residuos mineros los cuales en la mayoría de los casos no reciben algún tratamiento posterior para la neutralización de contaminantes (Romero *et al.*, 2011). Estos residuos reciben el nombre de jales y se caracterizan por ser rocas pulverizadas con remanentes de reactivos de extracción, sulfuros metálicos y elementos potencialmente tóxicos (EPTs) como arsénico (As), antimonio (Sb), cadmio (Cd), Cu, cromo (Cr), mercurio (Hg), níquel (Ni), plomo (Pb) y Zn. Todas las entidades federativas del país registran yacimientos mineros, pero, la acumulación de estos residuos no estaba controlada, sino hasta el año 2004. En este año se aprobó la norma de disposición de jales, NOM-141-SEMARNAT-2004. La cual sólo aplica para proyectos iniciados a partir de ese año (SEMARNAT, 2004). En México existe la acumulación de estos residuos mineros en diversos estados entre los que se encuentra Morelos (Velasco *et al.*, 2004).

1.2 Jales de la localidad de Huautla Morelos

El estado de Morelos se ha caracterizado por presentar varios distritos mineros que se han explotado por varias décadas. Los metales extraídos han sido de Ag, Pb y Zn, siendo los distritos mineros ubicados en el municipio de Tlalquiltenango los más explotados en el

estado. En dicho municipio se explotaron seis minas durante los siglos XVIII y XIX y hasta 1950. Estas minas fueron cerradas en 1993 y se localizan dentro de una zona decretada como “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” (REBIOSH), decretada como tal en 1999 (INEGI, 2004). Esta reserva protege cerca de 59,000 hectáreas de la selva baja caducifolia, ecosistema que cuenta con una gran biodiversidad de flora y fauna (Dorado *et al.*, 2005).

Dentro de la REBIOSH se encuentra el poblado de Huautla, el cual presenta una riqueza natural en minerales azufrados como Pb y Ag. En Huautla se estima que existen alrededor de 780 mil toneladas de residuos mineros ricos en Pb, As, Cd, Zn, y Cu, además de otra cantidad de material no procesado como Pb, Cd, Mn y Zn (SEMARNAT, 2005). Existen tres jales en la zona, los cuales se encuentran a la intemperie y al borde del “Arroyo Chico”, el cual se junta con los arroyos Juchitlán, Salitre y Atlipa, para formar el “Arroyo Grande” que desemboca en el Río Amacuzac (SEMARNAT, 2005). Por lo que, la lixiviación de estos metales hacia los cuerpos de agua superficiales y subterráneos y su transporte a otras regiones, tienen una gran probabilidad de ocurrir, sobre todo durante la temporada de lluvias. Además, dado que es una zona semiárida la dispersión eólica también influye en la dispersión de los residuos.

En un estudio realizado por la SEMARNAT y el Instituto Nacional de Ecología se determinó que los jales de Huautla contenían elevadas concentraciones de Pb (3340 mg/kg) y As (274 mg/kg) rebasando los límites máximos permisibles propuestos por la NOM-127/SSA-1-2004 para As (20 mg/kg suelo residencial y 40 mg/kg suelo industrial) y para Pb (200 mg/kg suelo residencial y 1500 mg/kg suelo industrial). También se encontraron concentraciones elevadas de Cu, Zn y Cd y se determinó la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en las muestras de jales a través de la proporción del metal que puede lixiviar en condiciones ácidas. De todos los metales analizados As, Cd, Pb y Hg fueron solubles (SEMARNAT 2004, 2005).

1.2.1 Peligrosidad de los jales para el medio ambiente

Los jales de Huautla contienen sulfuros residuales como la acantita, calcita, calcocita, galena y plata, la cual, además de los minerales anteriores esta normalmente asociada con cobre, arsénico, cinabrio, cobaltita y barita (The Mineral Database, 2004). De esta manera, los altos contenidos de Pb y As detectados en los residuos de la zona, pueden relacionarse

directamente con el tipo de minerales explotados. La oxidación de los sulfuros deriva en la generación de drenaje ácido de mina (DAM), que son soluciones que se caracterizan por presentar bajos valores de pH (<2) y altas concentraciones de EPTs además se caracterizan por tener un color amarillo anaranjado (Talavera *et al.*, 2006). El DAM causa la degradación del suelo permitiendo la dispersión de estos EPTs, que son altamente solubles, aumentando su movilidad, biodisponibilidad y lixiviación, afectando a los recursos naturales como suelos urbanos, los cultivos, ríos, el agua superficial y subterránea del entorno, los ecosistemas, afectación a la biota nativa y también al ser humano (Dold, 2002; Medel *et al.*, 2008).

1.3 Generalidades de los metales pesados

Dentro de los principales EPTs que repercuten en el medio ambiente se encuentran los MP que se definen como aquellos elementos que tienen una densidad mayor de 5 g/cm^3 en su forma elemental y que no son esenciales para el metabolismo de la biota, siendo ocho metales pesados y un metaloide que se incluyen en esta clasificación, los cuales son: Cd, Hg, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, Te y As (Fergusson, 1990). De acuerdo con Tiller (1989) los MP se identifican por su característica de brillo, conductividad de calor y electricidad, con excepción del mercurio (Hg) todos los metales son sólidos a temperatura ambiente. La mayoría posee propiedades de dureza, con excepción de los alcalinos, que son muy suaves. Químicamente, estos tienden a perder electrones para formar cationes (Cañizares – Villanueva, 2000). Son caracterizados con base a sus propiedades físicas en el estado sólido por su reflectividad, conductividad eléctrica y térmica. Estos MP actúan como agentes tóxicos, ya que de acuerdo con la especie química del metal y con base al tiempo de exposición pueden producir un envenenamiento agudo o intoxicación crónica (Medel *et al.*, 2008). De tal manera que existe preocupación por los metales Cd, Pb y As, ya que son los más comunes en los jales de sulfuros o de metales base. Estos metales causan varias enfermedades y disfunciones del metabolismo que resultan de la exposición crónica (Vassilev *et al.*, 2004). Es importante mencionar que con base a la IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) por sus siglas en inglés As y Cd, están clasificados en la lista de agentes carcinogénicos de clase I. Mientras que Pb está clasificado como clase 2B. En la clase I se encuentran aquellos metales que son carcinogénicos para los seres humanos, mientras que en la clase 2B se encuentran los metales que posiblemente pueden ocasionar cáncer (IARC, 2012 y 2014).

1.3.1 Toxicidad de los metales pesados

Entre los contaminantes ambientales, los MP se han identificado como los elementos más tóxicos para casi todos los organismos vivos, debido a su toxicidad y a su elevada tendencia a bioacumularse. Además, se incluyen dentro de las sustancias persistentes emitidas al medio ambiente (Mussali-Galante *et al.*, 2013), ya que no pueden ser degradados de manera natural por lo que se encuentran en el aire, agua y suelo. A veces los MP cambian su estado de oxidación y pueden incorporarse a los seres vivos (Volke *et al.*, 2005; Núñez, 2007).

Los MP considerados tóxicos cumplen los siguientes criterios: son relativamente abundantes en la corteza terrestre, se extraen y se utilizan en procesos industriales, son tóxicos para el ser humano y causan perturbaciones en los ciclos biogeoquímicos (Morton, 2006). La exposición ambiental crónica a los MP generalmente resulta en un continuo de “respuestas” en todos los niveles de la organización biológica. Estas respuestas pueden abarcar desde alteraciones a nivel molecular, comprometiendo la salud del individuo hasta el riesgo de la salud del ecosistema (Kara, 2005; Arora *et al.*, 2008; Memon y Schröder, 2009). En los seres humanos, los MP, aún en bajas concentraciones, pueden causar intoxicación, mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Ali *et al.*, 2013).

Durante la explotación de los minerales, los MP son transferidos a los suelos, donde pueden acumularse localmente en algunas zonas y ser absorbidos por los organismos (Diez *et al.*, 2002). En el suelo los metales se distribuyen en fracciones sólidas con distinto grado de estabilidad: intercambiables, ligados a materia orgánica, a óxidos de hierro y manganeso, y a estructuras minerales (González-Flores, 2011). El equilibrio dinámico que se establece entre estas fracciones determina la movilidad y la biodisponibilidad de los MP. Los factores orgánicos más importantes en la regulación de los MP son el pH, el potencial redox (Eh), la concentración y tipo de coloides del suelo (materia orgánica, arcillas y óxidos) (Weng *et al.*, 2001; Diez *et al.*, 2002). Por lo anterior, la disponibilidad y solubilidad de los MP depende de las reacciones químicas entre éstos y los componentes sólidos del suelo (Basta *et al.*, 2005). Los MP que se encuentran en formas biodisponibles son fácilmente incorporados al ecosistema. En cambio, aquellos unidos a ligandos orgánicos o a cristales son difícilmente separados e incorporados al ecosistema (Kim *et al.*, 2005). La determinación de la concentración de MP en las diferentes fases sólidas presentes en el suelo, la solubilidad, la

movilidad y la biodisponibilidad de los MP es útil para conocer su distribución y predecir su comportamiento y su toxicidad (González-Flores, 2011).

Una vez movilizados los metales pueden ingresar a los organismos y acumularse en ellos, fenómeno conocido como bioacumulación. La bioacumulación es el aumento de la concentración del contaminante en un organismo en determinado tiempo (Moriarty, 1990). La acumulación de los MP en los organismos es un proceso complejo que depende de diversos factores tanto internos (inherentes al organismo) como externos (inherentes al metal) (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999). Los factores internos que juegan un papel determinante en la acumulación de los MP son: la talla de los organismos (Moriarty, 1990), el género (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1999), factores genéticos (Fratini *et al.*, 2008), características de historia de vida (Dauwe *et al.*, 2004) y los hábitos alimenticios (Laurinolli y Bendell-Young, 2006). De los factores externos se pueden mencionar: biodisponibilidad del y naturaleza química del MP. También depende de las características del medio en el que se encuentra tales como salinidad, pH, temperatura, humedad, entre otros (Guerrero, 2004).

En general, los metales tienen la capacidad de evadir barreras naturales que protegen al organismo y utilizar sistemas fisiológicos presentes en los organismos modificando diversos procesos celulares. Existen dos mecanismos generales por medio de los cuales los MP pueden causar daño celular. El primero involucra la unión del metal con distintas macromoléculas, lo que puede derivar en un cambio conformacional o bien este puede reemplazar a metales esenciales de sus sitios activos o sus sitios de unión. Dichos cambios alteran la homeostasis celular. Estos efectos se deben a la similitud química de los MP con cationes divalentes esenciales como Zn, Ca, Mg, entre otros (Leonard *et al.*, 2004). El segundo mecanismo involucra su actividad como centros catalíticos en reacciones tipo redox, que producen especies reactivas de oxígeno (EROs), las EROs son intermediarios que se forman mediante los procesos de oxidación metabólica. Las EROs incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Valko *et al.*, 2005). Las células se pueden adaptar a concentraciones fisiológicas de EROs, sin embargo, las altas concentraciones pueden causar daño oxidante a diversas proteínas, lípidos y al ADN (Qian *et al.*, 2003).

Debido a lo anterior, la mayoría de los MP pueden provocar daño indirecto a la molécula de ADN, causando rompimientos de cadena sencilla y doble (Mussali-Galante *et al.*, 2007). Además, los MP tienen la capacidad de generar aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, formación de micronúcleos, oxidación y alquilación de bases nitrogenadas, entre otros. Asimismo, se ha demostrado que la alteración de las enzimas involucradas en la reparación del material genético es un mecanismo común de toxicidad de diversos metales (As, Cd, Co, Ni), que se genera por el intercambio de iones metálicos esenciales que generalmente se encuentran en los centros catalíticos de este tipo de enzimas inhibiendo su función (Hartwig *et al.*, 2002, Rossman, 2003). Algunos metales como el Cr y compuestos de Ni solubles en agua ejercen sus efectos genotóxicos directamente a través de la unión covalente con el ADN generando la formación de aductos (Singh *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1999; Zhitkovich, 2005). Estos son productos que se generan mediante la unión covalente de una molécula de metal cargada positivamente con el ADN o proteínas de un tejido cargadas negativamente (Ehrenberg *et al.*, 1996).

1.4 Uso de biomarcadores en ecotoxicología

El uso de biomarcadores en ecotoxicología tiene como principales objetivos medir la exposición a los agentes xenobióticos que producen enfermedades y predecir la respuesta tóxica que podría ocurrir en un organismo. El National Research Council (NRC, 1991) ha definido a los biomarcadores como: herramientas que pueden ser útiles para comprender la relación que existe entre la exposición a un xenobiótico asociada a diversas enfermedades. Así también el NRC clasificó a los biomarcadores en tres categorías según la relación con la exposición-enfermedad: biomarcadores de susceptibilidad, biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto.

1.4.1 Definiciones y tipos de biomarcadores

Biomarcadores de susceptibilidad: son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo que le permite responder a la exposición de una sustancia xenobiótica. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños. Un ejemplo de biomarcador de susceptibilidad es la actividad de la N-acetiltransferasa (NAT). Los

individuos con una alta actividad de NAT tienen un riesgo más alto si son expuestos a los compuestos que son bioactivados por NAT (por ejemplo 2-aminofluoreno).

Biomarcadores de exposición: son considerados como cualquier sustancia exógena o producto de ella, así también los productos que pueden generarse entre la relación de un xenobiótico y alguna molécula o célula objetivo, y que a su vez puede ser medida dentro un organismo. Este tipo de biomarcadores también son conocidos como “biomarcadores de dosis biológica efectiva” cuando se mide el producto de un xenobiótico con moléculas diana (Timbrell, 1998). Por ejemplo, Jasso-Pineda *et al.* (2009), evaluaron la bioacumulación de MP en dos especies de roedores *Chaetodipus nelsoni* y *Dipodomys merriami* que habitaban en un área contaminada de Villa de la Paz, México, demostrando que estos roedores presentaban mayor concentración de As (1.3 µg/g en hígado y 1.8 µg/g en riñón), Pb (0.2 µg/g en hígado y 0.9 µg/g en riñón) y Cd (0.8 µg/g en hígado y 2.2 µg/g en el riñón) en comparación con los roedores del sitio control, As (0.08 µg/g en hígado y 0.1 µg/g en riñón), Pb (0.06 µg/g en hígado y 0.3 µg/g en riñón) y Cd (0.06 µg/g en hígado y 0.6 µg/g en riñón). Por otra parte, Martiniaková *et al.* (2011) evaluaron la bioacumulación de MP en el fémur de dos especies de roedores (*Myodes glareolus* y *Myodes arvalis*) que habitaban en una central eléctrica de carbón en Eslovaquia. Los autores encontraron que, en la especie *M. glareolus* las concentraciones de MP son las siguientes: Pb (20.46 mg/kg), Cd (4.01 mg/kg), Ni (9.52 mg/kg) Fe (212.99 mg/kg), Cu (4.16 mg/kg) y Zn (188.55 mg/kg) y para *M. arvalis* las concentraciones son: Pb (20.41 mg/kg), Cd (2.76 mg/kg), Ni (6.84 mg/kg), Fe (159.27 mg/kg), Cu (3.31 mg/kg) y Zn (138.52 mg/kg). Por otro lado, Camizuli *et al.* (2018) midieron las concentraciones de Cd, Cu, Pb y Zn en riñones de roedores que habitaban en una zona con actividad minera, reportando las siguientes concentraciones: (10.37 - 22 µg/g), Zn (44.5 – 160 µg/g), Cd (0.05 – 38 µg/g) y Pb (0.05 – 19 µg/g).

Biomarcadores de efecto: hacen referencia a cualquier alteración que se puede generar por la exposición a un xenobiótico en un organismo dado, entre estas alteraciones se encuentran las bioquímicas, genéticas fisiológicas y conductuales, que son asociadas a múltiples enfermedades (Timbrell, 1998). Dentro de este tipo de biomarcadores, se encuentran aquellos que miden el daño genético y son ampliamente utilizados debido a que nos permiten conocer cambios tempranos que pueden generarse en un organismo y que conducen eventualmente a

la aparición de diversas enfermedades (Mutti, 2004). Por lo anterior, los biomarcadores de efecto se utilizan para comprender los cambios en un organismo como resultado de su exposición química y nos permite conocer las alteraciones que pueden presentarse en el ADN, entre las que se encuentran las aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos y rompimiento de las cadenas sencillas y dobles del ADN (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, en este estudio nos enfocaremos en los biomarcadores de exposición (bioacumulación de MP) y efecto (daño genético).

Por otra parte, existen diversos estudios en donde se ha evaluado el daño genético en roedores expuestos a MP mediante la prueba de ensayo cometa, tal es el caso de Jasso-Pineda *et al.* (2009), en donde reportaron que roedores colectados de un área minera en Villa de la Paz, México presentaron mayores niveles de daño genético en comparación con los roedores del sitio control. En otro estudio realizado por Patlolla *et al.* (2009), evaluaron el daño genético a través de electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa), trataron a ratas Sprague-Dawley con $K_2Cr_2O_7$. Los roedores expuestos a esta sustancia metálica mostraron daño en el ADN ya que presentaron mayor longitud media de la cola del cometa ($6.23 - 33.42 \mu m$) en comparación con los controles ($2.79 \mu m$). Asimismo, en un estudio realizado por Feng-Wang *et al.* (2006) se evaluó el daño genético en roedores de laboratorio expuestos a diferentes dosis de Cr VI y encontraron que a mayor concentración de Cr VI mayor daño genético en el grupo expuesto a 100 mg/kg de Cr VI con respecto al grupo control. Por otra parte, en un estudio realizado por Patlolla *et al.* (2015) evaluaron el daño genético en hígado, utilizando como modelo de estudio ratas expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (Ag-NP). Dichos autores encontraron que las células hepáticas expuestas a todas las concentraciones de Ag-NP presentaron daño en el ADN con un porcentaje del largo de la cola del cometa equivalente a cada una de las dosis administradas (19.33 ± 5.84 , 24.69 ± 6.06 , 30.48 ± 6.60 y 34.31 ± 10.70) indicando el daño en el ADN en comparación con el grupo control en donde reportan un porcentaje menor (13.58 ± 4.66). En un estudio realizado por Malgorzata *et al.* (2014) evaluó la genotoxicidad de las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) y (Ag) mediante el ensayo cometa en células de médula ósea en ratas a las cuales administraron diferentes dosis de estos metales. Los autores encontraron daños en el ADN de las ratas expuestas a TiO_2 y Ag en comparación con las ratas control ya que el

porcentaje de la longitud en la cola del cometa de ADN. Los datos obtenidos denotan que el porcentaje de ADN aumentó 1.7 veces en el grupo expuesto con respecto al grupo control.

1.5 Rompimiento de las cadenas de ADN como biomarcador de efecto temprano

La técnica de electroforesis unicelular alcalina o también llamada “ensayo cometa” es la más utilizada y es una de las principales herramientas para estudios de genotoxicidad, biomonitoreo ambiental, epidemiología molecular y ecotoxicología ya que es una técnica rápida, simple y sensible, que se utiliza para el análisis del rompimiento de las cadenas sencilla y doble del ADN, sitios lábiles álcali y para la detección de sitios de reparación retardada (Rojas *et al.*, 1999). El ensayo cometa es considerado como un ensayo indicador para detectar lesiones premutagénicas. Se ha sugerido su uso *in vivo* como ensayo de seguimiento apropiado para investigar el significado de los resultados de genotoxicidad positivos *in vitro* (Hartmann *et al.*, 2003; Burlinson *et al.*, 2007). El ensayo cometa es dependiente del pH y es realizada en cualquier tipo de células eucariotas individuales (Rojas *et al.*, 1999). Existen dos versiones de electroforesis las cuales son similares en un principio, sin embargo, la mayor diferencia está dada en los valores de pH. La primera, la electroforesis alcalina emplea un pH mayor a 13, lo que permite la detección de las roturas de cadena simple del ADN y sitios álcali lábiles. Mientras que la segunda, la versión neutra (pH de 7.0), sólo detecta roturas de doble cadena (Olive *et al.*, 1999). Por esta razón la versión alcalina fue recomendada como la versión óptima del ensayo para la identificación de sustancias con actividad genotóxica potencial en el Internacional Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) (Tice *et al.*, 2000).

El ensayo cometa detecta ruptura de cadenas que pueden ser generadas en la célula por una variedad de agentes químicos (por ejemplo, especies reactivas de oxígeno), físicos (como las radiaciones ionizantes) y procesos celulares (como la reparación del ADN) (Collins, 2004). Esta técnica brinda información del mecanismo de daño, para lo cual se utilizan endonucleasas específicas que reconocen varios tipos de bases dañadas; así también es útil para probar si una sustancia tiene un efecto directo en la carcinogénesis por la adición de enzimas capaces de metabolizar el carcinógeno de forma indirecta hacia su forma activa. Por el contrario, el ensayo cometa también puede utilizarse para determinar el carácter protector de una sustancia, por ejemplo, su capacidad antioxidante de reducir el efecto oxidativo

generado, como el peróxido de hidrógeno (Rodríguez *et al.*, 2016). Por otra parte, el ensayo se destaca por sus múltiples ventajas: a) alta sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, b) rápida realización (1-2 días), c) permite realizar un análisis a nivel de células individuales, d) el tamaño de la muestra puede estar en el orden de miligramos o microlitros y, e) el bajo costo económico. Sin embargo, a pesar de sus múltiples aplicaciones, se debe tener en cuenta que este bioensayo es una técnica inespecífica pues sólo detecta el daño del ADN y no el agente tóxico, responsable de este efecto (Rodríguez *et al.*, 2016).

1.6 Relación entre biomarcadores de exposición y efecto en organismos expuestos a metales pesados

Existen algunos estudios con MP en roedores silvestres que relacionan los biomarcadores de efecto y los biomarcadores de exposición. Por ejemplo, Tovar-Sánchez *et al.* (2012) evaluaron el daño genético y las concentraciones de los MP (Zn, Ni, Fe y Mn) en hueso e hígado e la especie de roedor *Baiomys musculus* y *Peromiscus melanophrys*. En la primer especie las concentraciones (promedio $\pm$ error estándar) en hueso del grupo expuesto fueron las siguientes: Zn (130.52 ± 39.29), Ni (50.20 ± 34.66), Fe (62.49 ± 48.65) y Mn (3.21 ± 2.22) y para el grupo control Zn (26.24 ± 6.19), Ni (6.62 ± 2.65), Fe (16.63 ± 6.77) y Mn (1.19 ± 0.68). Mientras que para la segunda especie las concentraciones del grupo expuesto son las siguientes: para el caso de Zn (118.54 ± 39.29), Ni (42.30 ± 8.94), Fe (40.03 ± 31.41) y Mn (4.10 ± 2.90) y para el grupo control: Zn (58.06 ± 6.19), Ni (13.47 ± 5.74), Fe (20.64 ± 14.04) y Mn (2.56 ± 1.52). Por otra parte, también evaluaron las concentraciones de metales en el hígado de ambas especies, para la especie *B. musculus* del grupo expuesto las concentraciones fueron las siguientes: Zn (61.36 ± 19.13), Ni (0.94 ± 0.54), Fe (133.14 ± 62.27) y Mn (1.16 ± 0.17), mientras que para el grupo control las concentraciones fueron menores: Zn (20.82 ± 2.24), Ni (0.93 ± 0.32), Fe (57.95 ± 6.78) y Mn (0.80 ± 0.11), por otra parte para el grupo expuesto de la especie *P. melanophrys* las concentraciones fueron: Zn (40.29 ± 9.41), Ni (1.27 ± 0.58), Fe (124.41 ± 31.93) y Mn (0.97 ± 0.35) y para el grupo control Zn (20.87 ± 3.60), Ni (0.99 ± 0.12), Fe (52.03 ± 6.86) y Mn (0.65 ± 0.19). Asimismo, se evaluó el daño genético en ambas especies reportando que en la especie *B. musculus* se encontró mayor daño genético (111.31 ± 0.13) en comparación con la especie *P. melanophrys* (97.84 ± 0.12). En estas dos especies, los organismos del sitio expuesto presentaron mayor daño genético en comparación con los roedores del sitio control (*B. musculus* 46.56 ± 0.50)

y (*P. melanophrys* 36.08 ± 0.29) respectivamente. Por otra parte, en un estudio realizado por Jasso-Pineda *et al.* (2009) evaluaron la bioacumulación de MP en roedores de la familia *Heteromyidae* que habitaban en una zona contaminada y encontraron As (1.3 µg/g en hígado y 1.8 µg/g en riñón), Pb (0.2 µg/g en hígado y 0.9 µg/g en riñón) y Cd (0.8 µg/g en hígado y 2.2 µg/g en el riñón). Los resultados fueron comparados con los roedores que habitaban en un sitio control, libre de contaminantes, y encontraron los siguientes resultados: As (0.08 µg/g en hígado y 0.1 µg/g en riñón), Pb (0.06 µg/g en hígado y 0.3 µg/g en riñón) y Cd (0.06 µg/g en hígado y 0.6 µg/g en riñón).

II. ANTECEDENTES

2.1 Estudios ecotoxicológicos en la localidad de Huautla, Morelos

Existen diversos estudios realizados en la localidad de Huautla Morelos. Específicamente, en los jales de la región se han reportado concentraciones altas de metales, así como bioacumulación de los mismos en los tejidos de las especies vegetales con efectos sobre la variación morfológica y daño genético en *Prosopis leavigata* (Hernández-Lorenzo, 2015; Murillo-Herrera, 2015; Muro-González en prensa), *Vachellia farnesiana* (Santoyo-Martínez, 2016), *Vachellia campechiana* (Santoyo-Martínez *et al.*, 2020), *Sanvitalia procumbens* (Rosas, 2018), y *Crotalaria pumila* (Santoyo-Martínez *et al.*, en prensa); en comparación con las colectadas en sitios testigo. Por otra parte, también se han realizado trabajos importantes donde se observa el efecto de los metales en poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas a los jales. Tovar-Sánchez y colaboradores (2016), evaluaron la concentración de As en agua de bebida y sangre periférica de pobladores de Huautla. El agua de la mina “Pájaro verde” contenía niveles altos de As ($0.24 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$), excediendo los niveles permitidos por la norma nacional NOM-127-SSA1-1994 que es de ($0.025 \mu\text{g/mL}$). Además, esto se correlacionó con la concentración de As en sangre ($60 \mu\text{g/L}$) y el daño genético que presentaron los individuos expuestos, con respecto a los individuos del sitio testigo.

2.2 Exposición de los roedores a metales pesados provenientes de los jales de Huautla, Morelos

En general, todos los seres vivos del planeta están expuestos a rodeados a sustancias potencialmente tóxicas, producto de actividades antropogénicas, o directamente de la naturaleza. Las condiciones extremas de los jales son inapropiadas para los seres vivos, sin embargo, se ha reportado que existen algunas especies de roedores silvestres que habitan dicha zona minera y que se encuentran expuestos a cantidades elevadas de MP (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013). Algunos estudios en roedores silvestres, han demostrado que tienen la capacidad de acumular un amplio espectro de contaminantes. Existen roedores que viven dentro de los relaves de minas y están en contacto directo con el suelo, agua y los contaminantes del aire. La habilidad de los roedores de vida silvestre para acumular y concentrar MP incrementa el riesgo de toxicidad sobre la cadena alimenticia, siendo la dieta una de las principales vías de exposición. De la Cruz (2018) evaluó y comparó el daño genético y la bioacumulación de Al, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en la especie de roedor *L.*

irroratus que habitaba un sitio expuesto a los MP de los jales expuestos y un sitio control. En dicho estudio se encontró que los roedores expuestos a MP presentaron mayor daño genético y bioacumulación de metales en el hígado. La concentración de MP en los ratones del sitio control fue la siguiente: Al 0.01 mg/kg > Cu 6.34 mg/kg > Fe 464.45 mg/kg > Ni 0.07 mg/kg > Pb 2.03 mg/kg y Zn 38.22 mg/kg. Mientras que en los roedores expuestos a metales pesados la concentración fue de la siguiente manera: Al 8.26 mg/kg > Cu 17.96 mg/kg > Fe 1051.99 mg/kg > Ni 7.76 mg/kg > Pb 12.48 mg/kg y Zn 103.21 mg/kg. Por otra parte, en un estudio realizado por Esteves (2018) en la especie de roedor *P. melanophrys* expuestos a Zn, Cu, Mn, Ni y Fe presentan mutaciones puntuales y mayor fluctuación asimétrica en cráneo respecto a los roedores del sitio control. Por último, Hernández-Plata *et al.* (2020) evaluaron en el roedor *L. irroratus* marcadores conductuales y neuroquímicos y la bioacumulación hepática y cerebral de los MP Pb, As, Mn, Ni y Zn. Los roedores expuestos a estos MP presentan algunas características de estrés, aumento en la concentración de dopamina en mesencéfalo, mayor concentración de Pb en hígado y en cerebro y disminución de Zn en cerebro respecto a los roedores del sitio control.

2.2.1 Roedores como especies centinela

El uso de organismos bioindicadores o centinelas es importante para establecer relación entre los efectos de los contaminantes y las respuestas biológicas de las especies expuestas. El NRC (National Research Council) ha definido a una especie centinela como “un sistema animal que sirve para identificar riesgos potenciales para otros animales o humanos” (NRC 1991). Claramente las especies centinelas son de gran utilidad e importancia para estudios de salud ambiental, debido a que proveen información integral tanto de la exposición (información del tipo, concentración y biodisponibilidad de los contaminantes) como del efecto (Basu *et al.*, 2007). Para que una especie pueda considerarse como centinela debe cumplir con los siguientes criterios: a) amplia distribución geográfica, b) habilidad para bioacumular contaminantes, c) fácil captura, d) poca movilidad, e) amplio conocimiento de su biología, f) sensible a los contaminantes, g) ciclo de vida corto, y h) mantenimiento en cautiverio (Beeby, 2001; Fox, 2001; Basu *et al.*, 2007).

Los roedores son de gran utilidad en este tipo de estudios dado que juegan papeles ecológicos importantes. Ocupan una gran variedad de nichos, son recicladores de nutrientes, influyen en

las comunidades de plantas e insectos y sirven como presas de numerosos predadores (Levengood y Heske, 2008). Además, cumplen con varios de los criterios antes mencionados para ser considerados como organismos centinela. Los roedores juegan un papel importante dentro de las cadenas tróficas y son considerados como intermediarios en la transferencia de MP desde el suelo hasta niveles tróficos más elevados (Levengood y Heske, 2008). También hay evidencia de que estos organismos acumulan MP en diferentes tejidos cuando están cerca de sitios mineros (Levengood y Heske, 2008), o dentro de los jales (Laurinolli y Bendel-Young, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

La exposición ambiental a MP puede promover alteraciones en la salud de los organismos expuestos. La absorción de MP y la subsecuente bioacumulación en diferentes órganos blanco, se ha relacionado con diversos daños al ADN que originan numerosas enfermedades. Por lo que, generar un sistema integral de biomarcadores de exposición y efecto para ser utilizado en estudios de biomonitoreo ambiental en exposiciones crónicas a metales se torna necesario, más aún si este sistema se desarrolla en especies silvestres, consideradas como centinelas. Algunas especies de roedores silvestres que habitan en o cerca de zonas impactadas por minería han sido consideradas como especies centinelas, y se ha reconocido que la sensibilidad de los contaminantes varía entre especies y entre géneros (macho vs hembra) de roedores. Por lo anterior, en este estudio se plantea probar un sistema de biomarcadores de exposición (bioacumulación de metales) y de efecto temprano (daño genotóxico) y la relación entre ellos; en términos de su respuesta en distintas especies, géneros y órganos en roedores silvestres considerados como centinelas que han estado expuestos a los residuos mineros en la localidad de Huautla, Morelos. La información generada en el presente estudio se podría emplear en la toma de decisiones para estudios de biomonitoreo ambiental en roedores silvestres.

IV. HIPÓTESIS

Si los roedores silvestres que habitan ambientes contaminados por metales pesados (jales de Huautla) presentan diferente historia de vida, y diferencias fisiológicas entre hembras y machos, entonces se encontrarán cambios en la concentración de MP (biomarcador de exposición) entre especies, géneros y órganos blanco. Por lo anterior, los niveles de rompimiento de cadena sencilla (biomarcador de efecto) cambiará entre especies de roedores y género.

Si los biomarcadores de exposición y efecto son sensibles a la especie de roedor, género y órgano blanco y están en función del MP, entonces existirá un biomarcador de exposición (concentración de metales) y/o efecto (rompimiento de cadena sencilla) con carácter predictivo de daño para cada tipo de MP evaluado.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el biomarcador de exposición y/o efecto más adecuado en tres especies de roedores silvestres (*Peromyscus melanophrys*, *Baiomys musculus* y *Liomys irroratus*) para el biomonitoreo ambiental de zonas impactadas por la minería.

5.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar el efecto del órgano, género (hembras y machos) y especie de roedor sobre los patrones de bioacumulación de metales pesados.
- 2.- Evaluar el daño genético a través del rompimiento de cadena sencilla en las tres especies de roedores y género.
- 3.- Conocer la relación entre la bioacumulación de los MP por órgano, género y especie de roedor y los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitios de estudio

6.1.1 Sitios expuestos: Jales de Huautla Morelos.

Los jales ubicados en la localidad de Huautla Morelos son conocidos por su gran tradición minera. Las minas de esta región explotaron principalmente Pb, Zn y Ag. Durante esta explotación se produjeron tres jales en la zona, los cuales fueron generados y manejados de la misma manera por lo que todos ellos tienen una composición similar. En este caso sólo de muestrearon dos jales, los cuales se encuentran ubicados de la siguiente manera:

Jale 1. Es el más grande de la zona (180×80 m) y se encuentra a $18^{\circ}26'36.37''\text{N}$ - $99^{\circ}01'26.71''\text{O}$. Se localiza a 500 m del poblado de Huautla. Este jale ha sido ampliamente estudiado en cuanto a sus características físico-químicas y contenido de metales. Está rodeado de selva baja caducifolia (Rzedowski 2006). Los valores de pH varían de 6.2 a 7.0, tienen una capacidad de intercambio catiónico $30.1 \text{ cmol (+)}/\text{kg}$ y el tamaño de partícula predominante es $<45 \mu\text{m}$ (44.2 %), siendo esta fracción donde la mayor cantidad de metales está contenida (As 31.9%, Cd 26.0%, Pb 30.7% y V 29.1 %) (SEMARNAT 2004, 2005).

Jale 2. Es el más pequeño de la zona y se encuentra ubicado a $18^{\circ}25'40.60''\text{N}$ - $99^{\circ}01'57.82''\text{O}$. Las colectas fueron realizadas en los dos jales, pero los análisis fueron considerados como un solo sitio, por lo que nos referiremos como sitio expuesto.

6.1.2 Sitio control: Quilamula, Morelos

Quilamula se encuentra ubicada geográficamente a $18^{\circ}30'52''$ latitud N y $98^{\circ}59'59''$ longitud O (INEGI 2009). El sitio control fue elegido debido a que no existe reporte de actividad minera ni de contaminación por metales. Además, las características climáticas, ecológicas y geográficas son muy similares a las zonas contaminadas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).

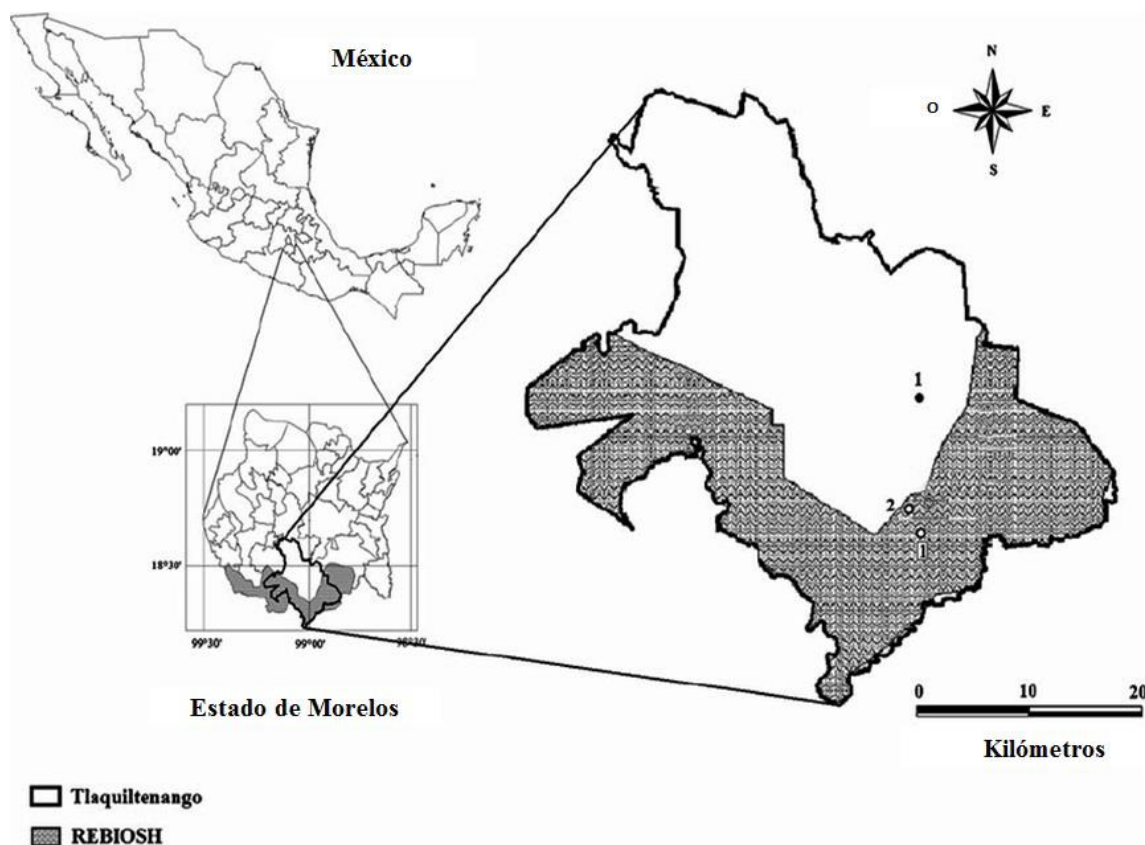


Figura 3. Mapa de la localización geográfica de los sitios de estudio. o) indica los sitios expuestos a MP en los jales de Huautla, Morelos. •) Indica el sitio control en la localidad de Quilamula, Morelos.

6.2 Especies de estudio

Peromyscus melanophrys (Coues, 1874)

P. melanophrys presenta algunas características que lo diferencian de otras especies que pertenecen al género *Peromyscus*, algunas de ellas son que tiene una cola más larga y sus lóbulos cerebrales son más delgados (Figura 2.A) (Ceballos y Oliva, 2005). La coloración de su pelaje es variada y depende del sustrato en donde habitan. Esta especie se encuentra preferentemente en zonas áridas, asociado con yucas, nopal, mezquite, entre otras. Dicha especie es abundante en sitios rocosos y se encuentran principalmente en el matorral xerófilo, bosque espinoso y pastizales, en asociaciones vegetales de matorral desértico micrófilo y chaparrales, donde el clima es árido y templado (Ceballos y Oliva, 2005). Su ciclo reproductivo se encuentra activo durante todo el año, sin embargo, se presenta mayor actividad en los meses de Febrero-Marzo y Junio-Octubre. El tamaño por camada es de 2 a

5 crías y se les caracteriza por ser roedores granívoros (Hall, 1981). Su estatus de acuerdo a “The IUCN Red List of Threatened Species” (IUCN), es de preocupación menor.

***Baiomys musculus* (Merrian, 1892)**

B. musculus es el roedor de tamaño más pequeño en México, su coloración dorsal varía de café rojizo a café oscuro y la parte ventral es blanca. Los individuos juveniles son de color gris uniforme (Figura 2.B) (Hall, 1981). Esta especie habita en áreas tropicales y semidesérticas, con abundantes pastos y arbustos. También se encuentra en campos abandonados de maíz y diversos cereales, en los bordes cercanos a plantíos de caña de azúcar y palmas de coco (Ceballos y Miranda, 1986, 2000; Cervantes y Hortelano, 1991). Utilizan restos de pastos para construir sus nidos en madrigueras subterráneas, entre las rocas o entre pastos. Su alimentación se basa principalmente en consumir hierbas y pastos frescos, además de semillas, cortezas y pequeños insectos. Son de hábitos diurnos y crepusculares. Su ciclo reproductivo se encuentra activo durante todo el año, sin embargo, reportan menor actividad durante el invierno y la primavera (Packard, 1960). El periodo de gestación dura de 20 a 25 días y presentan un periodo de lactancia de 20 días aproximadamente. El tamaño de camada es de una a cinco crías, aproximadamente 3 en promedio. Su área de actividad es de 30 m de diámetro, y las densidades de sus poblaciones son de 15 a 20 ind/ha. Esta especie no se encuentra en peligro de extinción de acuerdo a la IUCN (Ceballos y Miranda, 1986, 2000).

***Liomys irroratus* (Gray, 1968)**

L. irroratus (Rodentia: Heteromyidae) es conocido como el ratón espinoso mexicano se encuentra ampliamente distribuido en el centro y noreste de México y en el extremo sur de Texas (Figura 2.C) (Dowler y Genoways, 1978; Wilson y Reeder, 2005; Linzey *et al.*, 2008). Habita usualmente en zonas áridas y tropicales, así como en vegetación xerófila, matorrales, pastizales, selvas secas, y algunos bosques de pino encino (Dowler y Genoways, 1978). *L. irroratus* es un ratón de color gris con café en la parte dorsal y blanco en la parte ventral; generalmente presentan una raya lateral de color rosa pálido en el lomo, la presencia de una mezcla de pelos espinosos duros y suaves le da una apariencia un tanto áspera. El pelaje juvenil es grisáceo y se compone principalmente de pelos finos suaves (Dowler y Genoways, 1978). Esta especie es territorial y tiene hábitos nocturnos (Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). Presentan dimorfismo sexual, los machos más grandes que las hembras con

una longitud promedio de 238 nm en los machos y 226 nm en las hembras. Además, los machos tienen un rango de peso corporal de 40-60 g y las hembras de 35-50 g. *L. irroratus* cría durante todo el año, pero su pico reproductivo aparece en los meses de Agosto a Noviembre (Dowler y Genoways, 1978). Su ciclo reproductivo es monoéstrico y su periodo de gestación es entre 21 y 28 días, el número de crías varía de 2 a 8 por camada con un promedio de cuatro (Dowler y Genoways, 1978; Linzey *et al.*, 2008). Se alimentan de una gran variedad de semillas, de hojas y tallos, así como de artrópodos. Sin embargo, se señala que la dieta varía de acuerdo a las poblaciones, lo que sugiere su carácter oportunista (Mason-Romo, 2005). Poseen abazones en las mejillas cubiertas de pelaje, los cuales le permiten la recolección eficiente y el transporte de alimento hasta su madriguera construida bajo troncos, rocas o arbustos (Dowler y Genoways, 1978; Linzey *et al.*, 2008; Santos-Moreno y Santiago-Marcial, 2012). De acuerdo a la IUCN, su estatus es de preocupación menor.

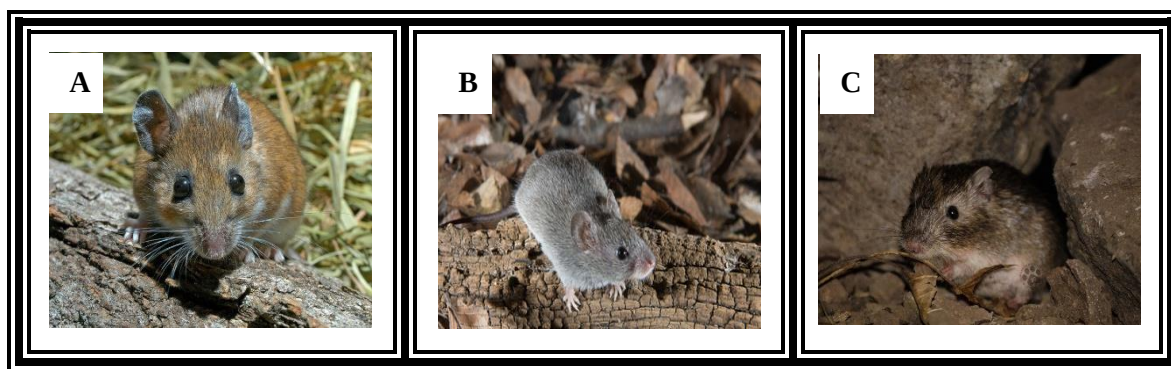


Figura 4. Especies de roedores utilizadas en este estudio. A) *P. melanophrys*, B) *B. musculus* y C) *L. irroratus*.

6.3 Colecta de roedores y extracción de órganos

Para llevar a cabo la colecta de roedores se colocaron 120 trampas Sherman por día en el sitio expuesto y el control. Las cuales fueron cebadas con una mezcla de avena, vainilla y cacahuete, con una distancia de 5 metros entre cada una, los muestreos se realizaron a partir del mes de agosto a septiembre del 2018, hasta obtener un tamaño de muestra de 6 individuos por género (hembras y machos) de las especies *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus*. Posteriormente, los roedores capturados se tomaron con ayuda de guantes de carnaza y aquellos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión como: estado de salud aparentemente sano, no ectoparásitos, juveniles-adultos y que pertenecían a las especies de

interés fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Posteriormente los roedores fueron pesados y se registraron las medidas morfométricas convencionales (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). También se llevó a cabo la extracción de órganos: intestino, riñón, cerebro, hueso e hígado. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la regulación mexicana sobre muestreo y ética de manejo de muestras animales FAUT-025.

6.4 Cuantificación de metales pesados en órganos de roedores

Una vez extraídos los órganos se colocaron en un contenedor con nitrógeno líquido para su transporte al Laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB. Para llevar a cabo la digestión ácida de los órganos estos fueron secados en una estufa a 80° C, una vez que se encontraban totalmente secos cada uno de los órganos se procedió a macerar con ayuda de un mortero y pistilo y se pesó 0.25 g de cada muestra. Posteriormente se añadió 10 mL de ácido nítrico (HNO₃ al 70%) en campana de extracción y se colocaron en parrillas a 400° C de 3-4 h hasta que las muestras se encontraron totalmente disueltas. Después las muestras fueron aforadas en un matraz de 50 mL y colocadas en refrigeración hasta su posterior lectura mediante espectrometría de absorción atómica (980 AA, GBC) y espectrometría de plasma acoplada a masas (ICP-MS) con un espectrómetro tipo ICP-820 de la serie MS de Bruker, MA, USA para llevar a cabo la cuantificación de MP. Los MP analizados fueron Fe, Cr, Zn, Cu, Mn, Cd y Pb (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).

6.5 Evaluación del daño genotóxico (rompimiento de cadena sencilla) en sangre periférica de roedores

El análisis de genotoxicidad fue evaluado mediante la técnica de ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina. Para la realización de la técnica se extrajo la sangre de cada uno de los roedores y se utilizaron 15 µL de cada roedor, posteriormente se mezcló con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5%). La mezcla se colocó en un portaobjetos con 170 µL de agarosa de fusión normal gelificado (NMPA 1%) y se cubrió con un cubreobjeto para formar un microgel. Una vez gelificada la capa de agarosa con la sangre se adicionaron nuevamente 75 µL de agarosa sin mezclar. En cuanto se gelificaron las tres capas de microgel, fueron sumergidas en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris-base, NaOH, DMSO y Tritón X-100 a pH 10 y una temperatura de 4° C) durante tres días en oscuridad. Posteriormente permanecieron durante 20 min en buffer de corrida (300 mM de NaOH y 1 mM de EDTA a pH > 13). La migración

del ADN se realizó mediante electroforesis a 25 V y 300 mA durante 20 min a 4° C en oscuridad. Posteriormente las laminillas fueron neutralizadas con solución de Tris 0.4 M pH 7.5 y fueron fijadas con etanol frío al 96%. Las laminillas con el microgel fueron teñidas con bromuro de etidio (50 mL de una solución de 20 mg/mL c/u) para su posterior lectura en un microscopio de fluorescencia Olympus BMX-60 (Tovar-Sánchez *et al.*, 2016).

6.6 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de regresiones lineales para determinar la relación e influencia entre los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla) y la bioacumulación de metales pesados (Pb, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Co, Cr, Al, Cd y As) en los órganos (hígado, riñones, hueso, cerebro e intestino) y género (hembras y machos) de tres especies de roedores *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus* que habitan el sitio expuesto (Jales de Huautla) y sitio control (Quilamula) en Morelos.

En general, se obtuvieron los valores de coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2) y el valor de significancia ($P < 0.05$) en cada análisis de regresión, así como la ecuación de la recta. Posteriormente, se realizaron gráficas de correlación en donde se observan dos variables (X y Y), la variable independiente (X) causa efectos en la variable dependiente (Y). La fórmula utilizada para las regresiones lineales es ($y = mx + b$), en donde (m y b) representan el valor del daño genético y (x) el valor de la concentración del metal. El cual es multiplicado por el valor del daño genético, a su vez el valor de (m) es convertido a un valor tangencial. Es decir, la pendiente se da en valores de 0 a ∞ para valores positivos. Sin embargo, los valores de tangente se pueden transformar en valores angulares utilizando la siguiente función: $\text{angtan} = \theta$ o $\text{tg}^{-1}(\alpha) = \theta$, que se puede leer de la siguiente manera: θ es el ángulo cuya tangente es α . Por lo tanto, en lugar de usar valores entre 0 a ∞ se utilizaron valores de 0 - 90° debido a que son más fáciles de interpretar. De la misma manera los valores de (0 - 90°) se pueden convertir en valores normalizados entre 0-1. De acuerdo al modelo de (Ramos-Quintero, 2016), se ha seleccionado la función exponencial para modelar los grados obtenidos en la tangente de las gráficas en cinco zonas que representan la influencia de la variable independiente (X) en la variable dependiente (Y). Las zonas son clasificadas de la siguiente manera: en el grado de 0 - 20° la influencia de X en Y es muy baja, de 20 - 40° la influencia de X en Y es baja, de 40 - 60° la influencia de X en Y se encuentra en un rango

medio, de 60 - 80° la influencia de es alta y de 80 - 90° la influencia es muy alta (Figura 3, Tabla 1). Algunos datos se muestran en promedio y error estándar ($\bar{X} \pm e.e$).

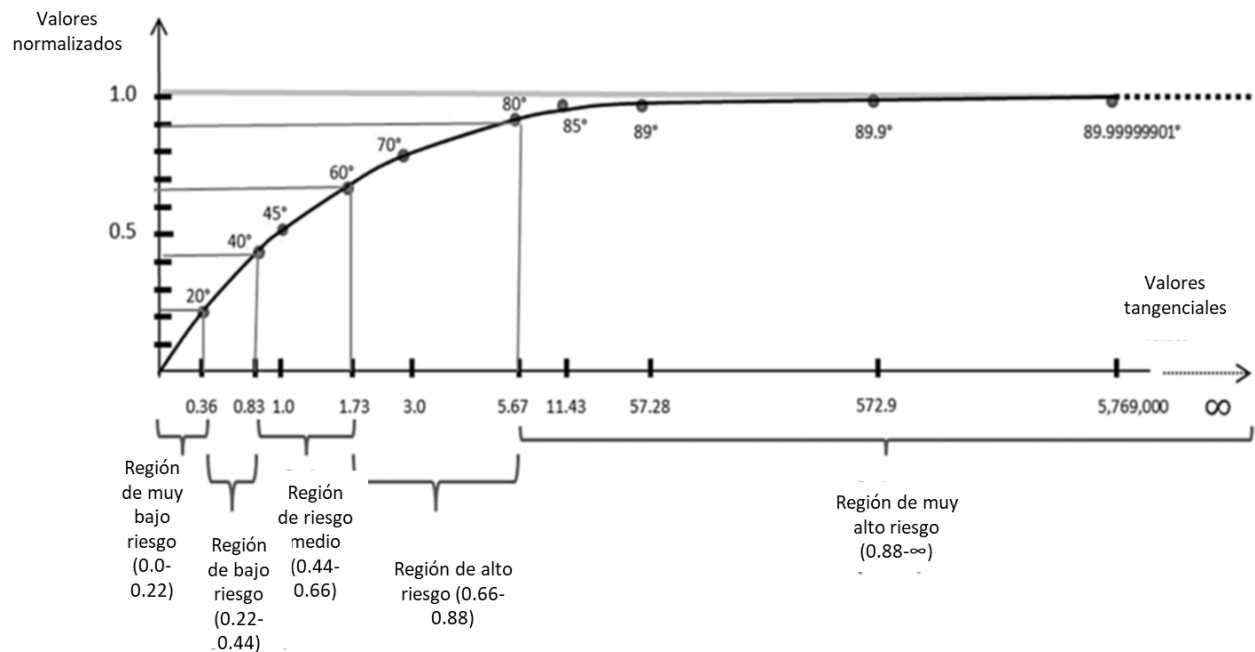


Figura 5. Modelo de valores tangenciales, valores angulares y normalizados por regiones de influencia: muy baja, baja, medio, alta y muy alta (modificado de Ramos-Quintana, 2016).

VII. RESULTADOS

7.1 Niveles de daño genético y concentración de metales pesados en las especies de roedores *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus*

7.1.1 Niveles de daño genético

Se llevó a cabo el ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica para determinar los niveles de daño genético ocasionados por la bioacumulación de metales pesados en los diferentes órganos de las tres especies de roedores que habitan en los jales de Huautla. Para llevar a cabo el ensayo cometa se utilizó una N de seis individuos tanto hembras como machos de las especies *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus* pertenecientes al sitio expuesto y al sitio control. Para llevar a cabo el ensayo cometa se extrajo sangre periférica de cada uno de los individuos y se contó un total de cien linfocitos por cada individuo para finalmente obtener un promedio del daño genético ocasionado por la bioacumulación de metales pesados tanto en hembras como en machos de las tres especies de roedores evaluadas en los sitios expuesto y control (Tabla 1).

Tabla 1. Daño genético medido por el rompimiento de cadena sencilla ($\bar{X} \pm e.e$) en las tres especies de roedores silvestres *Peromyscus melanophrys*, *Baiomys musculus* y *Liomys irroratus* en los sitios control (Quilamula) y expuestos a los jales de Huautla, Morelos

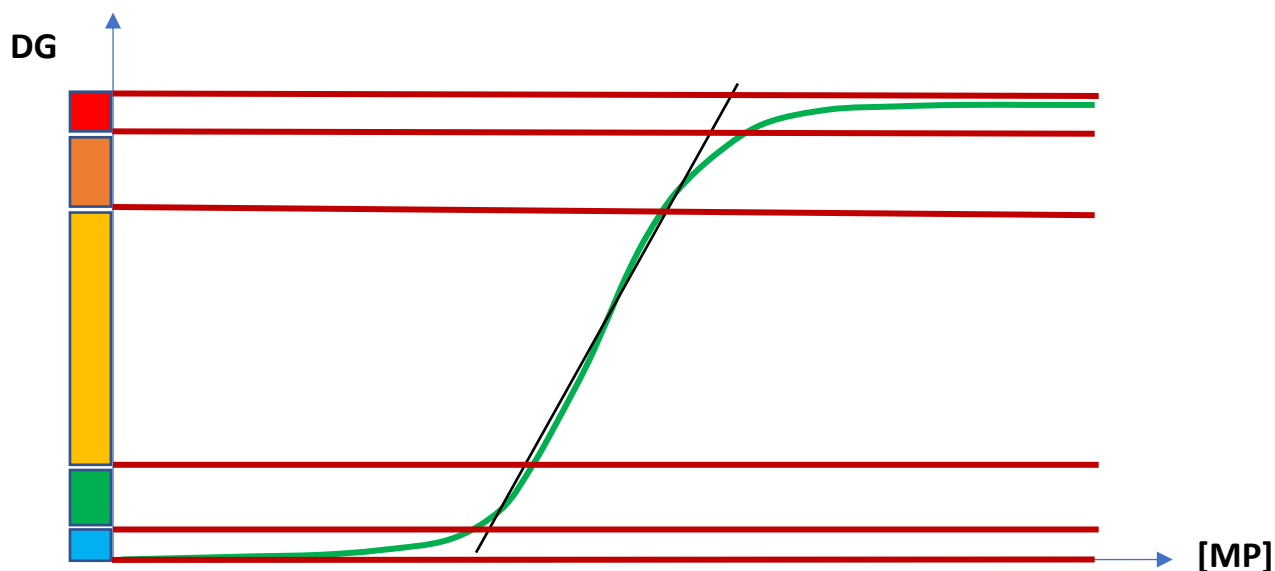
Hembras		Machos	
Control	Expuesto	Control	Expuesto
<i>P. melanophrys</i>			
39.768 $\pm$ 3.40	186.34 $\pm$ 12.84	29.454 $\pm$ 1.71	153.39 $\pm$ 8.75
<i>B. musculus</i>			
52.964 $\pm$ 6.30	224.52 $\pm$ 11.18	28.641 $\pm$ 7.97	134.58 $\pm$ 9.38
<i>L. irroratus</i>			
43.641 $\pm$ 7.64	173.07 $\pm$ 3.87	27.158 $\pm$ 6.68	152.03 $\pm$ 5.46

7.3 Categorías de influencia entre la concentración de metales pesados y los niveles de daño genético: comportamiento sigmoidal

De acuerdo al modelo de Ramos-Quintana (2016) en este estudio se proponen categorías de influencia entre la concentración de MP y los niveles de daño genético a través de un modelo Sigmoidal. En la tabla 3 se pueden apreciar las diversas categorías que existen entre la concentración de los metales y su relación con el daño genético. La tabla se encuentra dividida en cinco categorías de impacto, donde por cada categoría se muestran los rangos en valores tangenciales, valores angulares y valores normalizados. La representación en categorías de impacto facilita la interpretación de los resultados que muestran la influencia de la bioacumulación de metales en los niveles de daño genético (Tabla 3).

Por otra parte, a cada categoría se le ha asignado un color (como un semáforo) que nos permita identificar de manera más rápida la zona de influencia que tiene la variable independiente (x = concentración de metales) sobre la variable dependiente (y = daño genético). En la zona de ***muy bajo riesgo*** que equivale en valores angulares (0° - 20°) se ha utilizado un color azul claro, en la zona de ***bajo riesgo*** que equivale a (20 - 40°) se ha utilizado un color verde oscuro, para el caso de la zona de ***riesgo intermedio*** (40 - 60°) se ha utilizado un color amarillo, para la zona de ***alto riesgo*** (60° - 80°) se ha utilizado un color naranja oscuro y para la zona de ***muy alto riesgo*** (80° - 90°) se ha utilizado un color rojo (Figura 4). Cabe mencionar que estos colores se han utilizado en las tablas de los resultados de este estudio con el fin de conocer de manera rápida y visual la categoría de impacto que tienen los metales en el daño genético de cada especie de roedor.

Figura 4. Categorías de influencia entre la concentración de metales y los niveles de daño genético a través de un modelo sigmoideal. MP = metales pesados, DG= daño genético.



Rangos en valores tangenciales	Rangos en valores angulares	Normalizado	Zonas de impacto
[0.0-0.36)	[0°-20°)	[0.0-0.22)	Muy baja influencia
[0.36- 0.83)	[20°-40°)	[0.22-0.44)	Transición hacia la zona intermedia de influencia
[0.83-1.73)	[40°-60°)	[0.44-.066)	Zona de influencia intermedia
[1.73-5.67)	[60°-80°)	[0.66-0.88)	Transición a una zona de influencia muy alta
[5.67 a infinito)	[80°-90°]	[0.88-1)	Zona muy alta de influencia

7.4 Relación entre la bioacumulación de metales pesados y los niveles de daño genético en roedores silvestres (machos y hembras) asociados a jales

Bioacumulación de metales en hígado y daño genético en linfocitos de sangre periférica

En general, los metales bioacumulados en hígado de roedores silvestres de las especies *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus* son: Pb, Cu, Fe, Mn, Zn, Co, Cr, Al, As y Cd, tanto en hembras como en machos. En general, la bioacumulación de MP y metaloides varió entre especies de la siguiente manera: *L. irroratus* (n=8) > *P. melanophrys* (n=5) = *B. musculus* (n=5) tanto en hembras como en machos. Asimismo, los metales Cu, Fe, Mn, Zn y Ni se bioacumularon en los hígados de las tres especies. En contraste, sólo el Pb, Al y As se bioacumuló en *L. irroratus*.

Las regresiones que fueron significativas y con un valor de correlación (*r*) mayor a 0.5 por especie son: *L. irroratus* (n=7) > *B. musculus* (n=4) > *P. melanophrys* (n=3) para el caso de los machos y para las hembras *L. irroratus* (n=6) > *P. melanophrys* (n=5) = *B. musculus* (n=5) (Tabla 4).

Tabla 3. Relación entre la bioacumulación de metales en hígado y el daño genético en linfocitos de sangre periférica.

Metal	Especie de roedor								
	<i>P. melanophrys</i>			<i>B. musculus</i>			<i>L. irroratus</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
Machos									
Pb		nd			nd		0.962	0.918	0.000
Cu	0.817	0.634	0.001	0.817	0.634	0.001	0.895	0.781	0.000
Fe	0.905	0.801	0.000	0.803	0.610	0.002	0.769	0.551	0.003
Mn	0.549	0.232	0.064	0.699	0.437	0.011	0.705	0.447	0.010
Zn	0.895	0.781	0.000	0.935	0.862	0.000	0.751	0.520	0.005
Ni	0.105	0.088	0.744	0.171	0.067	0.593	0.622	0.325	0.03
Co		nd			nd			nd	
Cr		nd			nd			nd	
Al		nd			nd		0.819	0.639	0.001
As		nd			nd		0.349	0.034	0.267
Cd		nd			nd			nd	
Hembras									
Pb		nd			nd		0.926	0.843	0.0001
Cu	0.859	0.711	0.0003	0.960	0.913	0.0000	0.905	0.800	0.0005
Fe	0.801	0.605	0.001	0.829	0.655	0.0009	0.873	0.738	0.0002
Mn	0.771	0.554	0.003	0.745	0.511	0.005	-0.16	0.073	0.627
Zn	0.966	0.926	0.000	0.869	0.731	0.0002	0.970	0.934	0.0000
Ni	0.696	0.434	0.01	0.809	0.620	0.001	0.823	0.644	0.001
Co		nd			nd			nd	
Cr		nd			nd			nd	
Al		nd			nd		0.893	0.777	0.0009
As		nd			nd		0.205	0.054	0.522
Cd		nd			nd			nd	

r= coeficiente de correlación, *r*²= coeficiente de determinación, *p*= valor de significancia, nd= no detectable.

Bioacumulación de metales en riñón y daño genético en linfocitos de sangre periférica

Los metales bioacumulados en el riñón son los siguientes: Pb, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Al, As y Cd, para las especies *P. melanophrys* y *B. musculus* tanto en machos como en hembras, a excepción del Ni el cual no fue detectado en hembras. En particular, la bioacumulación varió entre especies de la siguiente manera: *P. melanophrys* (n=9) > *B. musculus* (n=8) tanto en hembras como en machos. Cabe mencionar que la especie *L. irroratus* no se muestra en el análisis de la bioacumulación de metales en riñones debido a que el tamaño de muestra no fue suficiente para los análisis.

Por otra parte, las regresiones que fueron significativas ($P < 0.05$) y con un valor de correlación (r) mayor al 0.5 para ambas especies fue la misma (n=7), tanto en machos como hembras. En general, las dos especies en ambos géneros de roedores bioacumulan los mismos metales en riñón (Tabla 5).

Tabla 4. Relación entre la bioacumulación de metales pesados en riñón y el daño genético en linfocitos de sangre periférica

Metal	Especie de roedor								
	<i>P. melanophrys</i>			<i>B. musculus</i>			<i>L. irroratus</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
Machos									
Pb	0.922	0.835	0.000	0.833	0.757	0.0001			
Cu	0.855	0.704	0.0004	0.852	0.698	0.0004			
Fe	0.280	0.013	0.377	0.441	0.114	0.152			
Mn	0.763	0.539	0.004	0.727	0.481	0.007			
Zn	0.583	0.273	0.04	0.595	0.289	0.04			
Ni	0.105	0.088	0.744		nd				
Co		nd			nd				
Cr		nd			nd				
Al	0.777	0.564	0.03	0.939	0.869	0.0000			
As	0.923	0.837	0.0000	0.939	0.869	0.0000			
Cd	0.852	0.699	0.0004	0.937	0.865	0.0000			
Hembras									
Pb	0.850	0.694	0.0005	0.966	0.927	0.0000			
Cu	0.902	0.794	0.00006	0.802	0.607	0.002			
Fe	0.104	0.088	0.748	0.218	0.048	0.497			
Mn	0.747	0.513	0.005	0.772	0.556	0.003			
Zn	0.595	0.289	0.04	0.542	0.223	0.07			
Ni		nd			nd				
Co		nd			nd				
Cr		nd			nd				
Al	0.772	0.556	0.003	0.974	0.943	0.0000			
As	0.851	0.695	0.0004	0.974	0.943	0.0000			
Cd	0.940	0.872	0.0000	0.799	0.601	0.002			

r= coeficiente de correlación, *r*²= coeficiente de determinación, *p*= valor de significancia, nd= no detectable.

Bioacumulación de metales en hueso y daño genético en linfocitos de sangre periférica

En general, los metales bioacumulados en hueso son Cu, Fe, Mn, Zn, Ni y Co, en las especies *P. melanophrys* y *B. musculus* en machos y hembras. De manera particular se observa que la bioacumulación no varía entre especies, siendo la misma cantidad de metales bioacumulados en hueso tanto en hembras como en machos. En ambas especies los metales bioacumulados tienen una n=6.

En las regresiones se pueden observar diferencias significativas es decir aquellas que presentaron un valor de correlación (r) > 0.5 en cuanto a nivel de género en la especie *P. melanophrys*. Por otra parte, para el caso de *B. musculus* tanto en hembras como en machos la bioacumulación de metales que tuvieron un valor significativo en cuanto al daño genético es de n=4. Sin embargo, en la especie *P. melanophrys* la n=5 en el caso de las hembras y n=4 en los machos (Tabla 6).

Tabla 5. Relación entre la bioacumulación de metales pesados en hueso y el daño genético en linfocitos de sangre periférica.

Metal	Especie de roedor								
	<i>P. melanophrys</i>			<i>B. musculus</i>			<i>L. irroratus</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
Machos									
Pb		nd			nd				
Cu	0.964	0.922	0.0000	0.44	0.109	0.1561			
Fe	0.247	0.033	0.439	0.055	0.096	0.8650			
Mn	0.23	0.400	0.465	0.694	0.430	0.01			
Zn	0.588	0.280	0.044	0.886	0.764	0.0001			
Ni	0.932	0.586	0.0000	0.769	0.551	0.003			
Co	0.557	0.267	0.049	0.701	0.440	0.01			
Cr		nd			nd				
Al		nd			nd				
As		nd			nd				
Cd					nd				
Hembras									
Pb		nd			nd				
Cu	0.942	0.875	0.0000	0.834	0.665	0.00007			
Fe	0.814	0.634	0.0004	0.817	0.635	0.001			
Mn	0.678	0.415	0.008	0.457	0.129	0.135			
Zn	0.921	0.835	0.0000	0.948	0.888	0.0000			
Ni	0.738	0.506	0.003	0.715	0.462	0.009			
Co	0.49	0.176	0.07	-0.53	0.208	0.077			
Cr		nd			nd				
Al		nd			nd				
As		nd			nd				
Cd		nd			nd				

r= coeficiente de correlación, *r*²= coeficiente de determinación, *p*= valor de significancia, nd=no detectable.

Bioacumulación de metales en cerebro y daño genético en linfocitos de sangre periférica

Los metales bioacumulados en el cerebro de la especie *L. irroratus* son (Pb, Mn, Zn, Ni y As) en hembras y machos. En particular la bioacumulación solo se evaluó en la especie de *L. irroratus* en donde la n=5 en ambos géneros. Para consultar la bioacumulación de MP en la especie *L. irroratus* en cerebro, favor de ver a Hernández-Plata *et al.* (2020).

Por otra parte, las regresiones que fueron significativas, es decir que cumplieron con un valor de correlación (r) > 0.5 varía de acuerdo al género. Para el caso de los machos los metales que tuvieron un efecto significativo en el daño genético es de n=3; sin embargo para el caso de las hembras los metales que se ven involucrados en el daño genético son más, presentando una n=4 (Tabla 5).

Tabla 6. Relación entre la bioacumulación de metales pesados en cerebro y el daño genético en linfocitos de sangre periférica.

Metal	Especie de roedor								
	<i>P. melanophrys</i>			<i>B. musculus</i>			<i>L. irroratus</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
Machos									
Pb							0.747	0.514	0.005
Cu							nd		
Fe							nd		
Mn							0.647	0.360	0.02
Zn							0.39	0.067	0.209
Ni							0.589	0.282	0.043
Co							nd		
Cr							nd		
Al							nd		
As							0.494	0.168	0.103
Cd							nd		
Hembras									
Pb							0.760	0.535	0.004
Cu							nd		
Fe							nd		
Mn							0.501	0.175	0.10
Zn							0.44	0.115	0.150
Ni							0.587	0.279	0.045
Co							nd		
Cr							nd		
Al							nd		
As							0.781	0.570	0.003
Cd							nd		

r= coeficiente de correlación, *r*²= coeficiente de determinación, *p*= valor de significancia, nd= no detectable.

Bioacumulación de metales en intestino y daño genético en linfocitos de sangre periférica

De manera general los metales que se bioacumularon en el intestino de los roedores pertenecientes a la especie de *L. irroratus* son (Cu, Fe, Zn y Cr) tanto en machos como en hembras n=4.

Tabla 7. Bioacumulación de MP en el intestino de hembras y machos de *L. irroratus*

	Expuesto		Control	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Fe	3.75 ± 0.50	3.24±0.19	1.16±1.01	5.34 ± 2.04
Cr	1.25 ± 0.03	3.23±0.18	1.05±0.22	1.28 ± 0.12
Zn	0.18 ± 0.08	0.71±0.17	0.09±0.09	0.15 ± 0.03
Cu	0.17 ± 0.04	1.14±0.01	0.12±0.0	0.13 ± 0.00

Para consultar la bioacumulación de MP en otros órganos, de la especie *P. melanophrys* y *B. musculus* favor de ver Tovar-Sánchez *et al.* (2012) y Mussali-Galante *et al.* (2013).

Por otra parte, las regresiones que fueron significativas y que presentaron un valor de correlación (r) > 0.5 no se ve afectada de acuerdo al género en la especie *L. irroratus* ya que en ambos casos se presentan una n=3 (Tabla 8).⁴

Tabla 8. Relación entre la bioacumulación de metales pesados en intestino y el daño genético en linfocitos de sangre periférica.

Metal	Especie de roedor								
	<i>P. melanophrys</i>			<i>B. musculus</i>			<i>L. irroratus</i>		
	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>P</i>
Machos									
Pb								nd	
Cu							0.729	0.485	0.007
Fe							0.54	0.215	0.07
Mn								nd	
Zn							0.878	0.748	0.0002
Ni								nd	
Co								nd	
Cr							0.986	0.969	0.0000
Al								nd	
As								nd	
Cd								nd	
Hembras									
Pb								nd	
Cu							0.765	0.544	0.004
Fe							0.864	0.722	0.0004
Mn								nd	
Zn							0.503	0.179	0.095
Ni								nd	
Co								nd	
Cr							0.632	0.339	0.027
Al								nd	
As								nd	
Cd								nd	

r= coeficiente de correlación, r²= coeficiente de determinación, p= valor de significancia, nd=no detectable.

7.4 Niveles de riesgo e impacto de daño genético generados por la bioacumulación de metales en roedores silvestres que habitan en los jales de Huautla

De manera general, los valores de beta obtenidos entre la bioacumulación de metales pesados en diferentes órganos de las especies *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus* y los niveles de daño genético fueron transformados a valores angulares (grados). Lo anterior, con el fin que conocer el nivel de riesgo que genera la bioacumulación de metales en el nivel de daño genético (rompimiento de cadena sencilla en el ADN). Cada valor obtenido de la pendiente (tangencial, grados o normalizados) fue asignado a una categoría de influencia, como se observa en la Figura 4. A continuación, se describe en que categoría de influencia cae cada una de las regresiones analizadas por órgano, género y especie de acuerdo al metal evaluado.

Hígado

Peromyscus melanophrys

De manera particular en los machos de la especie *P. melanophrys* los metales Cu y Zn se encuentran en una categoría de influencia **muy alta** (89.16° y 81.83°, respectivamente). Mientras que el Fe tiene una influencia **intermedia** (58.82°). Esto significa que la bioacumulación de los MP Cu y Zn en hígado tiene una influencia muy alta sobre el daño genético, mientras que Fe tiene una influencia intermedia. Por otra parte, en las hembras la bioacumulación de los MP Fe, Zn y Co en hígado presenta una influencia **muy alta** de la bioacumulación de metales en hígado con respecto a los niveles de daño genético (89.86°, 89.76° y 89.43° respectivamente). Mientras que Mn (53.86°) tiene una influencia **intermedia** (Tabla 9).

Baiomys musculus

En los machos de la especie *B. musculus* particularmente, la influencia de la bioacumulación de los MP en el hígado mostró que el Mn se encuentra en una categoría de influencia **muy alta** (89.62°), Zn en una zona de influencia **alta** (75.12°) y Fe en una zona de influencia **baja** (36.93°). En cambio en las hembras los metales Fe, Zn y Co se encuentran en una zona de influencia **muy alta** (89.34°, 89.83° y 89.61° respectivamente). Mientras que el Mn se encuentra en una zona de influencia **alta** (72.50°) (Tabla 9).

Liomys irroratus

En la especie *L. irroratus* particularmente en los machos, los metales Pb 84.26°, Cu 81.77°, Mn 89.41° y Al 82.55° se encuentran en una zona de influencia ***muy alta***, el Zn se encuentra en una zona de influencia ***intermedia*** (42.68°) y el Fe (8.602°) en una zona de influencia ***muy baja***, casi nula, es decir que la bioacumulación de Fe en hígado impacta muy poco sobre los niveles de daño genético en los machos de la especie *L. irroratus*. Por otra parte, en las hembras los metales Cu(84.03°), Fe (84.74°), Co (82.39°) y As (82.55°) se encuentran en una zona de influencia ***muy alta*** por lo tanto el daño genético se ve altamente influenciado por los niveles de bioacumulación de estos metales. En cambio Mn (14.28°) se encuentra en una zona de influencia ***muy baja*** (Tabla 9).

Tabla 9. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en hígado y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras de *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus*.

Metales	Especie de roedor		
	<i>P. melanophrys</i>	<i>B. musculus</i>	<i>L. irroratus</i>
Machos			
Pb	ND	ND	T 9.9585, 84.26°
Cu	T 68.352, 89.16°	ND	T 6.9197, 81.77°
Fe	T 1.6530, 58.82°	T 0.75170, 36.93°	T 0.15128, 8.602°
Mn	ND	T 153.22, 89.62°	T 97.305, 89.41°
Zn	T 6.9660, 81.83°	T 3.7660, 75.12°	T 0.92216, 42.68°
Co	ND	ND	ND
Cr	ND	ND	ND
Al	ND	ND	T 7.6540, 82.55°
As	ND	ND	ND
Cd	ND	ND	ND
Hembras			
Pb	ND	ND	ND
Cu	ND	ND	T 9.5745, 84.03°
Fe	T 434.61, 89.86°	T 88.008, 89.34°	T 10.864, 84.74°
Mn	T 1.3697, 53.86°	T 3.1716, 72.50°	T 0.25453, 14.28°
Zn	T 281.39, 89.79°	T 344.42, 89.83°	ND
Co	T 102.29, 89.43°	T 148.79, 89.61°	T 7.4861, 82.39°
Cr	ND	ND	ND
Al	ND	ND	ND
As	ND	ND	T 7.6546, 82.55°
Cd	ND	ND	ND

Muy bajo riesgo ■ Bajo riesgo ■ Riesgo intermedio ■ Alto riesgo ■ Muy alto riesgo ■

ND no detectado, NS no significativo, NE no evaluado.

Riñón

Peromyscus melanophrys

En machos de la especie *P. melanophrys* los metales Pb (83.08°), Cu (85.20°), Mn (83.11°), As (89.53°) y Cd (86.24°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta**. Mientras que el Al (67.60°) y Zn (10.39°) se encuentran en una zona de influencia **alta** y **muy baja** respectivamente. En las hembras los metales Pb (82.58°), Cu (85.40°), Mn (85.97°), As (89.53°) y Cd (86.72°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta**. Mientras que los metales Zn (62.73) y Al (876.55°) se encuentran en una zona de influencia **alta** (Tabla 10).

Baiomys musculus

Con respecto a los machos la especie *B. musculus* en machos los metales Mn, Al y As se encuentran en un rango de influencia **muy alta**, presentando los siguientes valores angulares (77.12°, 89.99° y 89.99°) respectivamente. Los metales Pb (76.66°) y Cd (76.61°) se encuentran en una zona de influencia **alta**. Mientras que el Cu (41.29°) y Zn (7.157°) en zonas de influencia **intermedia** y **muy baja** respectivamente. Para el caso de las hembras Pb (81.88°), Cu (86.49°), Al (89.99°) y As (89.99°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta** sobre el nivel de daño genético. Los metales Mn y Cd se encuentran en una zona de influencia **alta** (78.01°) y (77.51°). Mientras que Zn (9.094°) se encuentra en una zona de influencia **muy baja** sobre el nivel de daño genético (Tabla 10).

Tabla 10. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en riñón y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras de *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus*.

Metales	Especie de roedor		
	<i>P. melanophrys</i>	<i>B. musculus</i>	<i>L. irroratus</i>
Machos			
Pb	T 8.2510, 83.08°	T 4.2191, 76.66°	NE
Cu	T 11.910, 85.20°	T 0.87851, 41.29°	NE
Fe	NS	NS	NE
Mn	T 8.2814, 83.11	T 4.3739, 77.12°	NE
Zn	T 0.18351, 10.39°	T 0.12558, 7.157°	NE
Co	ND	ND	NE
Cr	ND	ND	NE
Al	T 2.4263, 67.60°	T 16790, 89.99°	NE
As	T 98.169, 89.41°	T 12204, 89.99°	NE
Cd	T 15.228, 86.24	T 4.5542, 77.61°	NE
Hembras			
Pb	T 7.6865, 82.58°	T 7.0099, 81.88°	NE
Cu	T 12.454, 85.40°	T 16.324, 86.49°	NE
Fe	NS	NS	NE
Mn	T 14.197, 85.97°	T 4.7098, 78.01°	NE
Zn	T 1.9405, 62.73°	T 0.16007, 9.094°	NE
Co	ND	ND	NE
Cr	ND	ND	NE
Al	T 4.1814, 76.55°	T 27163, 89.99°	NE
As	T 123.80, 89.53°	T 19743, 89.99°	NE
Cd	T 17.490, 86.72°	T 4.5171, 77.51°	NE

Muy bajo riesgo ■ Bajo riesgo ■ Riesgo intermedio ■ Alto riesgo ■ Muy alto riesgo ■

ND no detectado, NS no significativo, NE no evaluado.

Hueso

Peromyscus melanophrys

En los machos de la especie *P. melanophrys* los MP Cu (89.46°), Co (79.45°) y Zn (36.10°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta**, **alta** y **baja** respectivamente, de acuerdo al efecto que ejerce su bioacumulación en hueso sobre los niveles de daño genético. Por otra parte, en las hembras, los metales Cu, Fe, Co y Zn se encuentran en zonas de influencia **muy alta** (89.99°), **alta** (71.01°, 78.47°) e **intermedia** (58.21°), respectivamente. En las hembras los metales que se encuentran influyendo en los niveles de daño genético son Cu, Fe, Co y Zn. Sin embargo, se encuentran en zonas de influencia diferentes. Cu (89.89°) **muy alta**, Fe (71.01°) y Co (78.47°) **alta** y el Zn (58.21°) **intermedia** (Tabla 11).

Baiomys musculus

En la especie *B. musculus* particularmente en machos el Mn (44.50°) se encuentra en una zona de influencia **muy alta**, es decir su bioacumulación en hueso para esta especie y este género (machos) influye de manera significativa en los niveles de daño genético. Por otra parte Zn (57.82°) y Co (77.68°) se encuentran en una zona de influencia **intermedia**, su bioacumulación en hueso afecta de manera **intermedia** los niveles de daño genético. Mientras que en las hembras los metales Fe (59.73°) y Zn (51.21°) se encuentran en una zona de influencia **intermedia** (Tabla 11).

Tabla 11. Valores tangenciales (T) y en valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en hueso y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras de *P. melanophrys*, *B. musculus* y *L. irroratus*.

Metales	Especie de roedor		
	<i>P. melanophrys</i>	<i>B. musculus</i>	<i>L. irroratus</i>
Machos			
Pb	ND	ND	NE
Cu	T 106.50, 89.46°	NS	NE
Fe	NS	NS	NE
Mn	NS	T 0.98302, 44.50°	NE
Zn	T 72927, 36.10°	T 1.5898, 57.82°	NE
Co	T 5.3705, 79.45°	T 4.5821, 77.68°	NE
Cr	ND	ND	NE
Al	ND	ND	NE
As	ND	ND	NE
Cd	ND	ND	NE
Hembras			
Pb	ND	ND	NE
Cu	T 531.76, 89.89°	NS	NE
Fe	T 2.9069, 71.01°	T 1.7135, 59.73°	NE
Mn	NS	NS	NE
Zn	T 1.6135, 58.21°	T 1.2444, 51.21°	NE
Co	T 4.905, 78.47°	ND	NE
Cr	ND	ND	NE
Al	ND	ND	NE
As	ND	ND	NE
Cd	ND	ND	NE

Muy bajo riesgo ■ Bajo riesgo ■ Riesgo intermedio ■ Alto riesgo ■ Muy alto riesgo ■

ND no detectado, NS no significativo, NE no evaluado.

Cerebro

Liomys irroratus

En el cerebro de la especie *L. irroratus* y particularmente en machos los MP Pb (88.30°), Mn (88.03°) y Ni (88.85) se encuentran en una zona de influencia **muy alta**. Su bioacumulación en cerebro impacta de manera grave a los niveles de daño genético en esta especie. Mientras que en las hembras, el Pb (88.50°) y As (89.99°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta**, es decir el Pb y el As en hembras afecta de manera grave los niveles de daño genético en la especie *L. irroratus*. Por otra parte el Ni (78.31°) se encuentra en una zona de riesgo de influencia sobre el daño genético **alta**, solo unos pocos grados debajo de Pb y As (Tabla 12).

Tabla 12. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en cerebro y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras de *Liomys irroratus*.

Metales	Género	
	Machos	Hembras
Pb	T 33.779, 88.30°	T 38.233, 88.50°
Cu	ND	ND
Fe	ND	ND
Mn	T 29.158, 88.03°	NS
Zn	ND	NS
Ni	T 50.131, 88.85°	T 4.8351, 78.31°
Co	ND	ND
Cr	ND	ND
Al	ND	ND
As	NS	T 12780., 89.99°
Cd	ND	ND

Muy bajo riesgo ■ Bajo riesgo ■ Riesgo intermedio ■ Alto riesgo ■ Muy alto riesgo ■

ND no detectado, NS no significativo, NE no evaluado.

Intestino

Liomys irroratus

En el intestino de la especie *L. irroratus* y particularmente en machos los metales Cu (89.99°), Zn (89.68°) y Cr (89.10°) se encuentran en una zona de influencia **muy alta** en relación con su bioacumulación en intestino y los niveles de daño genético en esta especie. Al igual que en los machos, en las hembras el Cu (89.58°) y Cr (89.75°) se encuentran en una zona de **muy alta**, es decir que estos dos metales pesados tienen una gran impacto sobre los niveles de daño genético para este género (Tabla 13).

Tabla 13. Valores tangenciales (T) y valores angulares (°) de la relación entre la concentración de metales pesados en intestino y el daño genético en linfocitos de sangre periférica en machos y hembras.

Metales	Género	
	Machos	Hembras
Pb	ND	ND
Cu	T 633.9, 89.99°	T 1361.7, 89.58°
Fe	NS	NS
Mn	ND	ND
Zn	T 183.60, 89.68°	NS
Ni	ND	ND
Co	ND	NS
Cr	T 63.801, 89.10°	T 229.82, 89.75°
Al	ND	ND
As	ND	ND
Cd	ND	ND

Muy bajo riesgo ■ Bajo riesgo ■ Riesgo intermedio ■ Alto riesgo ■ Muy alto riesgo ■

ND no detectado, NS no significativo, NE no evaluado.

VII. DISCUSIÓN

Influencia de la concentración de metales pesados en diferentes órganos sobre los niveles de daño genético

En este estudio, se propuso utilizar un modelo sigmoideal que nos permitió identificar de manera más rápida y visual las categorías de influencia que tiene la bioacumulación de MP en diferentes órganos, sobre los niveles de daño genético en los linfocitos de sangre periférica. Con base a los resultados obtenidos se observó que aquellos órganos en donde hubo una mayor bioacumulación de MP también se presentaron niveles de daño genético más altos. Lo cual ha sido reportado anteriormente por diversos autores en donde han podido observar que los individuos expuestos presentan mayores niveles de bioacumulación y daño genético (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

La bioacumulación de MP en distintos órganos genera altos niveles de daño genético en linfocitos de sangre periférica, lo que puede deberse a múltiples factores, tales como: a) bioacumulación de MP, b) tipo de compuesto químico, c) tiempo de exposición, d) vía de exposición, e) género, f) estado nutricional, g) estado general de salud, etc. A continuación, se discuten los factores más relevantes.

Se sabe que los MP pueden entrar al organismo a través de diversas vías como son: la respiratoria, dérmica e ingesta. Una vez que los metales pesados se encuentran incorporados en los organismos, éstos pueden producir toxicidad al formar complejos con compuestos celulares que contienen Azufre (S), Oxígeno (O) y Nitrógeno (N) (Tasleem *et al.*, 2015). Los compuestos inactivan los sistemas enzimáticos o modifican estructuras proteicas críticas que pueden conducir a la disfunción celular y en el peor de los casos la muerte celular (Tasleem *et al.*, 2015).

Asimismo, en general los MP utilizan los sistemas fisiológicos del organismo, evaden las barreras naturales que protegen al cuerpo, afectando la función celular. Existen dos mecanismos de toxicidad que llevan a cabo los metales pesados para ocasionar daños en el ADN y los cuales pueden ser tanto de forma directa como indirecta (Hartwing, 1995; Arbilla *et al.*, 2004). De manera directa el metal puede unirse a distintas macromoléculas generando cambios conformacionales o bien tienen la capacidad de reemplazar a los metales esenciales de sus sitios activos enzimáticos.

Esto genera un mal funcionamiento de las proteínas alterando la homeostasis celular debido a la gran similitud química de los metales con cationes divalentes esenciales (Hartwig, 1995; Arbillaga *et al.*, 2004; Leonard *et al.*, 2004). Un ejemplo de ello son el Pb, Fe y Zn los cuales a altas concentraciones tienen la capacidad de inhibir enzimas involucradas en la reparación del ADN entre las que se encuentra la nucleasa Ape 1 (Hartwig y Schwerdtle, 2002; McNeil *et al.*, 2004). Asimismo, los metales tienen la capacidad de generar aductos, alquilación de bases y mutaciones (Hartwig, 1995; Arbillaga *et al.*, 2004). De manera indirecta los MP tienen la capacidad de generar daños en el ADN mediante la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que se forman en procesos de oxidación metabólica. Algunos ejemplos de EROs son el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), anión superóxido (O_2^-), radical hidroperoxilo (HO_2) y ion hipoclorito (OCl^-) (Valko *et al.*, 2005). Las células pueden adaptarse a concentraciones fisiológicas de EROs mediante los sistemas antioxidantes, sin embargo; las altas concentraciones de EROs que generalmente se encuentran en los individuos expuestos a MP pueden ocasionar peroxidación lipídica, oxidación de grupos sulfhidrilo de diversas proteínas y principalmente daños en el ADN (Tasleem *et al.*, 2015).

De manera particular cuando un organismo se encuentra expuesto a una alta concentración de MP u otros contaminantes asociados con mutagénesis y citotoxicidad las células llevan a cabo procesos de reparación que verifican la integridad del ADN eliminando las lesiones que puede sufrir durante la exposición a los MP (Jaruga *et al.*, 1996). Cuando existen lesiones oxidativas en las bases nitrogenadas del ADN las células tienen la capacidad de eliminar estas lesiones mediante dos sistemas de reparación: La primera implica la reparación por escisión de base (BER por sus siglas en inglés) que lleva a cabo la eliminación de lesiones individuales mediante la acción de la glucosilasa. Mientras que en la segunda se lleva a cabo la reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés). En un individuo que no se encuentra expuesto a metales pesados el sistema de reparación del ADN repara el daño antes de que las células alcancen la etapa de replicación (DeBont, 2004). Sin embargo, cuando los niveles de EROs son altos, las consecuencias biológicas son perjudiciales debido a que el daño en el ADN es excesivo y los sistemas de reparación no alcanzan a reparar el daño generado por los metales pesados, desencadenando en muchas ocasiones la apoptosis (Masella *et al.*, 2005). Lo anterior puede estar involucrado en los resultados obtenidos en

nuestro estudio en donde pudimos observar que conforme aumenta la concentración de metales bioacumulados en los diversos órganos evaluados de las tres especies de roedores se observa mayor daño genético en los linfocitos de sangre periférica.

Efecto de la especie de roedor sobre la bioacumulación de metales pesados y los niveles de daño genético.

- Bioacumulación de metales pesados entre especie de roedores

En un estudio realizado por Solís-Miranda (2016) reporta que existen metales que se encuentran biodisponibles en los jales de Huautla, tal es el caso de Cu, Pb, Mn, Zn, Cd y Fe. En el presente estudio, a pesar de que todas las especies de roedores que habitan los jales de Huautla se encuentran expuestos a la misma concentración de metales pesados y que éstos a su vez se encuentran biodisponibles para que puedan ser bioacumulados, no todas las especies bioacumulan la misma cantidad de metales pesados en sus tejidos. Lo anterior, es congruente con lo reportado por Tovar-Sánchez *et al.* (2012) en los jales de Huautla, quienes evaluaron la bioacumulación de metales pesados en las especies de roedores *P. melanophrys* y *B. musculus*. Los autores encontraron que la especie *B. musculus* presentó mayor susceptibilidad a la bioacumulación por metales. Lo anterior, sugiere que, en los organismos expuestos crónicamente, la especie de roedor juega un papel vital en la bioacumulación de MP. Las diferencias entre la bioacumulación de MP en cada especie dependen de diversos factores tales como hábitos e historia de vida, los ciclos reproductivos, los lugares en donde realizan sus actividades, la talla corporal, los factores genéticos y los tipos de dieta que a su vez están relacionadas con las variaciones estacionales y la disponibilidad de alimentos (Moriarty, 1990; Laurinolli y Bendell-Young, 2006; Fratini *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, la exposición a metales pesados difiere entre herbívoros (generalistas o especialistas), omnívoros y carnívoros (generalistas o especialistas), debido a las formas específicas en que se mueven los contaminantes a través de las redes alimentarias (Smith *et al.*, 2007). Además, el tipo de alimento es un factor importante que determina la disponibilidad de metales para su asimilación en el organismo. Un ejemplo es el zinc que se encuentra mayormente biodisponible en la carne que en los cereales. Una dieta alta en

proteínas de carnívoros aumenta la absorción de zinc debido a la quelación de los iones metálicos por histidina y cisteína (Sandstead, 1988).

En particular, la alimentación de la especie *P. melanophrys* se basa principalmente de frutas y semillas (Hall, 1981). Mientras que la dieta de la especie *B. musculus* es más amplia, ya que se alimenta de hierbas, pasto, semillas e insectos (Rivas-Alonso, 2006). Por último *L. irroratus* es una especie que se alimenta principalmente de semillas, hojas, tallos y artrópodos (Mason-Romo, 2005). En las tres especies de roedores las plantas juegan un papel importante en el proceso de bioacumulación de metales debido a que se encuentran en contacto directo con el suelo y los metales tienden a acumularse en las capas más superficiales del mismo, permitiendo la absorción de metales en la raíz y el tejido foliar de las plantas quedando disponibles para los organismos que se alimentan de ellas y representando el primer paso para la incorporación de los metales a la red trófica (Teitelbaum, 2012). Por ejemplo, Santoyo-Martínez *et al.* (2020) encontró que la planta *Vaquellia farnesiana* de la familia Fabaceae dominantes en los jales de Huautla bioacumula una gran variedad de MP como Cu, Zn y Pb. Por lo que el frecuente uso alimenticio que hacen los roedores de este tipo de plantas podría ser un factor importante para que se lleve a cabo la transferencia de metales de los productores primarios a los roedores (consumidores primarios). Sin embargo, de manera general se puede observar que, aunque las tres especies de roedores tienen en su dieta el uso de especies vegetales, no todas las especies de roedores se alimentan de la misma especie vegetal, de la misma estructura de la planta (raíz, tallo, hoja, fruto, semilla) y de la misma zona, fenómeno que podría explicar las diferencias interespecíficas que se dan en la acumulación de metales. Lo anterior, es apoyado por los estudios de Lin y Arts (2012), Alagic *et al.* (2013) y Tomic *et al.* (2015) quienes han descrito que las plantas bioacumulan diferentes concentraciones de metales en raíz, tallo, hojas y fruto.

Por otra parte, la talla corporal de los roedores juega uno de los papeles más importantes en la diferencia de bioacumulación de metales pesados entre las especies de roedores utilizadas. Por ejemplo, *L. irroratus* presenta una longitud promedio de 226 a 238 mm y un peso de alrededor de 40 a 60 g (Dowler y Genoways, 1978). En cambio, *B. musculus* presenta una longitud de 100 a 135 mm y un peso corporal de 6 a 10 g (Merriam, 1982). Mientras que *P. melanophrys* tiene longitud promedio de 270 mm y un peso corporal de 40 g (Espinoza-Medinilla *et al.*, 2005). La talla es un factor importante en la bioacumulación de MP y se

encuentra ampliamente relacionada con la alimentación. Por ejemplo, algunos autores como Shine (1989) y Anderson (1994) encontraron que la talla corporal está involucrada con el tipo de alimentación que consumen algunos mamíferos como la marta (*Martes martes*), perteneciente a la familia Mustelidae. En poblaciones con amplio ámbito alimenticio, la especie más grande ingiere una amplia diversidad de alimentos en comparación con la especie más pequeña, porque las especies más grandes están adaptadas a manipular presas más grandes. Algo similar podría estar pasando con nuestras diferentes especies de roedores debido a que cada una de ellas presenta una dieta muy variada.

Asimismo, el ciclo reproductivo de cada una de las especies puede estar implicado en las diferencias de bioacumulación que se encontraron, pues cabe destacar que cada una de las especies tiene diferentes ciclos de reproducción. En *B. musculus* su ciclo reproductivo se presenta principalmente en Diciembre a Marzo (Ceballos y Miranda, 2000). Mientras que, en *L. irroratus* su ciclo reproductivo ocurre de Agosto a Noviembre (Linzey *et al.*, 2008). En cambio *P. melanophrys* tiene dos ciclos reproductivos al año, el primero de Febrero a Marzo y el segundo de Junio a Octubre (Ceballos y Oliva, 2005). Durante el ciclo reproductivo, los roedores, particularmente las hembras consumen mayor cantidad de alimentos debido a la demanda energética que sufren durante el periodo de la gestación (Vahter *et al.*, 2007; Suely-Carvalho, 2011). Lo cual está ampliamente relacionado con los resultados del presente estudio, pues particularmente la especie *P. melanophrys* fue una de las dos especies que presentaron mayor bioacumulación de metales pesados en cada uno de los órganos evaluados, quizá debido a sus dos periodos de gestación a lo largo del año.

- Susceptibilidad de la especie de roedor en los niveles de daño genético

En general la exposición a metales afecta la salud de los individuos expuestos, entre estas afectaciones se encuentra el daño genético, ampliamente caracterizado (Bickhman, 2011). Existen factores que juegan un papel importante en las alteraciones genéticas, tales como, la especie de los organismos. Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que los metales impactan de manera diferente al ADN en las tres especies de roedores, puesto que se observó el siguiente patrón de daño genético: *P. melanophrys* > *B. musculus* > *L. irroratus*. Las diferencias en los niveles de daño genético podrían deberse a la concentración y tipo de metal bioacumulado por cada especie de roedor. En general, en el

presente estudio se observó que los individuos más susceptibles (mayores niveles de daño genético) son los que bioacumularon mayores concentraciones de metales. Lo cual coincide con la revisión de Mussali-Galante *et al.* (2013), quienes describen que los niveles de daño genético están correlacionados positiva y significativamente con los niveles de bioacumulación de MP.

Otros factores que podrían estar involucrados en la toxicidad de los metales a nivel genético, son: a) la susceptibilidad genética de cada especie, b) la ruta de exposición, c) la especie química del metal, d) el estado nutricional del individuo, e) la eficiencia de los mecanismos de detoxificación y de reparación genética (Tchounwou *et al.*, 2012). Estudios anteriores reportan que la especie *P. melanophrys* es considerada como una especie centinela, debido a su capacidad de bioacumular contaminantes y por el daño genético que estos ocasionan en ella (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Por otra parte, Tovar-Sánchez *et al.* (2012), también evaluó el daño genético en *P. melanophrys* y *B. musculus*. Dichos autores encontraron que *B. musculus* bioacumuló y presentó los mayores niveles de daño genético en comparación con *P. melanophrys*. Por lo que, el presente estudio apoya a *P. melanophrys* y *B. musculus* como especies centinelas. Por otra parte, *L. irroratus* es una especie escasamente utilizada en estudios de biomonitorio, por lo que quizá no había sido considerada como especie centinela. En el presente estudio, los machos de *L. irroratus* registraron niveles de daño genético superiores a los documentados para *B. musculus* y similares a los de *P. melanophrys*. Por lo que, *L. irroratus* también podría ser considerada como especie centinela en los estudios de biomonitorio.

Efecto del género en roedores sobre la bioacumulación de metales pesados y los niveles de daño genético.

- Bioacumulación de metales pesados

En general, las hembras de las tres especies de roedores analizadas registraron la mayor bioacumulación de metales pesados con respecto a los machos. Las variaciones en cuanto a la bioacumulación de metales pesados entre hembras y machos pueden deberse a diversos factores entre los que se encuentran el ciclo reproductivo sistema hormonal y las diferentes

enzimas que pueden influir en la susceptibilidad fisiológica a los MP (Levengood y Heske, 2008). Las diferencias en la bioacumulación de metales entre hembras y machos pueden verse reflejadas en el ciclo reproductivo, debido a que durante el embarazo y la lactancia las hembras tienen mayores requerimientos energéticos y por lo tanto una mayor tasa de consumo de alimento, lo que puede dar lugar a una mayor transferencia de metales hacia las hembras. Durante el embarazo y la reproducción, la demanda de algunos elementos esenciales, como Ca, Cu, Fe, Mg y Zn aumenta, provocando una mayor absorción de otros metales (Vahter *et al.*, 2007). Además, las hembras pueden presentar diferentes preferencias alimentarias en comparación con los machos (Kidawa y Kowalczyk, 2011). Por ejemplo, durante los ciclos reproductivos las hembras prefieren utilizar territorios de alimentación más pequeños y comer presas que se encuentren más accesibles debido a los cambios energéticos y de comportamiento que sufren durante la gestación (Travani *et al.*, 1993; Kidawa y Kowalczyk, 2011). Aunado a lo anterior, las hembras generalmente contienen una mayor proporción de grasa corporal, lo que genera mayores probabilidades de almacenar MP y otros contaminantes en sus tejidos (Levengood y Heske, 2008; Vahter *et al.*, 2007).

Otros trabajos han obtenido resultados similares a los del presente estudio. Kidawa y Kowalczyk (2011) evaluaron la influencia del género sobre la bioacumulación de MP en las hembras y machos de zorros rojos, ellos encontraron que las hembras bioacumulan mayor concentración de metales en hígado y riñones que los machos.

- Influencia del género sobre los niveles de daño genético

En general, los niveles de daño genético varían de acuerdo al género de los organismos. En el presente estudio se pudo observar que las hembras presentan mayor daño genético que los machos de cada una de las especies evaluadas (*P. melanophrys*, *B. musculus*, *L. irroratus*). Es importante mencionar que las hembras también presentaron una mayor bioacumulación de metales y que la relación entre la bioacumulación y los niveles de daño genético son mayores.

Existen diversos factores que pueden estar involucrados en que las hembras presenten mayor daño genético, como pueden ser los cambios hormonales que presentan a lo largo de su vida (Mugford y Kedderis, 1998) y a diferencias de género en los mecanismos de

biotransformación de los xenobióticos. Por otra parte, con respecto a las diferencias en los mecanismos de biotransformación Holck *et al.* (1937) mostró que las ratas hembras presentaban mayor sensibilidad a los barbitúricos en comparación con los machos, debido a una menor tasa de metabolismo y excreción de xenobióticos. Las diferencias en el metabolismo de los roedores pueden deberse a la evolución de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos que se encuentran en los mamíferos como la familia de citocromos P₄₅₀ (Mugford y Kedderis, 1998). La isoforma CYP del citocromo P₄₅₀ cataliza la oxidación y la reducción de una amplia variedad de compuestos endógenos como las hormonas esteroides, los ácidos grasos y las prostaglandinas, así como xenobióticos entre los que se encuentran los metales pesados (Mugford y Kedderis, 1998). En general, las reacciones mediadas por CYP facilitan la excreción de xenobióticos. Sin embargo, los metabolitos reactivos también se pueden formar a través del metabolismo dependiente de CYP. Por ejemplo, las ratas hembras tienen entre 10 a 30% menos CYP total en comparación con los machos, lo que genera que las hembras metabolicen los metales más lento en comparación con los machos (López *et al.*, 2002), ocasionando mayores concentraciones de metales en la sangre y provocando quizá mayor daño genético en las hembras debido a la lenta excreción de dichos metales. Así también las diferencias dadas entre las hembras y los machos pueden conducir a un procesamiento más lento en el metabolismo de los metales ocasionando que existan mayores concentraciones en la sangre y mayor toxicidad. Lo cual podría explicar que las hembras pertenecientes a las tres especies de roedores presentaron mayor bioacumulación y daño genético en linfocitos de sangre periférica. De manera general las diferencias en la bioacumulación de metales relacionadas con el género pueden estar asociadas con las diferencias en el perfil metabólico de los metales involucrados en la actividad de las hormonas sexuales, la ingesta y absorción de metales, los requerimientos nutricionales y las interacciones entre los elementos (Sánchez-Chardi *et al.*, 2009).

Especificidad de los órganos de roedores en la bioacumulación de metales pesados

Los MP son elementos que pueden bioacumularse en diversos órganos como el hígado, riñones, hueso, cerebro e intestino. En el presente estudio se encontró que el tipo de metal y la concentración varía entre los órganos analizados por lo que la anatomía y fisiología de los

órganos juegan un papel importante en la bioacumulación de los metales. La bioacumulación de los MP en órganos mostró el siguiente patrón: riñón > hígado > hueso > cerebro > intestino. Estas diferencias podrían deberse a las propiedades fisiológicas de cada órgano.

El **riñón** es un órgano que lleva a cabo la eliminación de desechos del cuerpo, sin embargo, cuando la capacidad del riñón para eliminar contaminantes se ve afectada puede acumular altos niveles de metales, ya que tiene la capacidad de reabsorber y bioacumular metales divalentes como Cd, Fe, Pb y Zn (Owalabi y Awodele, 2019). Por lo anterior, el riñón es el primer órgano blanco de toxicidad por MP (Barbier *et al.*, 2005). En el presente estudio, el riñón fue el órgano con mayor concentración de metales.

Los MP y metaloides bioacumulados en el riñón en ambos géneros en las tres especies de roedores fueron: Pb, Cu, Mn, Zn, Al, Cd y As. Estos resultados concuerdan con los ya reportados por autores como Mussali-Galante *et al.* (2013), quienes reportan la bioacumulación de metales en riñones de la especie *P. melanophrys*, que habita en los jales de Huautla. Así también existen estudios en otras especies como peces, donde reportan la bioacumulación de MP en riñón (Owolabi y Awodele, 2019). La capacidad de los riñones para bioacumular MP ha sido estudiada por algunos autores. Por ejemplo, Barbier *et al.* (2005) encontraron que el transportador de cationes divalentes DMT1 (por sus siglas en inglés) identificado inicialmente en el tracto gastrointestinal, está involucrado en el transporte de oligoelementos y es altamente expresado en el tejido renal (Ferguson *et al.*, 1987). Además, el DMT1 está involucrado en el transporte de cationes divalentes como Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , por lo que, los riñones de los organismos expuestos se encuentran susceptibles a la entrada del metal en las células renales y a la disminución de elementos esenciales debido a la competencia con los MP (Barbier *et al.*, 2005). Además, se ha encontrado que en el túbulo proximal renal el Zn^{2+} puede ser transportado al unirse a cisteína o histidina a través de un cotransportador de sodio-aminoácido (Gachot *et al.*, 1991). Quizá los MP podrían unirse a estos aminoácidos y competir con Zn^{2+} . Por otra parte, las metalotioneinas son proteínas ricas en cisteína, asimismo el glutatión es un tripéptido que contiene una cisteína. Estos péptidos son sintetizados en el hígado y riñón y una de sus funciones principales es atrapar a los MP dentro de las células mediante la formación de conjugados, permitiendo de esta manera que se lleve a cabo la bioacumulación de metales en el tejido renal. Algunos estudios realizados en ratas por Felley y Diezi (1987) y Barbier *et al.* (2004) demuestran que

gran parte de los MP que son transportados también son absorbidos en los riñones, principalmente en las nefronas y túbulo proximal. En otras especies, por ejemplo, en el conejo el Cd^{2+} suministrado no se elimina a través de la orina y es bioacumulado en los riñones (Gachot *et al.*, 1991).

El **hígado** es un órgano que juega un papel central y específico en el metabolismo y desintoxicación de metales, así como también en su bioacumulación (Aloupi *et al.*, 2017). Los metales en el hígado se unen a proteínas de bajo peso molecular (< 10 kDa) denominadas metalotioneinas. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo y contienen en su estructura una gran cantidad del aminoácido cisteína, que les confiere una alta afinidad para reaccionar y almacenar metales como Zn, Cd, Hg, Cu, Pb, Ni, Co y Fe (Aloupi *et al.*, 2017). La función principal de las proteínas es almacenar en el medio intracelular metales esenciales como el Zn y Cu, y transferirlos a metaloproteínas, factores de transcripción y enzimas; sin embargo, el aumento intracelular de MP genera toxicidad en los organismos expuestos (Liu *et al.*, 2001). Debido a lo anterior, el hígado es un órgano que se considera como un órgano blanco en la bioacumulación de metales. Como se mencionó previamente en el presente estudio el hígado fue el segundo órgano con mayor acumulación de metales. Los MP y metaloides bioacumulados en hígado en las tres especies de roedores fueron: Pb, Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Co y As. Cabe mencionar que ya se ha reportado la bioacumulación de algunos de estos metales (Al, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn) en hígado del roedor *L. irroratus* que habita en los jales de Huautla (De la Cruz-Guarneros, 2018).

El **hueso** o también denominado tejido óseo es un tejido vivo y mineralizado que de manera natural contiene metales esenciales como Calcio (Ca), Fósforo (P), Magnesio (Mg) y Azufre (S) y oligoelementos como Hierro (Fe), Zinc (Zn) y Manganeseo (Mn) que contribuyen a la solidez del hueso (Martiniaková *et al.*, 2010). Durante su desarrollo el hueso incorpora metales como Ca y P en mayor proporción y Flúor (F), Mg, Fe y Mn en cantidades traza para cumplir con los requerimientos que le permitan crecer y llevar a cabo la remodelación ósea (reemplazo permanente de tejido nuevo por viejo) (Tortora y Derrickson, 2006). Sin embargo, cuando un organismo se encuentra expuesto a concentraciones superiores a las requeridas de MP éstos pueden bioacumularse en el hueso y ocasionar diversas

enfermedades, malformaciones e incluso daño genético (Martiniaková *et al.*, 2015). Por ejemplo, la bioacumulación de Pb afecta a los centros de crecimiento metabólicamente activos de huesos largos en animales jóvenes, lo que influye en el crecimiento óseo (Osweiler *et al.*, 1985). Asimismo, se ha demostrado que la exposición crónica a Cd disminuye el peso corporal en ratones (Toman *et al.*, 2002).

Por otra parte, existe amplia evidencia de que el hueso es un tejido que tiende a bioacumular una amplia gama de MP. Martiniakova *et al.* (2010) encontraron bioacumulación de los MP Pb, Cu, Fe y Zn en hueso de las especies de roedores *Myodes glareolus* y *Microtus arvalis*. Asimismo, los mismos autores, pero en el año (2015) reportan que evaluaron la bioacumulación de los MP Fe, Cu, Zn y Ni en hueso de las especies *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis* y *Apodemus sylvaticus*. En el presente estudio las especies *P. melanophrys* y *B. musculus* bioacumularon diferentes metales en hueso tales como Cu, Zn, Co, Mn y Fe. La alta afinidad que tienen los MP de bioacumularse en el tejido óseo puede deberse a que durante el desarrollo éste tiene la capacidad de incorporar MP a los que se encuentra expuesto el organismo mediante el reemplazo de iones esenciales. Los metales esenciales y no esenciales pueden interactuar entre sí, afectando la absorción, bioacumulación y toxicidad de ambos tipos de metales (Martiniakova *et al.*, 2010). Las interacciones entre los metales esenciales y no esenciales pueden resultar en efectos de antagonismo, sinergia y potenciación. Estos efectos dependen del tipo de metal, especies químicas del metal, su concentración externa, vía de exposición, tiempo de exposición, especie de organismo y órganos blanco (Caserta *et al.*, 2013).

El **cerebro** es un órgano que ha sido reportado como altamente vulnerable a la bioacumulación por metales pesados, entre los que se encuentra principalmente Hg y Pb (Kalisinska *et al.*, 2016). Ambos metales pesados tienen la capacidad de atravesar las barreras hematoencefálica y placentaria y a su vez durante el embarazo de diversos organismos pueden actuar como teratógenos (Caserta *et al.*, 2013). En el presente estudio pudimos observar que el cerebro bioacumula MP tales como, Pb, Mn, Ni y el metaloide As en la especie *L. irroratus*. La bioacumulación de Pb podría deberse a que las células endoteliales de la barrera hematoencefálica son las primeras en estar expuestas a dicho metal. Además los MP sustituyen o mimetizan a los metales esenciales en sus transportadores o en moléculas

(Bridges y Zalups, 2005). El transportador DMT1 puede permitir el acceso celular a Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , entre otros. El DMT1 es altamente expresado en varias regiones cerebrales (Peres *et al.*, 2016). En animales que se encuentran en desarrollo, el Pb puede producir disminución en la formación de mielina (Villeda-Hernández *et al.*, 2001). El Pb ejerce sus efectos celulares debido a la alta afinidad por los grupos sulfhidrilos de diversas proteínas, generando una competencia con el Ca^{2+} (Toscano y Guillarte, 2005; Nava-Ruíz *et al.*, 2010). El cerebro es un órgano escasamente considerado en los estudios de bioacumulación de metales. Recientemente Kalisinska *et al.* (2016) evaluaron la bioacumulación de Hg, Pb y Cd en diferentes especies de mesocarnívoros.

El **intestino** es un órgano que lleva a cabo parte de la digestión de los alimentos hasta su conversión en componentes elementales aptos para la absorción. Una vez que los alimentos se han escindido en sus componentes elementales serán absorbidos gracias a la acción de enzimas como la amilasa, lipasa y tripsina (Rajkowska y Protasowicki, 2012).

Por otra parte, se ha encontrado que el intestino es un órgano que tiene la capacidad de bioacumular MP. Ebenezer *et al.* (2015) evaluaron la bioacumulación de MP en órganos de diferentes especies de peces (*Clarias macromystax*, *Channa obscura*, *Labeo senegalensis* y *Oreochromis niloticus*) y encontraron que el intestino fue uno de los órganos que bioacumuló Cd, Hg y Pb.

La bioacumulación de MP en las diferentes especies de peces se encontró ampliamente relacionada con la dieta y el comportamiento de alimentación de los peces (Farkas *et al.*, 2001; Obasohan *et al.*, 2008). El bajo nivel de metales traza detectados en el intestino puede sugerir que la fuente de alimento juega un papel menos importante en la absorción de metales traza para los peces (Ebenezer *et al.*, 2015). Asimismo, existe otro estudio realizado por Raikowska y Protasowicki (2012) quienes evaluaron la bioacumulación de diversos metales en el intestino de dos especies de peces *Esox lucius* y *Abramis brama* en dos lagos ubicados en el noreste de Polonia, reportando que ambas especies tuvieron la capacidad de bioacumular en su intestino metales como Fe, Mn, Zn y Cu, lo que es atribuido a la ingesta de alimentos que tienen estos peces y a la contaminación debido a las descargas residuales que se dan en los lagos.

Los resultados antes mencionados apoyan los obtenidos en este estudio, ya que se registraron elevadas concentraciones de Cu, Zn y Pb. Los estudios sobre bioacumulación de MP en intestino hacen referencia principalmente a diversas especies de peces, y son escasos los estudios de bioacumulación de MP en el intestino de roedores. Por lo anterior, se recomienda realizar estudios que evalúen el papel que juega el intestino en cuanto a la bioacumulación de MP en roedores ya que éste es uno de los primeros órganos que está en contacto con los MP a través de la ingesta. Asimismo, se recomienda evaluar los sistemas de proteínas y/o transportadores que permiten la bioacumulación de metales en dicho órgano, debido a que existe poca información al respecto.

Influencia que existe entre la bioacumulación de metales pesados y los niveles de daño genético

En este estudio se evaluó el efecto que tienen los metales pesados bioacumulados en los distintos órganos con respecto al daño genético el nivel de influencia de esta relación. Con respecto a la bioacumulación de metales en el hígado de la especie *P. melanophrys* se pudo observar que los metales Cu y Zn se encuentran en una zona de influencia muy alta en consecuencia el nivel de influencia que generan estos dos metales al daño genético es muy alto, mientras que el Fe se encuentra en una zona de influencia media, estos resultados para el caso de los machos pertenecientes a esta especie, en las hembras los metales Fe, Zn y Co se encontraron en un nivel de riesgo muy alto y por otra parte el Mn en una zona de influencia media. En el caso de la bioacumulación de metales en hígado y sobre los niveles de daño genético, se pudo observar que los metales bioacumulados en las hembras tuvieron un impacto mayor con respecto a los niveles de daño genético, pues la mayoría se encontró en una zona de influencia muy alta. Continuando con la bioacumulación de metales y los niveles de daño genético en la sangre la especie *B. musculus* el metal que tuvo un nivel de riesgo más alto fue el Mn pues se encontró en una zona de influencia muy alta, seguido del Zn y Fe quienes se encontraron en una zona de influencia alta y muy baja respectivamente, resultados obtenido en los machos. En las hembras los metales y los niveles de riesgo se clasificaron de la siguiente manera Fe, Zn y Co, se encontraron en un nivel de riesgo muy alto mientras que el Mn se encuentra en una zona de influencia alta. Por otra parte, en la especie *L. irroratus* los metales Pb, Cu, Mn y Al se clasificaron en una zona de influencia muy alta por lo que el

nivel de riesgo que tienen estos con respecto al daño genético es de gran impacto, además los metales Zn y Fe se encuentran en una zona de influencia intermedia y muy baja respectivamente, por lo cual el nivel de riesgo que presenta el Fe con respecto al daño genético es casi nula, la bioacumulación de Fe en el hígado de *L. irroratus* no juega un papel importante con respecto al daño genético encontrado en los machos de esta especie, en las hembras los metales Co, Fe, Cu y As presentan niveles de riesgos muy altos, el daño genético se ve altamente influenciado por la bioacumulación de estos metales en el hígado, mientras que el Mn se encontró en una zona de riesgo muy baja. Por otra parte, también se midieron los niveles de riesgo genético que presentan los metales al bioacumularse en los riñones, en la especie *P. melanophrys* los metales Pb, Cu, Mn, As, Cd y Al presentan niveles de riesgo muy altos pues fueron clasificados en una zona de influencia muy alta a excepción del Al que se clasificó en una zona de influencia alta, por otra parte, el Zn presentan niveles de riesgo genético bajos pues se clasificó en una zona de influencia muy baja, en el caso de los machos y con respecto a las hembras los metales Pb, Cu, Mn, As, y Cd se encontraron en una zona de influencia muy alta, mientras que el Zn y Al en una zona de influencia alta, para el caso de las hembras a pesar de que los metales fueron clasificados en dos niveles de influencia, la bioacumulación de estos metales juegan papeles muy importantes en el daño genético encontrado para esta especie pues las dos zonas de influencia en las que fueron clasificados corresponden a alta y muy alta. Por otra parte, en los machos de la especie *B. musculus* los metales Mn, Al y As se encontraron en una zona de influencia muy alta, y por parte Pb y Cd en una zona de influencia alta, mientras que Cu y Zn en una zona de influencia intermedia y muy baja respectivamente, los metales que se encuentran en un nivel de riesgo importante para los niveles de daño genético, son aquellos que se clasificaron en las zonas de influencia muy alta, alta e incluso intermedia. En las hembras los metales Pb, Cu, Al y As se clasificaron en una zona de influencia muy alta, por lo que la influencia y nivel de riesgo que tienen estos metales sobre los niveles de daño genético es muy significativa, los metales Mn y Cd se encuentran en una zona de influencia alta mientras que el Zn en una zona de influencia muy baja. Los niveles de riesgo genético también fueron medidos en base a la bioacumulación de metales en hueso, en el caso de los machos de la especie *P. melanophrys* se encontró que los metales Cu, Co y Zn se clasificaron de la siguiente manera con respecto a los niveles de influencia, muy alta, alta y muy baja respectivamente, por lo que los metales

que juegan un papel importante en cuanto al riesgo ocasionado a nivel genético son Cu y Co. Para el caso de las hembras pertenecientes a esta misma especie los metales Cu, Fe, Co y Zn, por su parte el Cu y Fe se encontraron en zonas de influencia muy alta, el Fe y Co en una zona de influencia alta y el Zn en una zona de influencia intermedia, todos los metales bioacumulados en el hueso de las hembras de *P. melanophrys* presentan riesgos importantes para los niveles de daño genético. Por otra parte, en el cerebro de la especie *L. irroratus* se midió los niveles de riesgo genético que presentaban los metales con respecto a su bioacumulación en dicho órgano. En los machos los metales Pb, Mn y Ni se encuentran en una zona de influencia muy alta. En el caso de las hembras el Pb y As se encuentran en una zona de influencia muy alta. A pesar de que la bioacumulación de los metales varía ligeramente en las hembras y lo machos pues no acumulan exactamente los mismos metales, estos se encuentran en una zona de riesgo importante para los niveles de daño genético, afectando de manera grave el impacto al ADN en ambos géneros. De igual manera en la especie *L. irroratus* se midió la bioacumulación de metales en intestino y los niveles de riesgo genético ocasionados, en cuanto a los machos los metales Cu, Zn y Cr se encontraron en una zona de influencia muy alta con respecto a los niveles de daño genético, mientras que en las hembras el Cu y Cr también fueron encontrados en una zona de influencia muy alta. Tanto en los machos como en las hembras los metales bioacumulados en el intestino se encuentran generando niveles de riesgo genético altamente dañinos para esta especie de roedor.

Utilidad del modelo sigmoidal en la toma de decisiones de estudios ecotoxicológicos

En este estudio, el modelo sigmoidal nos permitió conocer las categorías de impacto entre los dos biomarcadores evaluados, la bioacumulación de metales en diversos órganos de especies de roedores (*P. melanophrys*, *L. irroratus* y *B. musculus*) y los niveles de daño genético. Cabe mencionar que el modelo sigmoidal propuesto en este proyecto es útil en estudios ecotoxicológicos, debido a podría jugar un papel importante en la toma de decisiones para la elección de variables como tipo de especie, género, órgano y/o metal evaluado. Por ejemplo, en ambientes contaminados por Pb, Al, y As la mejor especie de estudio es *L. irroratus*, ya que presentó los mayores valores de influencia en el modelo sigmoidal. En particular, los machos son en mejor modelo para el monitoreo de Al y Pb. Mientras que las hembras lo son para el As. Por otro lado, en estudios de contaminación por Cu la mejor

especie de estudio es *P. melanophrys* (machos), seguida de *L. irroratus* (machos y hembras). Mientras que, para conocer los efectos de la contaminación por Fe, las hembras de las tres especies de roedores podrían ser un modelo de estudio. En cambio, en estudios de contaminación de Mn, los machos de *B. musculus* y *L. irroratus* son el mejor modelo de estudio. Por su parte, estudios de Zn muestran que las hembras de *P. melanophrys* y *B. musculus* son el mejor sistema. Por último, en sitios contaminados por Co las hembras de las tres especies de roedores son un modelo. Los resultados de la presente tesis, apoyan a las especies *P. melanophrys* y *B. musculus* como especies centinelas y sugiere que *L. irroratus* puede ser considerada especie centinela.

Finalmente, en este estudio se evaluaron otros órganos (riñón, cerebro, hueso e intestino) pero no hay datos suficientes para comparar entre especies. Por lo que, la perspectiva de este estudio es aumentar el tamaño de muestra y hacer análisis comparativos en las tres especies de roedores.

Asimismo, este proyecto ayuda a tomar mejores decisiones para saber específicamente que metal evaluar, en que órgano y especie de roedor para conocer los niveles de daño genético ocasionado por la bioacumulación de metales pesados que se pueden presentar en un organismo expuesto. Por otro lado, si bien, en este estudio se evaluaron otros órganos (riñón, cerebro, hueso e intestino) no hay suficientes datos para comparar a las tres especies. Por lo que, la perspectiva de este estudio es incrementar el tamaño de muestreo y hacer comparativo los análisis para las tres especies.

IX. CONCLUSIONES

- El modelo sigmoidal es una herramienta útil y fácil de interpretar para conocer el mejor biomarcador de exposición-efecto en estudios de monitoreo ambiental por MP.
- *L. irroratus* puede ser considerada como una especie centinela para el monitoreo de ambientes contaminados por MP, debido a que registró altos niveles de influencia entre la bioacumulación de metales y los niveles de daño genético.
- En exposiciones crónicas a MP, el efecto de la bioacumulación de metales sobre los niveles de daño genético (biomarcador de exposición-efecto) dependerá del genero y especie de roedor.

X. PERSPECTIVAS

- Completar el análisis de datos con el modelo sigmoidal para otros órganos (además del hígado) en las demás especies de roedores que habitan en los jales mineros de la región de Huautla, Morelos, con lo cual, podremos reconocer el mejor biomarcador de exposición-efecto para ambientes contaminados por cada metal pesado analizado.
- Incrementar el número de muestreos para que la proporción de hembras y machos de roedores se complete y sea similar, para realizar el análisis de datos con el modelo sigmoidal y así conocer mejor, cuál sería el género más adecuado a utilizar en estudios ecotoxicológicos.
- Realizar el análisis de daño genético en el intestino y en el cerebro de los roedores hembras y machos utilizados, para conocer su relación con la bioacumulación de metales pesados.
- Continuar con la búsqueda de especies de roedores centinelas para su uso en estudios de biomonitoreo ambiental en sitios contaminados por metales pesados.

XI. REFERENCIAS

- **Ali, H., Khan, E., Sajad, M.** (2013). Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *ELSEVIER*. 91: 869–881.
- **Arbillaga, L., Ezpeleta O., & López A.** (2004). ¿Es la ocratoxina A una micotoxina mutagénica?. *Revista de Toxicología*, 21, 1-10.
- **Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., Mittal, N.** (2008). Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chem.* 111: 811–815.
- **Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., & Poujeol, P.** (2005). Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiology*. 99, 105–110
- **Basta, N., Ryan, J., Chaney, R.** (2005). Trace element chemistry in residual-treated soil. *Journa lof environmentalquality*. 34(1), 49-63.
- **Basu, N., Scheuhammer, A., Bursian, S., Elliott, J., Rouvinen-Watt, K., Chan, H.** (2007). Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research*. 103(1), 130-144.
- **Beeby, A. What do sentinels stand for?.** (2001) *Environmental Pollution*. 112(2), 285-298.
- **Bradmann A, Eskenazi B, Sutton P.** Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect* 2001;109:1079-84.
- **Burlinson B, Tice R, Speit G, Agurell E, Brendler SY, Collins AR.** (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat. Res.* 2007; 627: 31–5.
- **Cañizares-Villanueva, R. O.** (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Latinoamericana de Microbiología*. 42:131-143.
- **Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M.** Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013; 17: 2198–2206
- **Collins, A.** (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol*. 6: 249-59.

- **Dauwe, T., Janssens, E., Kempenaers, B., Eens, M.** (2004). The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs. *Environmental Pollution*. 129(1), 125-129.
- **DeBont R., Larebeke N.** (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis*. 19:169.
- **De la Cruz –Guarneros, N.** (2018). Efecto de la bioacumulación de metales en la población de *Liomysirroratus* (Gray 1868) que habita los jales de Huautla, Morelos: Un enfoque multibiomarcadores. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 27 pp.
- **Diez, L., Kidd, P., Monterroso, C.** (2002). Biodisponibilidad de metales en suelo y acumulación en plantas en el área de Tras-Os-Montes (Portugal): influencia del material original. *Edafología* 9:313-328.
- **Dold, B., Fontboté, L.** (2002). A mineralogical and geochemical study of element mobility in sulfide mine tailings of Fe oxide Cu–Au deposits from the Punta del Cobre belt, northern Chile. *Chemical Geology*. 189(3-4), 135-163.
- **Dowler, R., y H. Genoways.** (1978). Mammalian Species: *Liomysirroratus*. *The American Society of Mammalogists*, 82:1-6.
- **Ehrenberg, L., Granath, F., Törnqvist, M.** (1996). Macromolecule adducts as biomarkers of exposure to environmental mutagens in human populations. *Environ. Health Perspect.* 104, 423-428.
- **Esteves-Aguilar J.** (2018). Evaluación del dañogenético y la inestabilidad en el Desarrollo del cráneo en la especie Centinela *Peromyscus melanophrys* que habita en zonas mineras. 28 pp.
- **Farkas A., Salánki J., Specziár A., Varanka I.** (2001). Metal pollution as health indicator of Lake ecosystems. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*. 14(2):163–170.
- **Ferguson, J. E.** (1990). The heavy elements: chemistry. *Environmental impact and health effects*. 628.53.
- **Ferguson, C.J., Wareing, M., Ward, D.T., Green, R., Smith C.P., Riccardi, D.** (2001). Cellular localization of the divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am J Physiol renal*. 280:30.

- **Fox, G. A.** (2001). Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin. *Environ Health Perspect.* 109: 853-861.
- **Gachot, B., Tauc, M., Morat, L., Poujeol, P.** (1991). Zinc uptake by isolated proximal cells of the rabbit kidney: effects of cysteine and histidine. *Pflügers Arch.* 419: 583–587.
- **Garrick, MD., Dolan, KG., Horbinsky, C., Ghio, AJ., Higgins, D., Porubcin M.** (2003). DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *Biometals.* 16:41-54.
- **Guerrero, DL.** (2004). Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental. En *Toxicología Ambiental*. Lilia LA (Ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Pp 45-60.
- **Gutiérrez, A., Villaescusa, A., Arreola, A.** (1999). Bioacumulación de metales en mejillones de cuatro sitios selectos de la región costera de Baja California. *Ciencias Marinas.* 25(4).
- **Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler SY, Burlinson B, Clay P.** (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2003; 18(1): 4-51.
- **Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Bürkle, A.** (2002). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environmental Health Perspectives.* 110: 797.
- **Hernández-Lorenzo, B.** (2015). Análisis de la anatomía y morfología de *Protoparva ovata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 65 pp.
- **INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** (2004). Información Geográfica del estado de Morelos, México.
- **INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.** (2009). Información Geográfica del Estado de Morelos, México.
- **INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.** (2011): Industria minero-metalúrgica en México Boletín de prensa núm. 482/11.
- **Jaruga P., Dizdaroglu M.** (1996). Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24:1389–1394.

- **Jasso-Pineda, Y; Espinoza-Reyes, G; Gonzalez-Mille, D; Razo-Soto, L; Torres-Dosal, A; Mejia-Saavedra, J; Monroy, M; Irina, A; Yarto, M; Diaz-Barriga, F.** (2007). Anintegrated health riskassessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental assessment and management*. 344-350.
- **Kara, Y.** (2005). Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 2: 63–67.
- **Kim, J., Kim, K., Ahn, J., Ko, I., Lee, H.** (2005). Investigation and risk assessment modeling of As and other heavy metals contamination around five abandoned metal mines in Korea. *Environmental geochemistry and health*. 27(2), 193-203.
- **Laurinolli, M., Bendell-Young, I.** (1996). Copper, zinc, and cadmium concentrations in *Peromyscus maniculatus* sampled near an abandoned copper mine. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 30(4), 481-486.
- **Leonard, S., Bower, J., Shi, X.** (2004). Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and celular biochemistry*. 255(1-2), 3-10.
- **Leonard, SS., Harris GK., Shi., X.** (2004). Estrés oxidativo inducido por metales y transducción de señales. *Radiología Libre y Medicina*. 37 (12): 1921–1942.
- **Levengood, J., Heske, E.** (2008). Heavy metal exposure, reproductive activity, and demographic patterns in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a contaminated floodplain wetland. *Scienceofthe total environment*. 389(2-3), 320-328.
- **Liu, Y., Liu, J., Klaassen, CD.** (2001). Metallothionein-null and wild-type mice show similar cadmium absorption and tissue distribution following oral cadmium administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 175:253-9.
- **McNeill, D. R., Narayana, A., Wong, H. K., & Wilson, D. M.** (2004). Inhibition of Ape1 nucleasa activity by lead, iron and cadmium. *Toxicogenomics*, 112, 799-804.
- **Malgorzata, M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Lankoff, A., Dusinska, M., Kruszewski, M.** (2014). Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bonemarrow cells of rats in vivo. *ELSEVIER*. 86-91.
- **Martiniaková, M., Omelka, R., Jancová, R., Formicki, G.** (2011). Concentrations of selected heavy metals in bones and femoral bon estructura of bank (*Myodesglareolus*)

and common (*Microtus arvalis*) voles from different polluted biotopes in Slovakia. *Arch Environ Contam Toxicol*. 60:524-535.

- **Masella, R., DiBenedetto, R., Vari, R., Filesi C., Giovannini, C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem*. 16:577–586.
- **Medel, A., Ramos, S., Avelar, F., Mora, L., Rodríguez, F.** (2008). Caracterización de jales mineros y evaluación de su peligrosidad con base en su potencial de lixiviación. *Conciencia Tecnológica*. (35).
- **Memon, A., Schröder, P.** (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental science and pollution research international*. 16: 162–175.
- **Moriarty, F.** (1990). The study of pollutants in ecosystems. Academic Press. Reino Unido.
- **Morton, O.** (2006). Contenido de metales pesados en suelos superficiales de la ciudad de México. *Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol*. 9:45.
- **Muller, J., Kayser, L., Paikoff, S., Duarte, V., Tang, N., Perez, R., Rokita S., Burrows, C.** (1999). Formation of DNA adducts using nickel (II) complexes of redox-active ligands: a comparison of salen and peptide complexes. *Coord. Chem. Rev*. 186, 761-7.
- **Murillo-Herrera, A.** (2015). Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los Jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. 66 pp.
- **Mussali, P., Tovar, E., Valverde, M., Rojas, E.** (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 29 (1) 117-140.
- **Mussali, P., Tovar, E., Fortoul, T.** (2007). Cell cycle, P53 and metals. En: Metals and Toxicological Implications in Health. Fortoul T (Ed) Research Signpost. Kerala, India. Pp. 9-13.
- **Nava-Ruiz C, Rios C, Méndez-Armenta M, Barroso-Moguel R, Villeda-Hernández J.** (2001). Histopathological alterations in the brain regions of rats after perinatal combined treatment with cadmium and dexamethasone. *Toxicology*. 161:189-199

- **Núñez, R. A.** (2007). Técnicas in vitro para biorremediación de cromo y plomo. Tesis publicada. 15-17.
- **Olive, P; Banath, J; Durand, R.** (1999). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “comet” assay. *Radiat Res.* 122: 86-94.
- **Obasohan, E., Oronsaye, O., Eguavoen, I.** (2008). A comparative assessment of the heavy metal loads in the tissues of a common catfish (*Clarias gariepinus*) from Ikpoba and Ogba Rivers in Benin City, Nigeria. *Afr. Sci.* 9:13–23.
- **Owolabi y Awodele** (2019). Heavy metal bio-accumulation in the kidneys of scaly and non-scaly fishes from Epe Lagoon, Nigeria. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 931-936.
- **Osweller, GD., Carson, TL., Buck, WB., Van Gelder, GA.** (1985). Clinical and diagnostic veterinary toxicology. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, IA.
- **Patlolla, A; Barnes, C; Yedjou, C; Velma, R; Tchounwou, B.** (2009). Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol.* 24(1):66-73.
- **Qian, Y., Castranova, V., Shi, X.** (2003). New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction. *Journal of inorganic biochemistry.* 96(2-3), 271-278.
- **Romero, F., Núñez, L., Gutiérrez, M., Armienta, M., Cenicerros, A.** (2011). Evaluation of the potential of indigenous calcareous shale for neutralization and removal of arsenic and heavy metals from acid mine drainage in the Taxco mining area, Mexico. *Archives of environmental contamination and toxicology.* 60(2), 191-203.
- **Rossman, T.** (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 533(1), 37-65.
- **Rzedowski, J.** (2006). Vegetación de México. Fondo de Cultura Económica, México.
- **Linzey, A., R. Timm, S. Álvarez-Castañeda, I. Castro-Arellano, y T. Lacher.** (2008). *Liomys irroratus*. [En línea, disponible en <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T2465A22330412.en>. Consulta el 13/02/2018].

- **Santos-Moreno, A., y A. Santiago-Marcial.** (2012). Área de actividad y movimientos de *Liomys irroratus* (Rodentia: Heteromyidae) en una selva mediana de Tuxtepec, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83:496-502.
- **Santoyo-Martínez, M.** (2016). Bioacumulación, daño genotóxico y cambios en la morfología foliar de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 71 pp.
- **SEMARNAT.** (2004). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Dirección general del centro nacional de investigación y capacitación ambiental. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II.
- **SEMARNAT.** (2005). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Dirección de investigación en residuos y sitios contaminados. Subdirección de investigación en sitios contaminados y sustancias toxicas. Informe anual de actividades. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales.
- **Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, L.** (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- **Talavera, O., Armienta, M., Abundis, J., Mundo, N.** (2006). Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, southern Mexico. *Environmental geochemistry and health.* 28(3):243-55.
- **Talavera, O., Yta, M., Moreno, R., Almazán, A., Flores N., Duarte, C.** (2005). Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geofísica International.* 44: 49–64.
- **The Mineral Database-mindat.org.** 2004. Mineralogía de Huautla, Municipio de Tlalquiltenango, Morelos. <http://www.mindat.org/index.php>
- **Tice, R., Agurell, E; Anderson, D; Burlinson, B; Hartmann, A; Kobayashi, H.** (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 235: 206-21.
- **Tiller, K.** (1989). Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in soil Science.* 9: 113-141.

- **Toman, R., Massanyi, P., Cupka P., Lukać, N., Ducsay, L., Kolenka's, M.** (2002) Changes in weight of some organs and weight of rats under the influence of cadmium receiving in the diet from wean to sexual maturity in Slovak. In: Risk factors of the food chain: proceeding book, pp 154–157.
- **Toscano, CD., Guilarte, RT.** (2005). Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res Rev.* 49:529-54.
- **Tovar, E., Cervantes, L., Martínez, C., Rojas, E., Valverde, M., Ortiz, M., Mussali, P.** (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research.* 19(5), 1677-1686.
- **Tovar-Sánchez, E., Mussali-Galante, P., Martínez-Pacheco, M., Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Olvera-Velona, A.** (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32:1011-117.
- **Valko, M., Morris, H., Cronin, M.** (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry.* 12(10), 1161-1208.
- **Vassilev, A., Schwitzguébel, J., Thewys, T., Van Der Lelie, D., Vangronsvelt, J.** (2004). The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *The Scientific World Journal.* 4, 9-34.
- **Velasco, J., De la Rosa, G. Solorzano, y T. Volke.** (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. *SEMARNAT-INE.* México. 36 pp.
- **Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Huerta-Romero, R., Rios, C.** (2001). Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Res Bull.* 55:247-51.
- **Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J.** (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *INE-SEMARNAT.* México. 64 pp.
- **Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J., De la Rosa, P.** (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.* 3: 2-16.

- **Weng, L., Temminghoff, E., Van Riemsdijk, W.** (2001). Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environmental Science & Technology*. 35(22), 4436-4443.
- **Wilson, D., y D. Reeder.** (2005). Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference (3era Ed). *Johns Hopkins University Press*, 2142 pp.
- **Xiao, W.,** Ming, X; Shen, Y; Xin, Z; Li-Hong, X. (2006). Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. 16-23.
- **Zhitkovich, A.** (2005). Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chem. Res. Toxicol.* 18, 3-11.