

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL
DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus*
melanophrys QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

ALUMNA

Biól. Janeth Esteves Aguilar

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante

Cuernavaca, Morelos

DICIEMBRE, 2018

*Cada historia tiene un final, pero en la vida cada
final es un nuevo comienzo*

*Brittany Murphy
Pequeñas grandes amigas*

AGRADECIMIENTOS

A la maestría en Biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 784276 otorgada para la realización del presente proyecto.

A mi directora de tesis

Dra. Patricia Mussali Galante por su continuo apoyo en la dirección de este proyecto de maestría, mis más sinceros agradecimientos y admiración.

A los miembros de mi comité tutorial

Dra. Laura Ortiz Hernández por todos los comentarios hechos durante la realización del proyecto.

Dra. Isela Hernández Plata por impulsarme a través de críticas constructivas a realizar la mejor versión de mi misma tanto en el ámbito profesional como personal.

Dr. Efraín Tovar Sánchez por contagiarme de una actitud positiva ante las adversidades que se presentaron, así como por compartirme sus conocimientos.

Dr. Edgar Dantán González por exigirme un mejor desenvolvimiento y enseñarme que no puedo aseverar las cosas.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. José Antonio Guerrero por compartirme sus amplios conocimientos en Morfometría geométrica y tener una amplia disposición para ayudarme a resolver dudas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB y del laboratorio de Marcadores Moleculares del CIByC, principalmente:

A la **M en B. Ana Karen** por compartir conmigo sus conocimientos, pero especialmente por brindarme tu invaluable amistad.

A el **Biól. Marcos Rosas** por hacer mis días más amenos con sus ocurrencias.

Al **M. en BIByC Miguel Santoyo** por estar presente tanto en los momentos buenos como en los malos, nunca cambies.

A la **M. en B. Natalia de la Cruz** por todos los momentos que compartimos durante esta travesía, que incluyen tanto tu paciencia para explicarme técnicas de laboratorio como anécdotas divertidas.

A la **Lic. Anaid Fuentes** por ser tan increíblemente divertida y por la disposición que siempre tienes para ayudar a los demás.

Al **Dr. Alfredo López Camal** por compartir sus conocimientos y ser muy paciente explicando.

Al personal de la estación biológica de Quilamula

Sr. Lucas, Sr. Goyo y Sr. Amado por todo el apoyo brindado en las salidas de campo.

A mis padres y hermanas

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. Actividad minera en México	3
2. Jales e impacto ambiental por la actividad minera	3
3. Efecto de los metales pesados en el medio ambiente	5
4. Mecanismo de acción de los metales pesados	5
5. Daño genético en hígado ocasionado por metales pesados	7
6. Disrupción en la estabilidad del desarrollo del cráneo mediada por la presencia de metales pesados	9
7. Biomarcadores para detección de daño inducido por metales	11
8. Biomarcador de dosis biológica efectiva: daño genético	12
9. Microsatélites como biomarcador de dosis biológica efectiva	13
10. Morfometría geométrica	17
11. Fluctuación asimétrica como biomarcador de dosis biológica efectiva que explica la inestabilidad en el desarrollo del cráneo los organismos	19
12. Especies centinelas para biomonitoreo de contaminación ambiental por metales 22	
13. Roedores del género <i>Peromyscus</i> como organismos modelo	23
14. Sitio de estudio: Huautla, Morelos	23
II. ANTECEDENTES DEL SITIO DE ESTUDIO	24
III. JUSTIFICACIÓN	28
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVO GENERAL	29
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	29
VII. METODOLOGÍA	29
15. Sitios expuestos	29
16. Sitio testigo	30
17. Especie de estudio <i>Peromyscus melanophrys</i> (Hall, 1981)	30
.....	32
18. Muestreo de <i>Peromyscus melanophrys</i>	32
19. Evaluación de daño genético a través de microsatélites	33

a)	Extracción de ADN	33
b)	Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis	34
c)	Cuantificación y dilución de ADN	34
d)	Amplificación de microsatélites	35
e)	Amplificación de microsatélites marcados	38
20.	Tejido óseo y fluctuación asimétrica en el cráneo	39
f)	Remoción de piel y limpieza de tejido óseo	39
g)	Evaluación de la inestabilidad en el desarrollo del cráneo a través de fluctuación asimétrica	40
VIII.	RESULTADOS.....	42
21.	Daño genético	42
22.	Relación entre la concentración de metales pesados y el daño genético	43
23.	Microsatélites como biomarcador de daño genético	46
24.	Análisis de componentes principales (PCA), gradillas de deformación y descripción de la forma del cráneo del grupo testigo.	47
25.	Análisis de componentes principales (PCA), gradillas de deformación y descripción de la forma del cráneo del grupo expuesto a metales pesados.	49
26.	Análisis multivariado de varianza	51
IX.	DISCUSIÓN.....	52
27.	Daño genético en <i>Peromyscus melanophrys</i> y su relación con la concentración de metales	52
28.	¿Animales de laboratorio o silvestres para estudios ecotoxicológico?	56
29.	¿Son los microsatélites un buen biomarcador de daño genético?	58
30.	Fluctuación asimétrica como biomarcador de inestabilidad en el desarrollo del cráneo	59
31.	Posibles causas implicadas en la inestabilidad del desarrollo del cráneo en <i>Peromyscus melanophrys</i>	61
X.	CONCLUSIONES.....	63
XI.	LITERATURA CITADA	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estudios realizados en la localidad de Huautla, Morelos, municipio de Tlaquiltenango en zonas contaminadas con metales pesados.....	26
Tabla 2 Concentración de metales en hueso e hígado en machos de la especie <i>Peromyscus melanophrys</i>	27
Tabla 3 Concentración de metales en hígado en machos de la especie <i>Peromyscus melanophrys</i>	28
Tabla 4 Secuencias de microsatélites de <i>Peromyscus maniculatus</i>	37
Tabla 5 Nombre y número de las marcas que se digitalizadas en el lado ventral del cráneo de la especie <i>Peromyscus melanophrys</i>	41
Tabla 6 Valores promedio \pm error estándar del número de mutaciones puntuales entre el grupo expuesto y el grupo testigo mediante una prueba de T.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mutación de microsatélites por deslizamiento de las hebras de ADN.....	14
Figura 2 Mapa de México que muestra la distribución geográfica de <i>Peromyscus melanophrys</i>	31
Figura 3 <i>Peromyscus melanophrys</i>	32
Figura 4 Geles de garosa al 0.8% para comprobar la integridad total del ADN....	34
Figura 5 Geles de agarosa al 0.8% realizados con muestras diluidas a 30 ng/μl..	35
Figura 6 Geles de agarosa al 1.5% realizados para determinar la amplificación de todas las muestras con el microsatélite 105.....	36
Figura 7 Geles de realizados para determinar la amplificación del microsatélite 106 marcado en todas las muestras.....	38
Figura 8 Obtención del cráneo de la especie <i>Peromyscus melanophrys</i>	39
Figura 9 Vista ventral del cráneo de individuos testigo y expuesto.....	40
Figura 10 Representación visual del posicionamiento de cada marca respecto al eje de simetría en el cráneo de <i>Peromyscus melanophrys</i>	41
Figura 11 Análisis de la regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Zn y el número de mutaciones puntuales en <i>Peromyscus melanophrys</i>	43
Figura 12 Análisis de la regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Ni y el número de mutaciones puntuales en <i>Peromyscus melanophrys</i>	44
Figura 13 Análisis de la regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Cu y el número de mutaciones puntuales en <i>Peromyscus melanophrys</i>	44
Figura 14 Análisis de la regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Fe y el número de mutaciones puntuales en <i>Peromyscus melanophrys</i>	45
Figura 15 Análisis de la regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Mn y el número de mutaciones puntuales en <i>Peromyscus melanophrys</i>	45
Figura 16 Correlación de biomarcadores de daño genético a nivel individual.....	46
Figura 17 Correlación de biomarcadores de daño genético a nivel poblacional...	47

Figura 18 Gradillas de deformación de los animales testigo aumentadas 3 veces.....	49
Figura 19 Gradillas de deformación de los animales expuestos aumentadas 3 veces.....	51

RESUMEN

En el estado de Morelos la explotación de minería metálica se concentró en el municipio de Tlaquiltenango, específicamente en la localidad de Huautla. Dicha actividad dio como resultado la acumulación de 780, 000 toneladas de residuos mineros ricos en Pb, Mn y Cd que no han sido tratados y que representan un foco de contaminación permanente para la biota al encontrarse biodisponibles, debido a que los metales pesados (MP), son genotóxicos, altamente tóxicos a bajas concentraciones, no biodegradables, bioacumulables y además pueden biomagnificarse a través de la cadena trófica. Debido a que los metales pesados se encuentran biodisponibles en los jales de Huautla, Morelos, se espera que los roedores de la especie *Peromyscus melanophrys* que viven en los jales presenten mayor daño genético en comparación con los individuos del sitio control. Asimismo, se espera que los individuos expuestos a altas concentraciones de metales pesados exhiban inestabilidad en el desarrollo del cráneo en comparación con los controles. Cuando los organismos se encuentran sometidos a contaminantes generan respuestas que pueden ser detectadas a través del uso de biomarcadores. Es por ello, que con el fin de evaluar el daño genético en hígado y la inestabilidad en el desarrollo del cráneo de la especie centinela *Peromyscus melanophrys* se recurrió al uso de dos biomarcadores de efecto temprano, microsatélites y fluctuación asimétrica respectivamente. La metodología para daño genético consistió en realizar la captura de cuarenta individuos de la especie *Peromyscus melanophrys* utilizando 132 trampas Sherman cebadas con una mezcla de cacahuete, avena y vainilla, después los roedores fueron sacrificados utilizando una cámara letal, a continuación se llevó a cabo la extracción del ADN del hígado con un kit y posteriormente la amplificación de ocho microsatélites marcados con un fluorocromo distinto, los microsatélites que presentaron: 1) bandas claras, 2) polimorfismo y 3) amplificación de la mayoría de los individuos fueron mandados al secuenciador del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología (UNAM). Los datos proporcionados por el instituto fueron analizados con el programa

GeneMarker V2.7.0. para conocer el número de pares de bases de cada microsatélite. Por otra parte, para estimar la inestabilidad en el desarrollo del cráneo, los cuarenta cadáveres fueron colocados en una caja que contenía larvas y adultos del escarabajos la especie *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) para que remover el tejido de los huesos. Al concluir este proceso se procedió a tomar de fotografías de cada uno de los cráneos en vista ventral con ayuda del equipo Photosimile 360 que tiene integrada a una cámara EOS T5l marca Canon, a continuación, se hizo la digitalización de las fotos tpsDig y los datos fueron analizados en SAGE (Fluctuating assymetry analysis with geometric morphometrics). Los resultados obtenidos con la prueba de T para el daño genético muestran que los individuos del grupo expuesto presentaron mayor inestabilidad en el microsatélite (incremento de mutaciones puntuales) en comparación con el grupo testigo. Asimismo, el análisis de regresión lineal mostro una relación significativa, en la cual, a mayor concentración del metal, mayor es el daño genético observado. Esto puede deberse a la genotoxicidad que los metales pesados producen a través de la generación de ROS o interfiriendo con el funcionamiento de las metalotioneínas y los sistemas de reparación al ADN lo cual se refleja en la inestabilidad del microsatélite. Por otra parte, el análisis multivariado de varianza muestra que los individuos expuestos presentaron mayor fluctuación asimétrica en el cráneo en comparación con los individuos testigo. Lo cual posiblemente se encuentra relacionado con la disrupción que ejercen los metales pesados en la estabilidad del desarrollo del cráneo. Este estudio concluye que ambos biomarcadores (microsatélites y fluctuación asimétrica) son útiles para evaluar el daño genético y la inestabilidad en el desarrollo del cráneo, respectivamente, en una la especie centinela *Peromyscus melanophrys* que se encuentra crónicamente expuesta a una mezcla de MP.

I. INTRODUCCIÓN

1. Actividad minera en México

México se caracteriza por ser un país rico en recursos minerales. Lo que le ha permitido explorar, explotar y aprovechar diferentes yacimientos mineros como los que se encuentran presentes en los 32 estados de la república mexicana (INEGI, 2011). Actualmente, la Cámara Minera de México (CAMIMEX) registró 1,558 minas en operación y 1,156 proyectos en exploración, lo que ha generado 344,912 empleos directos y 1,724,560 empleos indirectos. CAMIMEX también menciona, que los estados de Sonora, Zacatecas, Durango, Chihuahua, Coahuila, San Luis Potosí, Colima, Michoacán, Guerrero y Baja California Sur son los principales generadores de ingresos (CAMIMEX, 2015).

A nivel mundial, México ocupa el primer lugar por sexta ocasión en la producción de plata (Ag) con 189.5 millones de onzas (The Silver Institute, 2016). Además, México ocupa el tercer lugar en la producción de bismuto (Bi), quinto en plomo (Pb), noveno en oro (Au) y onceavo en cobre (Cu) (Góngora, 2013).

A pesar de que la actividad minera produce ventajas económicas que permiten a nuestro país ser competitivo, también debe considerarse, que dicha actividad genera el 65% de los residuos industriales que se producen en el país (Mejía *et al.*, 1999).

2. Jales e impacto ambiental por la actividad minera

En los yacimientos mineros son utilizados los procesos metalúrgicos como flotación y cianuración para obtener volúmenes mayores de minerales de interés económico (Longsdon *et al.*, 2001). Durante dichos procesos se generan residuos de granulometría fina, los cuales son acumulados en depósitos llamados jales. Los jales son depósitos de minerales no consolidados, que generalmente se encuentran expuestos a la intemperie. Esto provoca que los residuos sean dispersados por acción del viento o la lluvia al entorno, lo que conlleva a la contaminación del suelo,

sedimentos y cuerpos de agua (Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006). Los jales contienen sulfuros metálicos tales como pirita (FeS_2), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2) y arsenopirita (FeAs), mismos que son la fuente principal de generación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) (Romero y Gutiérrez, 2010). Los EPT son aquellos que debido a sus características y a la concentración en la que se presentan en el ambiente pueden llegar a ser tóxicos para la biota (Bautista, 1999). Ejemplos de EPT son los metaloides y metales pesados (MP) como el arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb). Incluso los metales esenciales como cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn) pueden llevar a ser tóxicos a altas concentraciones (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007). Cabe mencionar que el factor determinante para que se produzca contaminación en el medio ambiente, no es como tal la concentración alta de EPT sino más bien propiedades fisicoquímicas del jale que promueven la biodisponibilidad de los EPT.

La biodisponibilidad “capacidad de un elemento (MP) de pasar de un compartimiento del suelo a un ser vivo” (López y Grau, 2005) depende de las características físico-químicas del suelo, tales como: pH, conductividad eléctrica (concentración y composición de sales disueltas), composición mineralógica (aragonito, cuarzo, calcita, feldespato, pirita, entre otros), textura (fina: limo y arcilla o gruesa: arena), contenido de materia orgánica, oxidación de sulfuros que genera acidez y neutralización de acidez por carbonatos (Sahuquillo *et al.*, 2003; Ramos-Arrollo y Siebe-Grabach, 2006; Ramos *et al.*, 2012).

En México existen distintos casos donde los metales pesados presentes en los jales han provocado la contaminación del medio ambiente, algunos ejemplos de ello se encuentran en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas, entre otros (Velasco *et al.*, 2004; Carrizales *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2006). Un estudio realizado por Ramírez (2001) estimó que en el país existen más de 80 depósitos de jales en operación y que, además, se desconoce la cifra de jales inactivos. Además, se desconocen las características fisicoquímicas de estos jales y su impacto sobre el medio ambiente.

3. Efecto de los metales pesados en el medio ambiente

De acuerdo con la norma oficial mexicana Nom-141-SEMARNAT-2003 un jal puede considerarse un peligro para el medio ambiente en función de su potencial de lixiviación de EPT. Dentro de los EPT se encuentran los metales pesados (MP), que por definición son elementos que presentan una densidad mayor de 5 g/cm³ (Barceló y Poschenrieder, 1992). Estos metales impactan negativamente a los ecosistemas porque son altamente tóxicos a bajas concentraciones y no biodegradables, es decir, que persisten indefinidamente en el medio ambiente (Waalkers *et al.*, 2000).

La exposición crónica a MP provoca efectos adversos en todos los niveles de organización biológica (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Algunos organismos tienen la capacidad de bioacumular “acumular metales pesados en sus tejidos” (Schäfer *et al.*, 2015). Dicha bioacumulación se presenta cuando se sobrepasa la capacidad del organismo para metabolizar o excretar los MP, de forma que su concentración se vuelve mayor dentro de él que fuera del mismo (Moriarty, 1999). Por lo tanto, cuando un individuo que acumula metales es consumido por su depredador inmediato y éste a su vez por su depredador correspondiente, se da la transferencia del metal bioacumulado de un nivel trófico a otro, lo que se conoce como biomagnificación del metal a través de la cadena trófica. De manera que el último eslabón en la cadena trófica es el que presenta mayor bioacumulación y toxicidad (Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2006; Escobar-Sánchez, 2010; Soto-Jiménez, 2011).

4. Mecanismo de acción de los metales pesados

La toxicidad de los metales pesados radica en la capacidad que tienen de eludir las barreras del organismo y modificar el funcionamiento normal a través de la activación e inactivación de blancos moleculares importantes (Waalkers *et al.*, 2000; Armienta *et al.*, 2005).

El mecanismo principal a través del cual los metales pueden causar daño celular consiste en reemplazar los metales esenciales de los centros activos de las enzimas, lo que conlleva al mal funcionamiento de las proteínas. Ejemplos de esto son la anhidrasa carbónica II que pertenece a una familia de metaloenzimas que contienen en su sitio activo una molécula de Zn, que al ser reemplazada por Pb, provoca que la actividad de la metaloenzima sea deficiente (Pounds *et al.*, 1991). Asimismo, se ha mostrado que el Pb, Fe y Cd inhiben enzimas involucradas en la reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico) por ejemplo la nucleasa Ape 1 (McNeil *et al.*, 2004; Hartwig & Schwerdtle, 2002).

Otro mecanismo de acción de los metales pesados está relacionado con la genotoxicidad (capacidad de causar daño al ADN), ya sea por vía indirecta a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o por vía directa al unirse al ADN (Wang y Shi, 2001). Actualmente, se ha mostrado que a pesar de que cada metal puede tener su propio mecanismo de acción, todos son capaces de generar ROS (Leonard *et al.*, 2004). Las ROS son un conjunto de moléculas reactivas que se forman en procesos de oxidación metabólica. Ejemplos de ellos son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el altamente reactivo radical hidroxilo (OH). Al interior de la célula, existe un balance entre el sistema oxidante y antioxidante que es crítico para el correcto funcionamiento, cuando no es posible mantener el balance se produce un estrés oxidante que puede afectar a los organelos (Leonard *et al.*, 2004). También se pueden generar respuestas inflamatorias que activan vías de señalización de carcinogenicidad (Wang y Shi, 2001; Leonard *et al.*, 2004).

Por otra parte, la vía directa consiste en la formación de aductos de ADN, alquilación de bases, rompimiento de cadena sencilla/doble, entrecruzamiento de cadena y mutaciones. Los aductos de ADN es la unión covalente de un MP con átomos de nitrógeno u oxígeno de las bases nitrogenadas del ADN. Mientras que de manera general la alquilación de bases involucra la unión de un grupo alquilo (metilo/etilo) a un átomo de nitrógeno de la guanina (Hartwig, 1995; Arbillaga *et al.*, 2004). La alquilación de bases induce la formación de un sitio AP (apurínico-apirimidínico) que

rápida mente es detectado por enzimas de reparación, las cuales al reemplazar la base afectada inducen una ruptura en la cadena de ADN que, dependiendo de la cantidad de cadenas involucradas, puede considerarse como rompimiento de cadena sencilla o doble (McNeil *et al.*, 2004). Además, la alquilación de bases también está relacionada con el entrecruzamiento de cadenas (Zamble y Lippard, 1995).

En la alquilación dos bases nitrogenadas son unidas por un alquilo que tiene dos sitios de unión en el ADN, dichas uniones pueden formarse dentro de una sola molécula de ADN o pueden conectar dos moléculas de ADN diferentes (Zamble y Lippard, 1995). Finalmente, las mutaciones pueden surgir de manera espontánea, por la incorporación de bases incorrectas durante la replicación del ADN o bien por exposición a xenobióticos. La exposición a MP provoca distorsión en la estructura del ADN y bloquea tanto la replicación del ADN, como la transcripción del segmento afectado a ARN, lo que deriva en un aumento de las mutaciones como consecuencia de la interacción del metal con el ADN (Fortoul, *et al.*, 2006).

De acuerdo con lo anterior, los MP utilizan distintos mecanismos de acción para modificar o ejercer daño en blancos moleculares importantes, sin embargo, los efectos ocasionados por los MP no sólo se aprecian a nivel molecular o celular, sino que también pueden observarse en tejidos y órganos blancos, como es el caso del hígado y del tejido óseo.

5. Daño genético en hígado ocasionado por metales pesados

El hígado es un órgano indispensable para el organismo, debido a que participa en diversas funciones tales como (Bello y López, 2001):

- a) La síntesis de colesterol, triacilglicerol, lipoproteínas, así como de proteínas del plasma (albumina, factores de coagulación, varias globulinas).
- b) Regulación de la glucosa en plasma.
- c) Metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, bilirrubina y biotransformación de xenobióticos.

- d) Desintoxicación del cuerpo y excreción de sustancias.
- e) Almacenamiento de vitaminas A, D, K y B12.

Es por ello, que cuando el hígado sufre un daño irreparable o que afecta su funcionamiento se presentan problemas en el organismo. Por ejemplo, los genotóxicos como los MP tienen la capacidad de causar daño al hígado ya sea de manera directa o indirecta (Bello y López, 2001).

La forma directa implica un daño a las células hepáticas a través de la unión del xenobiótico a la membrana hepatocelular o a otros componentes celulares. Mientras que la forma indirecta está asociada con la bioactivación metabólica del xenobiótico (Bello y López, 2001).

Independientemente de la vía de exposición (oral, pulmonar), el hígado es el órgano principal en captar MP durante las primeras horas de exposición (Souza *et al.*, 2012). Los MP son metabolizados en el hígado, donde se unen a proteínas de bajo peso molecular conocidas como metalotioneínas (MT), las cuales, al ser ricas en cisteínas favorecen la formación de un complejo MT-MP (Sabath y Robles-Osorio, 2012). Dicho complejo, permite contener y almacenar MP, de tal manera que las MT actúan como un mecanismo de protección para evitar que los MP se unan a los (-SH) de otras proteínas (De Ocampo y Ocampo, 1999). Por tanto, cuando la cantidad de MT es menor en comparación con la cantidad de MP disponibles en el medio, los MP pueden unirse a componentes de la membrana hepatocelular que contienen grupos sulfhidrilo, lo que desencadena una respuesta inflamatoria que puede generar cambios estructurales en los hepatocitos y también provocar necrosis y apoptosis (Souza *et al.*, 2012). Por otro lado, en ocasiones puede aumentar la toxicidad del metal (bioactivación) a través de un conjunto de reacciones metabólicas que alteran las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico. Esta alteración favorece su absorción a través de las membranas biológicas (lipofilia) o su eliminación por la orina o bilis (hidrofilia) (Curtis-Klaassen, 2008).

Además, los metales pesados son capaces de inducir hiperplasia (aumento anormal del tamaño de un órgano). Por ejemplo, el Pb al ser lipofílico (tener afinidad por las grasas y ser soluble en lípidos) puede acumularse en el tejido adiposo y al mismo

tiempo favorecer el aumento del tamaño del hígado al incrementar la proliferación celular de los hepatocitos (Klosinska, 1996; Repetto y Repetto, 2009; Llopis-González *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el hígado es un órgano blanco de los MP, no obstante, no es el único que resulta afectado cuando los MP evaden las barreras naturales del organismo. El tejido óseo, es quizá el más susceptible de experimentar cambios estructurales, dado que los MP se acumulan en el hueso desde etapas muy tempranas en el desarrollo de los organismos y continúa acumulándose hasta la edad adulta.

6. Disrupción en la estabilidad del desarrollo del cráneo mediada por la presencia de metales pesados

El tejido óseo es un tejido vivo, complejo y dinámico que continuamente experimenta procesos de remodelación y desempeña funciones básicas como (Tortora y Derrickson, 2010):

- a) Sostén: el esqueleto se encarga de dar sostén a los tejidos blandos y proporcionar puntos de inserción para los tendones de la mayoría de los músculos.
- b) Protección: protege de lesiones a los órganos internos.
- c) Asisten en el movimiento: debido a que la mayoría de los músculos se fijan en el hueso, cuando se contraen jalan de estos para producir el movimiento.
- d) Homeostasis mineral: el tejido óseo almacena minerales como calcio (Ca) y fósforo (P) que contribuyen en la solidez del hueso, por otra parte, los huesos se encargan de liberar hacia la sangre los minerales necesarios para mantener la homeostasis.

- e) Producción de células sanguíneas: dentro de los huesos en desarrollo de fetos, así como en algunos huesos de adultos (pelvis, costillas, esternón, vertebras, cráneo y extremos de huesos largos del brazo) se encuentra médula ósea roja, en la cual se lleva a cabo el proceso de hematopoyesis (producción de glóbulos rojos, blancos y plaquetas)

De manera natural, durante el desarrollo del hueso, éste incorpora metales como Ca y P en mayor proporción y flúor (F), magnesio (Mg), hierro (Fe) y manganeso (Mn) en cantidades traza para cumplir con los requerimientos que le permitan crecer y llevar a cabo la remodelación ósea (reemplazo permanente de tejido viejo por nuevo), (Tortora y Derrickson, 2006). No obstante, dada la similitud de los MP con los metales esenciales, los MP inhiben o estimulan procesos de resorción ósea (remoción de minerales y fibras colágenas por osteoclastos) y reabsorción ósea (incorporación de minerales y fibras colágenas por osteoblastos) (Pounds *et al.*, 1991). Lo que conlleva a una pérdida de la homeostasis y a una consecuente inestabilidad en el desarrollo del hueso, que puede culminar en una disminución de la adecuación de los organismos involucrados.

Un ejemplo de MP que tiene efectos en el hueso es el Pb. Este metal tiene la capacidad de acumularse durante el desarrollo del hueso del feto (alrededor de las seis semanas) y continuar almacenándose hasta la edad adulta. Asimismo, el Pb puede ser movilizado en el organismo por factores como el crecimiento, embarazo, lactancia, fractura, ejercicio, envejecimiento, etc. (Tortora y Derrickson, 2006; Scimeca *et al.*, 2016). Se ha mostrado que la exposición a este metal causa uremia (acumulación en la sangre de sustancias nitrogenadas que normalmente se eliminan por la orina), inhibición o activación de células del hueso osteoblastos/osteoclastos y de hormonas relacionadas con el crecimiento del mismo (hormona paratiroidea, hormona hipocalcémica).

En modelos animales se ha mostrado que la exposición a Pb causa reabsorción de embriones y malformaciones de fetos de ratones, ratas y hámsters. Las malformaciones generalmente consisten en la fusión de dos o más vertebras de la parte anterior del esqueleto axial, retraso del crecimiento de la cola o ausencia de

la misma y en menor medida de la presencia de anoftalmía (ausencia completa de uno o ambos ojos) y espina bífida (Ferm y Carpenter, 1967; Ferm y Ferm, 1970; Pounds *et al.*, 1991). Por otra parte, un estudio realizado en ratas expuestas a Cr VI en agua de bebida durante la gestación, evidenció las hembras procrean fetos con osificación reducida (parietal, interparietal y caudal) por el efecto citotóxico que puede causar el cromo en los osteoblastos (Junaid *et al.*, 1996).

Otro ejemplo es la exposición al zinc, que también tiene efectos óseos. Se ha mostrado que la administración de sulfato de zinc en ratas aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual se encuentra relacionada con la síntesis de DNA y como resultado estimula el crecimiento del hueso (Yamaguchi y Yamaguchi, 1986), además también se ha probado que el zinc es un potente inhibidor de la resorción ósea (Moonga y Dempster, 1995).

Para poder dilucidar los efectos que provocan los MP en los organismos, es necesario realizar estudios que integren la exposición a MP con el daño genético y la inestabilidad en el desarrollo de los organismos, lo cual, sólo puede lograrse si se implementa el uso de biomarcadores.

7. Biomarcadores para detección de daño inducido por metales

Cuando los organismos se encuentran sometidos a contaminantes generan respuestas que pueden ser detectadas, a las cuales se les denomina biomarcador (Von Osten, 2015). Un biomarcador es una modificación bioquímica, celular, histológica, estructural, funcional o del comportamiento de los individuos que indica una exposición a contaminantes (Depledge, 1993; Lam y Gray, 2003). La función principal de éstos es proveer una detección temprana del daño producido, lo que permite generar estrategias preventivas para evitar consecuencias severas para los organismos (Von Osten, 2015).

Los biomarcadores de exposición detectan la presencia de una sustancia exógena en los organismos a través de estimar la interacción del agente xenobiótico con una célula diana (Arango, 2012). Dichos biomarcadores se dividen en dos:

biomarcadores de dosis interna y biomarcadores de dosis biológica efectiva (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Los biomarcadores de dosis interna muestran la dosis actual del contaminante dentro del tejido, ejemplos de estos, son presencia de As en uñas y cabello, la excreción vía urinaria del ácido dimetilarsínico, la concentración de Pb en sangre y hueso (Pounds *et al.*, 1991; Ramírez, 2006); concentración de Cd en hígado y hueso (Dermience *et al.*, 2015), metilmercurio en cabello (Ballesteros *et al.*, 2011) presencia de Cd y Pb en plumas de aves (Martínez-López *et al.*, 2002). Mientras que los biomarcadores de dosis biológica efectiva son los primeros en ser detectados cuando el individuo se encuentra expuesto a algún tipo de xenobiótico, el ejemplo son los aductos de ADN (Mussali-Galante *et al.*, 2013), previamente mencionados.

Cabe mencionar que en el presente estudio, se utilizará como marcador de dosis interna la concentración de metales en hígado y hueso. Mientras que como biomarcadores de dosis biológica efectiva se utilizarán a los microsatélites para evaluar el daño genético en el hígado y a la fluctuación asimétrica para estimar la inestabilidad en el desarrollo del cráneo en individuos expuestos a MP.

8. Biomarcador de dosis biológica efectiva: daño genético

Cuando se requiere una evaluación del efecto que se ha generado por la exposición a un contaminante sobre un individuo, se recurre a los biomarcadores de dosis biológica efectiva, que al ser más sensibles a la exposición química exhiben alteraciones en el ADN, lo que permite realizar un diagnóstico adecuado y la generación de una intervención efectiva (Mussali *et al.*, 2013; Von Osten, 2015).

Los daños que se pueden apreciar a través de este biomarcador son los siguientes:

- Rupturas de una o dos hebras de ADN: Dichas rupturas se presentan cuando los metales interactúan de forma indirecta con el ADN, generando ROS que provocan la ruptura de una o ambas hebras de ADN (Fortoul *et al.*, 2006).
- Aberraciones cromosómicas: éstas están ligadas a procesos como duplicación, deleción o reacomodo de los cromosomas dentro de un gen.

Dichas aberraciones generalmente ocurren durante la síntesis de ADN aunque también se pueden presentar en cualquier fase del ciclo celular, dependiendo del tipo de tóxico involucrado (Hebert y Luiker, 1996).

- Micronúcleos: son pequeños cúmulos de DNA (semejantes a núcleos pequeños) que se localizan en el citoplasma. Los micronúcleos se generan por dos procesos: en el microsátéliteo, los fragmentos de cromosomas acéntricos o centroméricos son incapaces de unirse a la fibra del uso durante la división celular. Mientras que, en el segundo proceso, un cromosoma es excluido del núcleo al ser considerado como defectuoso para llevar a cabo la división celular. Así, la formación de micronúcleos puede ser el resultado de rupturas en los cromosomas o de un mal funcionamiento de la fibra del uso mitótico (Lindberg *et al.*, 2007).
- Daño oxidante sobre lípidos, proteínas o ADN. Estos mecanismos ya han sido explicados en párrafos previos.
- Microsatélites: implica la sustitución de un nucleótido de ADN por otro (Pañuela, 2005).

Los tipos de daño genético mencionados anteriormente pueden ser evidenciados por diversas técnicas tales como el ensayo cometa (Olive *et al.*, 1990; Tice *et al.*, 2000), técnica de cromosomas pintados (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt, 1997), aberraciones cromosómicas (Ostrosky-Wegman y Gonsebatt, 1997) y micronúcleos (Arencibia y Fernández, 2003), y recientemente los microsátélites. Todas estas técnicas detectan el daño al ADN y los tipos de daño previamente mencionados son considerados como biomarcadores de dosis biológica efectiva.

9. Microsatélites como biomarcador de dosis biológica efectiva

Los microsátélites son secuencias cortas repetidas en tándem de uno a seis pares de bases, que se encuentran distribuidas al azar en regiones codificantes y no codificantes del genoma de eucariotas y procariotas. Los microsátélites también se han encontrado en genomas de la mitocondria y del cloroplasto. Además, son constituyentes importantes de telómeros y centrómeros, así mismo son polimórficos

respecto a su longitud. El alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación por locus por generación. La tasa de mutación estimada en humanos es de 10^{-3} (Weber y Wong, 1993) y para roedores es de 10^{-3} a 10^{-4} (Dallas, 1992). Además, los microsatélites son codominantes y pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótido), por dos (dinucleótido), por tres (trinucleótido) y hasta seis nucleótidos. Cuando se encuentran formados por un único nucleótido se les denomina puros (AAAAAA), si están conformados por dos o más nucleótidos se les llama compuestos (AAAATTTT) y cuando un nucleótido se inserta en alguna parte de la repetición se les denomina interrumpidos (AAAATAAAA) (Vázquez y Morales, 2014).

El mecanismo de mutación que genera la abundancia de polimorfismo en los microsatélites es el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (slippage misspairing figura 1). Cuando el ADN se replica pueden suceder alineamientos erróneos por un deslizamiento en el apareamiento de las hebras, ya que durante la síntesis las dos hebras que están separadas momentáneamente pueden volver a asociarse en una posición diferente. Lo cual produce un apareamiento erróneo durante el crecimiento de la nueva cadena. Cuando el alineamiento erróneo ocurre en la hebra nueva se produce un aumento en el número de repeticiones del microsatélite, sin embargo, cuando ocurre en la hebra parental se genera una disminución de nucleótidos (Vázquez y Morales, 2014).

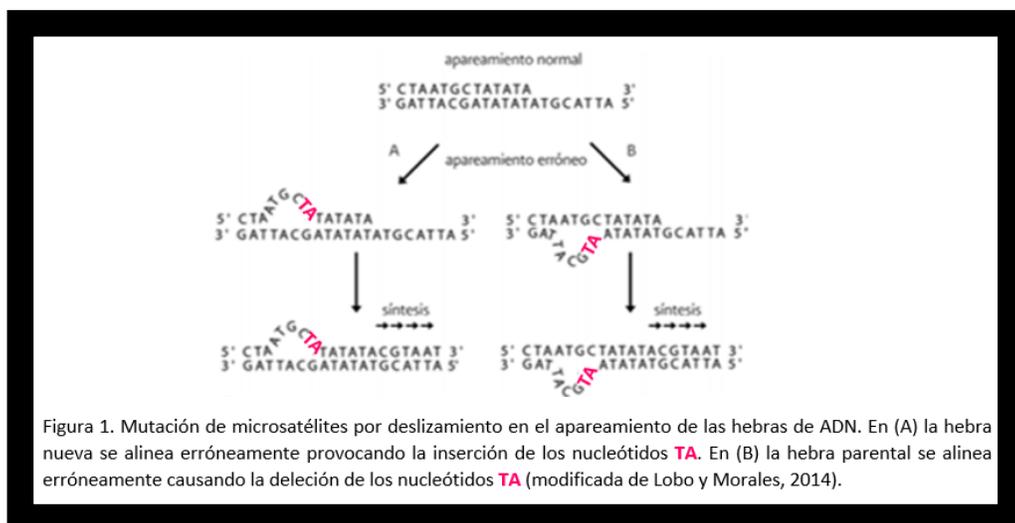


Figura 1. Mutación de microsatélites por deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN. En (A) la hebra nueva se alinea erróneamente provocando la inserción de los nucleótidos TA. En (B) la hebra parental se alinea erróneamente causando la deleción de los nucleótidos TA (modificada de Lobo y Morales, 2014).

Las mutaciones en los microsatélites son explicadas por dos modelos: a) el modelo de mutación por pasos y b) el modelo de alelos infinitos.

- a) En el modelo de mutación por pasos, el proceso de mutación depende del estado ancestral porque el tamaño del nuevo alelo producto de la mutación, depende del alelo original. De esta forma los alelos que comparten un ancestro común más reciente se encuentran más relacionados en comparación con aquellos que difieren en varias unidades. Por lo anterior, este modelo es útil para estimar relaciones entre individuos y estructura poblacional (Schlötterer, 2000).
- b) En el modelo de alelos infinitos, cada mutación crea aleatoriamente un alelo nuevo, por lo que todos los alelos diferentes son considerados como nuevas variantes y asume que todos los procesos de inserción y delección pueden involucrar más de dos nucleótidos. Este es útil para evaluar la diversidad genética dentro de una especie (Schlötterer, 2000).

Recientemente el uso de microsatélites ha aumentado respecto al uso de otros biomarcadores debido a que: a) presentan un alto grado de polimorfismo, b) permiten detectar el número de mutaciones puntuales/haplotipos privados y c) son reproducibles y confiables (Monteiro *et al.*, 2007). En general, el uso de microsatélites se ha enfocado en estudios sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto como un biomarcador de daño genético (McBride, 2003). A continuación, se muestran los estudios que se han realizado bajo este enfoque.

Zienolddiny *et al.*, (2000) transformaron tres líneas celulares de cáncer de pulmón A427, HCC15 y NCI-H2009 con un vector. Este consistía en una secuencia repetida integrada de trece repeticiones de CA de un gen reportero de higromicina B. Los resultados evidenciaron que la Níquel (II) induce una reversión en mutantes resistentes a higromicina (*hyg^r*) por la pérdida o ganancia en pares de bases dentro de la secuencia repetida integrada (CA).

Por su parte, Mairs *et al.*, (2007) determinaron a través del uso de 30 microsatélites que la exposición a bajas frecuencias (50 Hz) de campos electromagnéticos e ionización en líneas celulares de glioma en humanos generan tres tipos de mutaciones: cambio en el tamaño del alelo, pérdida de heterocigosidad e inestabilidad alélica.

Mientras que, Monteiro *et al.*, (2009) trataron cultivos hidropónicos de lechuga (*Lactuca sativa*) a altas concentraciones de Cd (100 μ M) y evaluó el daño producido al ADN en raíces y hojas a través de nueve microsatélites. Dichos autores, no encontraron inestabilidad en el microsatélite en hojas. Sin embargo, descubrieron la delección de dos pares de bases en la raíz de lechuga.

Asimismo, El-Ghor *et al.*, (2010) evaluaron durante cuatro semanas en ratas los efectos de la exposición oral aguda (8.8 mg/kg BW, 1/10 LD50) y subcrónica (2.93 mg/kg BW, 1/30 LD50) a cloruro de cadmio (CdCl₂) en tres loci (D6mit3, D9mit2 y D15Mgh1) que se localizan en tres sitios frágiles distintos del genoma de rata (6q21, 9q32-q33 y 15p14 respectivamente). La dosis aguda no produjo inestabilidad en el microsatélite para ninguno de los tres loci. No obstante, la dosis subcrónica mostro inestabilidad en los microsatélites por pérdida de 2 a 3 pares de bases o por adición de 3-6 pares de bases.

De igual manera, Oliveira *et al.*, (2012) sometieron a ratones machos de dos meses de edad a una inyección subcutánea de 1, 2 o 3 mg/kg CdCl₂ y fueron sacrificados 35 días después. Las dosis de 2 y 3 mg/kg disminuyeron el peso de los testículos y causó cambios histopatológicos severos (pérdida de la estructura testicular y necrosis), mientras que los ratones expuestos a 1 mg/kg mostraron inestabilidad en los microsatélites de los testículos.

Entretanto, Du *et al.*, (2013) inyectaron dosis de 0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/kg de CdCl₂ en ratones de seis semanas de edad. Los autores encontraron inestabilidad en los microsatélites en tres loci (D15Mit5, D10Mit266, y DxMit172) en el riñón y leucocitos de ratones expuestos a 0.25 y 0.5 mg/kg de CdCl₂.

Igualmente, Rodríguez *et al.*, (2013) trataron plántulas de *Pisum sativum* a una dosis de 2000 mg L⁻¹ de Pb²⁺ durante 28 días y evaluaron la inestabilidad de ocho microsatélites (SSR1-SSR8) en raíces y hojas. Los investigadores no encontraron inestabilidad en ninguno de los ocho microsatélites evaluados en las hojas. Sin embargo, descubrieron que la inestabilidad del microsatélite SSR6 fue tres veces mayor en las raíces expuestas a altas concentraciones de Pb en contraste con los testigo.

Por otra parte, Correia *et al.*, (2014) estimaron el efecto genotóxico del Al a través de 10 microsatélites en raíces y hojas de dos especies de plantago: *Plantago almogravensis* y *Plantago lagopus*. Los resultados obtenidos en ambas especies expuestas a Al revelaron daño genético, mientras que en el testigo no se presentó daño.

Finalmente, Wang *et al.*, (2016) trataron brotes de Arabidopsis a una dosis de 8.0 mg L⁻¹ de Cd y observaron inestabilidad en los microsatélites BSAT1.001 y BSAT2.012 de 2-3 pares de bases.

Lo anterior muestra que, los microsatélites son utilizados para estimar el daño genético. Por lo que en la presente tesis será utilizado como un biomarcador de efecto temprano.

Asimismo, con la finalidad de realizar un estudio más completo, sobre el efecto de los metales pesados en los organismos, se emplearán métodos de morfometría geométrica para estimar la variación en el cráneo.

10. Morfometría geométrica

Distintos procesos como enfermedades, desarrollo ontogenético, adaptaciones, fragmentación del hábitat, contaminación con MP, entre otros, generan diferencias en el tamaño y la forma entre individuos (Zelditch *et al.*, 2004; Coda *et al.*, 2016). Es por ello, que analizar los cambios (tamaño/forma) en la estructura de interés permite entender la causa de la variación morfológica (Zelditch *et al.*, 2004). Para un análisis sistemático y preciso de la forma se sugiere elegir un carácter altamente conservado

en la especie, como es el caso del cráneo o la mandíbula y evitar caracteres con plasticidad fenotípica.

En un principio, el estudio de la forma y el tamaño de las estructuras óseas se llevó a cabo utilizando métodos de morfometría tradicional, la cual, permitió evaluar de manera cuantitativa la variación morfológica y a su vez identificar diferencias intra e interespecíficas (Blackith, 1965; Zelditch *et al.*, 2004). Sin embargo, como los datos empleados para los análisis eran medidas de longitud, profundidad y ancho que proporcionaban escasa información sobre la forma, las limitaciones de esta técnica se hicieron evidentes. Además, la información obtenida era incompleta y redundante porque las variables de tamaño y forma no se podían dissociar (Mutanen y Pretorius, 2007; Mitteroecker *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2011).

Por dicha razón, surgió la morfometría geométrica, cuya ventaja principal es que las variables del tamaño y la forma pueden ser analizadas de manera independiente. Además, es capaz de analizar formas que presentan contornos, los cuales, bajo otras condiciones, no podrían ser analizadas (Richtsmeier *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010). Asimismo, los resultados pueden ser interpretados de manera más objetiva en las gradillas de deformación, donde las modificaciones que han experimentado las estructuras óseas se aprecian claramente (Rohlf y Marcus, 1993; Adams *et al.*, 2004; Slice, 2007; Mutanen y Pretorius, 2007; Mitteroecker y Gunz, 2009). Finalmente, el análisis de los datos a través de estadística multivariada permite evaluar e interpretar simultáneamente diversas variables, lo que permite obtener la forma de la estructura sin perder información durante el proceso estadístico (Toro *et al.*, 2010).

Por otra parte, dado que los métodos morfométricos tienen sus limitantes al abordar la presencia de asimetría, se desarrolló una alternativa metodológica denominada fluctuación asimétrica que permitiera bajo dos sencillos supuestos estimar la presencia o ausencia de asimetría: tipo de simetría que presenta el carácter y la elección del método de evaluación (simetría de objeto o simetría pareada) (Klingenberg, 2015).

11. Fluctuación asimétrica como biomarcador de dosis biológica efectiva que explica la inestabilidad en el desarrollo del cráneo los organismos

La fluctuación asimétrica (FA) es una desviación pequeña y azarosa de un rasgo perfecto de simetría bilateral (Coda, 2016). Se considera que la FA es el reflejo de la eficiencia de los mecanismos que controlan la estabilidad del desarrollo en los organismos, cuya habilidad es amortiguar los disturbios genéticos y ambientales durante el desarrollo (Nunes, 2001).

Se ha documentado que la inestabilidad en el desarrollo (ID: incapacidad del individuo de producir un fenotipo consistente en un ambiente) aumenta ante el estrés ambiental. Específicamente cuando los mecanismos que mantienen el desarrollo simétrico fallan en contrarrestar el aumento del número de pequeños errores al azar (Palmer y Strobeck, 1997; Beasley *et al.*, 2013; Sánchez-Chardi *et al.*, 2013). Estos errores son difíciles de apreciar directamente en el rasgo, pero pueden ser estimados por el aumento de la varianza en la asimetría de caracteres bilaterales a través de las poblaciones.

Estadísticamente la FA puede ser estimada como la varianza de una distribución de las diferencias entre el lado derecho e izquierdo entre individuos, por tanto la FA puede proveer un estimado de la ID. Puesto que los dos lados de simetría bilateral de los organismos están determinados por el mismo genotipo fundamental y por lo tanto debe ser idéntico en el mismo ambiente. Mientras la mayoría de la FA dentro de las poblaciones aparentemente tiene un origen ambiental, la asimetría direccional (AD: es la tendencia de un rasgo de ser consistentemente desarrollado de diferente manera en el lado derecho e izquierdo) y la antisimetría (AA: es un patrón de asimetría donde la mayoría de los individuos son asimétricos, pero difieren en la dirección de la asimetría) son probablemente más dependientes a los cambios individuales del genotipo (Palmer y Strobeck, 1997; Klingenberg, 2015).

En comparación, los componentes genéticos influyen menos en el fenotipo de los organismos en contraste con los componentes ambientales que ejercen un efecto mayor sobre el mismo. Por ello la FA ha sido usada extensivamente como una medida de inestabilidad del desarrollo. Es importante recalcar que organismos bajo

condiciones de estrés requieren más energía para realizar la misma función que un organismo no estresado, ya que invierten mayor energía para reparar el daño causado por el estrés en sus cuerpos, así como la energía gastada mientras funcionan en ambientes estresantes (Oleksy *et al.*, 2004). Las ventajas principales de utilizar la FA como un biomarcador son:

- Es una técnica no invasiva (cuando no requiere de la remoción de tejidos o de la muerte del ejemplar) o invasiva cuando se eligen caracteres como el cráneo o mandíbula (Beasley *et al.*, 2013).
- De bajo costo comparada con otros biomarcadores (Beasley *et al.*, 2013).

Los estudios que han utilizado FA como biomarcador para evaluar la inestabilidad en el desarrollo son los siguientes:

Nunes *et al.* (2001) evaluaron la inestabilidad en el desarrollo a través de FA utilizando los tres molares inferiores del roedor *Mus spretus* que habita áreas contaminadas con MP (Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Se). Los autores concluyen que el tamaño de los dientes de los animales en áreas contaminadas es menor con respecto a los del sitio testigo.

Por su parte, Oleksyk *et al.* (2004) estimaron la fluctuación asimétrica en el cráneo del roedor *Apodemus flavicollis* que vive en bosques de Chernóbil contaminados con radioactividad. Los autores encontraron que las poblaciones de roedores que viven a 10 km del reactor nuclear tienen niveles mayores de fluctuación asimétrica. Mientras los roedores que habitan a 30km de distancia del reactor tienen valores intermedios de FA.

Asimismo, Kurbalija *et al.* (2010) analizaron la inestabilidad del desarrollo en las alas de machos y hembras de *Drosophila subobscura* a través de FA. Las moscas estuvieron expuestas a dos concentraciones (10 µg/ml y 100 µg/ml) de acetato de plomo (Pb (CH₃COO)₂·3H₂O) durante siete generaciones. Los resultados mostraron que las moscas de ambos sexos criadas con altas concentraciones de Pb mantuvieron la homeostasis en el desarrollo durante varias generaciones a excepción de los machos de la F7 que exhibieron un aumento en la FA. Asimismo,

también encontraron una variabilidad en la FA y una diferencia significativa entre los grupos con altas concentraciones de Pb, bajas concentraciones de Pb y el testigo. Los autores concluyeron que la FA aumenta con la exposición a metales como el Pb.

De igual manera, fue determinado que el uso de pesticidas en la agricultura causa inestabilidad en el desarrollo de las patas traseras de roedores con hábitos alimenticios especialistas (*Akodon azarae*), más no en los roedores generalistas (*Calomys musculinus* y *Calomys laucha*) (Coda *et al.*, 2013).

Por otro lado, Sánchez-Chardi *et al.* (2013) evaluaron la fluctuación asimétrica en la mandíbula de poblaciones silvestres de musarañas de dientes blancos (*Crocidura russula*) que viven en áreas contaminadas con MP (Pb, Hg, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr, Mo, Sr, Ba, B, Cd). Los autores encontraron que las musarañas que habitan sitios contaminados presentan mayor fluctuación asimétrica en la forma de la mandíbula en comparación con las del sitio testigo. Así mismo, fue detectado que la inestabilidad en el desarrollo aumenta como resultado de la exposición a múltiples contaminantes.

Igualmente, Lazic *et al.* (2014) evaluaron la inestabilidad en el desarrollo de la forma de la cabeza del lagarto de pared (*Podarcis muralis*) que viven en zonas urbanas contaminadas con altos niveles de MP, benceno e hidrocarburos aromáticos policíclicos a través de FA. Los resultados mostraron que las poblaciones urbanas tienen mayor variación en la forma de la cabeza en comparación con las poblaciones rurales.

Por último, Padró *et al.* (2014) mostraron que los alcaloides que utiliza el cactus columnar *Trichocereus terscheckii* como mecanismo de defensa ante la herbívora de las larvas de *Drosophila buzzatii*, genera en las moscas disrupción en los patrones de venación normal de las alas y efectos en la viabilidad, tamaño y fluctuación asimétrica de las alas.

12. Especies centinelas para biomonitoreo de contaminación ambiental por metales

Las especies centinelas pueden ser utilizados para evaluar el impacto de la exposición a un contaminante y los efectos en la salud ambiental basados en la sensibilidad de las especies de retener contaminantes en sus tejidos (Lower y Kendall, 1990). De acuerdo con el National Research Council (NCR, 1991), las características que deben cumplir los organismos de una especie para ser considerada como especie centinela son:

- a) fácil captura.
- b) que viva en contacto directo o indirecto con la fuente de contaminación.
- c) que se encuentren tanto en sitios contaminados como no contaminados.
- d) ciclo de vida corto.
- e) que sean capaces de acumular altas concentraciones del contaminante en el tejido o experimentar cambios fisiológicos o del comportamiento como respuesta al contaminante.
- f) Tasa de reproducción alta.

En la actualidad existen diversas especies centinelas que contemplan organismos como aves, peces, nematodos, plantas, mascotas (perros/gatos) y mamíferos pequeños. Dichas especies son altamente sensibles a la contaminación por MP y responden a éstos alterando su fisiología, morfología o comportamiento (Lower y Kendall, 1990; Mancera-Rodríguez, 2006; Reif, 2011; Mussali-Galante *et al.*, 2013; González, 2015).

Los mamíferos pequeños, especialmente los roedores, constituyen una buena opción como especies centinelas en sitios contaminados por MP porque se encuentran fuertemente asociados a su hábitat, ocupan una gran variedad de nichos, influyen en la comunidad de plantas e insectos al realizar un consumo selectivo de éstos, acumulan los MP biodisponibles principalmente a través de la dieta y además al ser intermediarios en la cadena trófica, cuando estos son

consumidos por sus depredadores se genera la biomagnificación del metal (Talmage y Walton, 1991; Levengood y Heske, 2008; Tapia-Ramírez, 2015).

13. Roedores del género *Peromyscus* como organismos modelo

El género *Peromyscus* incluye más especies que cualquier otro género de mamíferos en norte américa y es considerado como un sistema modelo porque se conoce su biología en el laboratorio. Además, se conoce la diversidad genética del género *Peromyscus* (Bedford y Hoekstra, 2015). Esto ha permitido que varias disciplinas como la biomédica, fisiología, biología reproductiva, ecología, neurobiología, entre otras, lo hayan utilizado exitosamente y “la *Drosophila* de la mastozoología norte americana” (Dewey y Dawson, 2001). Indudablemente, el hecho de que se compare a *Peromyscus* con un sistema modelo tan eficiente y relevante como lo es *Drosophila*, refleja los alcances que pueden lograrse si se emplea como sistema de estudio. Por eso en el presente trabajo fue utilizada la especie *Peromyscus melanophrys*, además de que es una especie que habita los sitios de estudio.

14. Sitio de estudio: Huautla, Morelos

En el estado de Morelos la explotación de minería metálica se concentró en el municipio de Tlaquiltenango, específicamente en la localidad de Huautla. Durante los siglos XVIII, XIX y hasta la década de los 50 en esta región se explotaron de manera ininterrumpida seis minas de Ag, Pb y Zn (Velasco *et al.*, 2004). En la actualidad las minas se encuentran cerradas y se ubican dentro de un área natural protegida decretada como “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla” desde el año 1999 (INEGI, 2004). Dicha reserva protege cerca de 59,000 hectáreas de selva baja caducifolia (INEGI, 2002).

La actividad minera que se llevó a cabo durante el periodo antes mencionado trajo consigo la generación aproximada 780,000 toneladas de residuos mineros de Pb,

Mn y Cd que no han sido tratados de acuerdo con las normas, lo que genera un foco de contaminación permanente (Volke *et al.*, 2005).

Existen tres jales en la zona, el jal 1, el jal 2 y el jal 3. Todos los jales se encuentran a la intemperie y al borde del “arroyo Chico”, el cual converge con los arroyos Ajuchitlán, Salitre y Atlipa, para formar el arroyo grande el cual desemboca en el río Amacuzac, por lo que la dispersión de estos metales se extiende a otras regiones a través de los cuerpos de agua (SEMARNAT, 2005).

Un estudio reciente realizado por Solís (2016) determinó que el pH de los jales uno y dos en los tres niveles en los que se tomaron las muestras (base, media y superficie) es ligeramente alcalino. Asimismo, de manera general se encontró que la mayor concentración de metales (Fe, Zn, Pb, Cu) se presentó en la base de ambos jales. Por otra parte, también fue encontrado que las concentraciones de Fe son superiores a las de los otros metales evaluados y que las mayores concentraciones de Cu se encontraron en la superficie del jal 2.

II. ANTECEDENTES DEL SITIO DE ESTUDIO

Acorde con los párrafos anteriores, la problemática en Huautla es particularmente alarmante por la cantidad y tipo de MP contenidos en los jales que se encuentran biodisponibles o potencialmente biodisponibles.

Estudios realizados en la localidad, demuestran que los MP que encuentran biodisponibles en el suelo y se han bioacumulado en distintos tejidos de plantas y animales (roedores). Además, se ha relacionado el consumo de agua de bebida contaminada con (As), con el daño genético en los pobladores de la región. A continuación, se muestran los estudios que se han llevado a cabo en la localidad para evaluar los efectos que provocan los MP (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios realizados en la localidad de Huautla, Morelos, municipio de Tlaquiltenango en zonas contaminadas con metales pesados por la disposición de jales a la intemperie.

Autor	Estudio realizado en	Sitio de estudio	Metales y tejido	Técnica	Resultados
Martínez, 2009.	* <i>Peromyscus levipes</i> . *Estructura de la comunidad vegetal.	Expuesto: Jales de la mina pájaro verde. Control: Ajuchitlán.	Linfocitos en sangre periférica.	Ensayo cometa.	*Los roedores del sitio expuesto presentaron mayor daño genético en comparación con los testigos. *Se presentó un efecto sobre el género, siendo las hembras las que presentaron mayor daño genético. *El sitio testigo presentó valores mayores de riqueza de herbáceas, arbustos y árboles.
Cervantes, 2010.	* <i>Baiomys musculus</i> .	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán.	As, Be, Cd, Ni, Pb y V en linfocitos de sangre periférica.	Ensayo cometa.	*Los individuos del sitio expuesto presentaron mayor daño en el ADN en contraste con los testigos. *Se presentó un efecto del género, siendo las hembras quienes presentaron un daño mayor en comparación con los machos.
Tovar-Sánchez et al., 2012.	* <i>Peromyscus melanophrys</i> * <i>Baiomys musculus</i>	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán, Quilamula.	Zn, Ni, Fe y Mn en hígado y hueso.	Ensayo cometa.	*Las hembras de <i>Baiomys musculus</i> presentaron mayor daño al ADN en el sitio expuesto que las hembras de <i>Peromyscus melanophrys</i> . *Se presentó un efecto sobre el género, siendo las hembras de <i>Baiomys musculus</i> las que presentaron mayor daño en comparación con los machos de la misma especie. *Aunado a lo anterior, se propuso a <i>Baiomys musculus</i> como una especie centinela.
Mussali-Galante et al., 2013.	* <i>Peromyscus melanophrys</i>	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán, Quilamula.	Al, Pb, Cu, As, Cd, Hg, Ni en Hígado	Microsatélites.	*Existe un gradiente de bioacumulación de MP en los sitios expuestos, siendo de este modo el jale 3 el más contaminado y el jale 1 el menos contaminado. *La densidad de <i>Peromyscus melanophrys</i> disminuye en la zona más contaminada. *La tasa de migración en poblaciones expuestas es menor en comparación con los sitios testigo.

Pb=plomo, Cu=cobre, Zn=zinc, Cd=cadmio, As=arsénico, Be=berilio, Ni=níquel, V=vanadio, Fe=hierro, Mn=manganeso, Hg=mercurio.

Continuación Tabla 1.

Autor	Estudio realizado en	Sitio de estudio	Metales y tejido	Técnica	Resultados
Hernández, 2015.	* <i>Prosopis laevigata</i>	Expuesto: Jales de la mina pájaro verde. Control: Ajuchitlán.	Pb, Cu y Zn en hojas	Digestión ácida.	*Bioacumulación de Pb y Cu en tejido foliar en <i>Prosopis laevigata</i> en los sitios expuestos respecto a la concentración de metales en suelo, asimismo noto que la concentración de Cu y Pb aumentaron en el tejido foliar en comparación con las concentraciones del suelo.
González, 2015.	*Comunidad de artrópodos	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán.	Cu, Pb, Zn y As	_____	*Los sitios de estudio alejados del jale presentan mayor riqueza y abundancia de especies de artrópodos asociados a la vegetación.
Castañeda, 2016.	* <i>Pithecellobium dulce</i> . *Suelo.	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán, Quilamula.	Cu, Pb y Zn en tejido foliar.	Ensayo cometa. Espectrofotometría de absorción atómica.	*Los jales tienen 22 veces más Cu, 27 veces más Pb y 32 veces más Zn en comparación con los sitios testigo. *Los individuos establecidos en los jales acumulan mayor cantidad de metales pesados (Pb>Zn>Cu).
Santoyo, 2016.	* <i>Acacia farnesiana</i>	Expuesto: Jales de Huautla. Control: Ajuchitlán, Quilamula.	Pb, Cu y Zn en hojas.	Ensayo cometa	*Los individuos de <i>Acacia farnesiana</i> presentaron mayor daño genético en el jale 2. *Los individuos establecidos en los jales presentaron un daño genético mayor en comparación con los individuos establecidos en los sitios testigos.
Tovar-Sánchez et al., 2016	*Humanos	Expuesto: Poblado de Huautla. Control: Ajuchitlán.	Pb, Cu, Zn, Cd y As en linfocitos en sangre periférica.	Aberraciones cromosómicas	*El As en el agua de bebida de la mina y del tanque de almacenamiento sobrepasa los límites máximos permitidos por normas mexicanas e internacionales. *Los individuos de la población expuesta presentan concentraciones elevadas en sangre periférica. *Se encontró una correlación entre la concentración de As y la presencia de aberraciones cromosómicas.

Pb=plomo, Cu=cobre, Zn=zinc, Cd=cadmio, As=arsénico, Be=berilio, Ni=níquel, V=vanadio, Fe=hierro, Mn=manganeso, Hg=mercurio.

El roedor de la especie *Peromyscus melanophrys* es el más abundante en la localidad de Tlaquiltenango, Morelos (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Por lo tanto, juega un papel ecológico importante, debido a que se encuentra fuertemente asociado a su hábitat y altera la comunidad vegetal al ser el principal removedor y dispersor de semillas (Hortelano-Moncada, 2015). Además, ha sido considerado en estudios previos como una especie centinela para la evaluación de estudios ecotoxicológicos en jales de la región (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

De acuerdo con Tovar-Sánchez *et al.* (2012) la concentración de metales en hueso e hígado en *Peromyscus melanophrys* fue mayor en el sitio expuesto a MP que en el sitio testigo (Tabla 2). Además, se presentó un efecto de género, esto es, las hembras mostraron mayor daño al ADN en comparación con los machos.

Tabla 2. Concentración de metales en hueso e hígado en machos de la especie *Peromyscus melanophrys* (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).

Sitio	n	Hueso			
		Zn	Ni	Fe	Mn
Expuesto (jales de Huautla)	5	96.37±29.41	43.18±6.19	36.28±6.06	1.87±1.40
Control (Ajuchitlán)	5	60.52±4.29	12.92±5.59	23.26±10.95	1.92±1.01
Hígado					
Expuesto (jales de Huautla)	5	33.44±5.44	1.10±0.27	112.30±19.87	0.63±0.31
Control (Ajuchitlán)	5	19.90±4.16	0.99±0.17	46.87±4.89	0.50±0.09

Promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$) \pm D.E Zinc=Zn, Níquel=Ni, Hierro=Fe, Manganese=Mn.

En otro estudio se encontró que las concentraciones de metales en hígado de *Peromyscus melanophrys* son mayores en los sitios expuestos que en los sitios testigo (Tabla 3). Además, se encontró una disminución en la densidad de los individuos que habitan el sitio más contaminado (jal 3) y la pérdida de la diversidad genética en las poblaciones expuestas (Mussali-Galante *et al.*, 2013).

Tabla 3. Concentración de metales en hígado en machos de la especie *Peromyscus melanophrys* (Mussali-Galante *et al.*, 2013).

Sitio	n	Al	Pb	Cu	As	Cd
Ajuchitlán	5	23.2±3.6	0.9±0.2	6.8±1.1	0.1±0.1	0.1±0.1
Quilamula	5	22.4±5.6	0.8±0.3	7.1±2.0	0.2±0.1	0.1±0.1
Jale1	5	35.6±11.2	3.3±0.6	11.6±0.4	0.5±0.1	1.1±0.2
Jale2	5	42.9±19.6	11.9±5.4	16.1±3.2	0.7±0.2	5.4±1.9
Jale3	5	46.8±21.5	24.3±7.9	19.1±5.8	1.3±0.5	7.1±2.2

Promedio ($\mu\text{g g}^{-1}$) \pm D.E. Al=aluminio, Pb=plomo, Cu=cobre, As=arsénico, Cd=cadmio.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la problemática ambiental que generan los residuos mineros a lo largo de todo el país, es necesario realizar estudios que integren y relacionen el daño genético y la inestabilidad en el desarrollo provocados por la exposición crónica a metales pesados en especies centinelas, para conocer de manera integral los efectos que provocan los metales pesados. Este tipo de estudios son especialmente importantes, ya que se pueden desarrollar nuevos biomarcadores en especies centinelas como los mamíferos pequeños que viven en ambientes contaminados.

IV. HIPÓTESIS

Dado que los metales pesados son considerados genotóxicos y se encuentran biodisponibles en los jales de Huautla, Morelos, entonces los individuos de *Peromyscus melanophrys* que viven en los jales presenten mayor daño genético en comparación con los individuos del sitio testigo.

Asimismo, los individuos expuestos a altas concentraciones de metales pesados presentaran inestabilidad en el desarrollo del cráneo en comparación con los individuos del sitio testigo.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño genético y la inestabilidad en el desarrollo del cráneo en individuos de *Peromyscus melanophrys* crónicamente expuestos a metales pesados asociados a jales en Huautla, Morelos.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el daño genético en hígado mediante microsátélites en individuos de *Peromyscus melanophrys* crónicamente expuestos a metales pesados y los testigos.
2. Evaluar la inestabilidad en el desarrollo del cráneo a través de fluctuación asimétrica en individuos de *Peromyscus melanophrys* expuestos crónicamente a metales pesados y en los testigos.
3. Establecer la relación entre la concentración de metales pesados y el daño genético en hígado de los individuos expuestos y de los testigos.

VII. METODOLOGÍA

Los sitios de estudio se localizan al suroeste del municipio de Tlaquiltenango, Morelos, lugar donde se encuentra el área natural protegida que lleva por nombre Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) (Dorado *et al.*, 2005).

15. Sitios expuestos

El primer sitio expuesto a MP corresponde al jal 1 que se ubica en las coordenadas 18° 25' 40.60" latitud norte y 99° 01' 57.82 latitud oeste. El segundo sitio expuesto corresponde al jal 2 se localiza 18° 26' 22.62 latitud norte y 99° 01' 57.71" latitud oeste y el jal 3 18°26'36.37" latitud norte y 99°01'26.71" latitud oeste. Finalmente, el

tercer sitio expuesto (jal 3) se ubica 18°26'36.37"N-99°01'26.71"O y se encuentra aproximadamente a 500 m del poblado de Huautla. En este jal se ha realizado el mayor número de estudios para evaluar el impacto de los metales pesados (Tabla 3).

Los contaminantes predominantes en el jal 3 son el Pb (2.298 mg/kg) y As (139 mg/kg) (Volke, *et al.*, 2005). Además, el jale 3 presenta un pH ligeramente alcalino en la base (8.07), parte media (8.08) y superficie (8.37), así como una capacidad de intercambio catiónico de 0.4 y un porcentaje de materia orgánica de 0.84 en la base, 0.92 en la parte media y 0.84 en la superficie (Solís, 2016). Los metales que se encuentran biodisponibles son Pb (45.2-78.3%), Cd (18.9-44.1%), Cu (72.9-%), Zn (4.2-18.9%), Mn (36.3-54.4%) y Fe (12.5-27.9%).

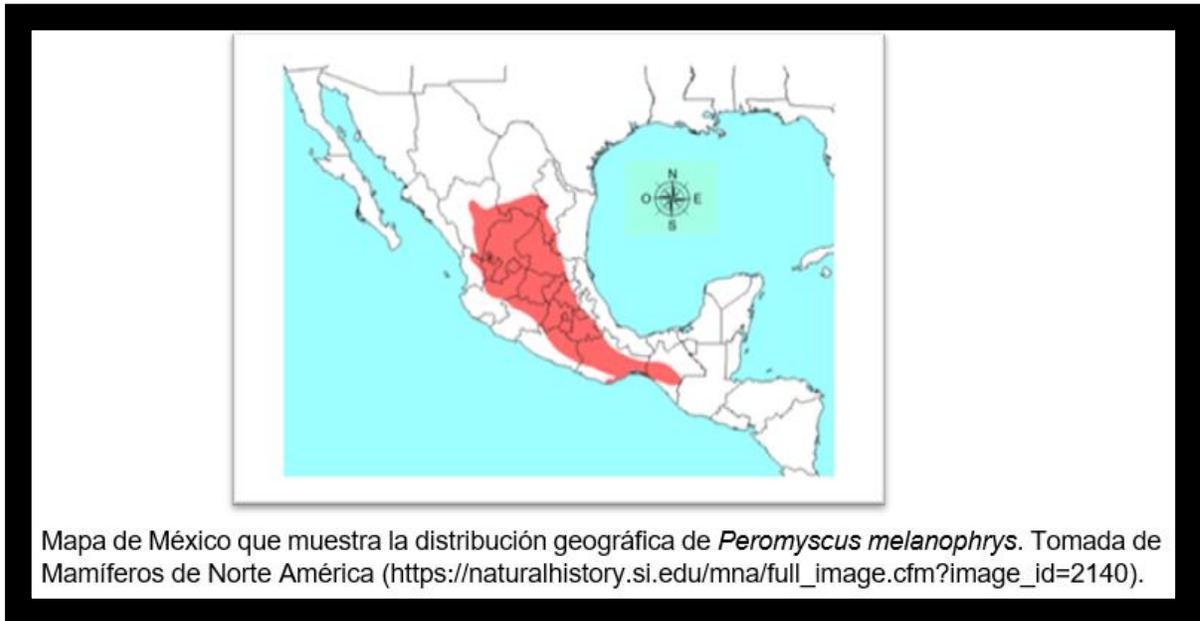
16. Sitio testigo

El sitio testigo presenta características geográficas y ecológicas similares a las del sitio expuesto a MP (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). Además, en el sitio testigo no hay registros de actividad minera que contaminen la zona de estudio. Adicionalmente, las corrientes de agua y la dirección de los vientos fluyen en dirección norte-sur (Morales y Carrillo, 2010). Por lo tanto, ni las corrientes de agua ni el viento tienen la capacidad de dispersar los contaminantes de las zonas mineras al sitio testigo. El sitio testigo se ubica en Ajuchitlán a 18°27' N-98°57' W.

17. Especie de estudio *Peromyscus melanophrys* (Hall, 1981)

El género *Peromyscus* es considerado como uno de los más diversos y complejos taxonómicamente, ya que presenta una extensa variación intra e interespecífica (Carleton, 1989). Dentro de este género se encuentra la especie de *Peromyscus melanophrys* también conocida como ratón de meseta, la cual, es endémica de México con una distribución geográfica que abarca desde Durango, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas hasta el estado de Chiapas (Figura 2) (Musser y Carleton,

2005). Para el caso de Morelos esta especie se distribuye en todo el estado y se encuentra en altitudes que van de los 1000 a los 2.600 m (Carleton *et al*, 1982).



Peromyscus melanophrys se caracteriza por ser una de las especies con mayor tamaño corporal dentro del género *Peromyscus*. Los individuos de esta especie presentan en la parte dorsal una coloración que varía entre los colores ocre, café y amarillo. Mientras que en la parte ventral exhiben un color beige (Ceballos, 2013; Figura 3). El cambio de coloración está asociado con el tipo de sustrato en el que viven (Baker, 1960). La cola es más larga en proporción con la cabeza y el cuerpo juntos, además está cubierta de pelo y termina con un mechón en la punta. Son semiarborícolas, de hábitos nocturnos y alternan entre una dieta basada en frutas y semillas. Los sucesos reproductivos ocurren entre los meses de febrero-marzo y junio-octubre. El tamaño promedio de la camada es de dos a cinco crías (Baker 1956; Matson y Backer, 1986).



Figura 3. *Peromyscus melanophrys*. A) vista dorsal, B) vista ventral.

18. Muestreo de *Peromyscus melanophrys*

Los individuos de *Peromyscus melanophrys* fueron colectados entre los meses de septiembre/octubre del año 2016 y 2017. En la colecta fueron capturados 20 individuos del sitio expuesto y 20 del sitio testigo.

Los roedores fueron capturados con trampas Sherman cebadas con una mezcla de crema de cacahuate, avena y vainilla. Un total de 132 trampas Sherman fueron colocadas, separadas por 5 metros de distancia entre ellas en cada sitio. Los individuos atrapados fueron identificados como la especie de interés de acuerdo con Hall (1981). Posteriormente los individuos fueron colocados en una cámara letal que contenía cloroformo. Después se identificó el sexo de los individuos, se obtuvo el peso corporal y las medidas morfométricas convencionales para evidenciar la salud del individuo. Posteriormente, el hígado y otros órganos (riñón, pulmón, páncreas, ovarios/testículos) fueron extraídos y conservados en nitrógeno líquido para su posterior estudio. Específicamente, el hígado será utilizado para evaluar el daño genético. Finalmente, el resto de los cuerpos fueron conservados en el congelador a -20 °C para el posterior análisis morfométrico.

19. Evaluación de daño genético a través de microsatélites

a) Extracción de ADN

La extracción de ADN del hígado de todos (40) individuos colectados, se realizó con ayuda del Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA). El procedimiento consistió en pesar 0.015 a 0.020 gr del tejido (hígado) por cada individuo, posteriormente dicha muestra fue colocada en un tubo Eppendorf estéril de 15 ml, al cual se le agregaron 600µl de “Nuclei lysis solution” frío y 20µl de “proteinasasa K”, una vez concluida esta parte, se dejaron incubando las muestras durante toda la noche en agitación a 57 °C.

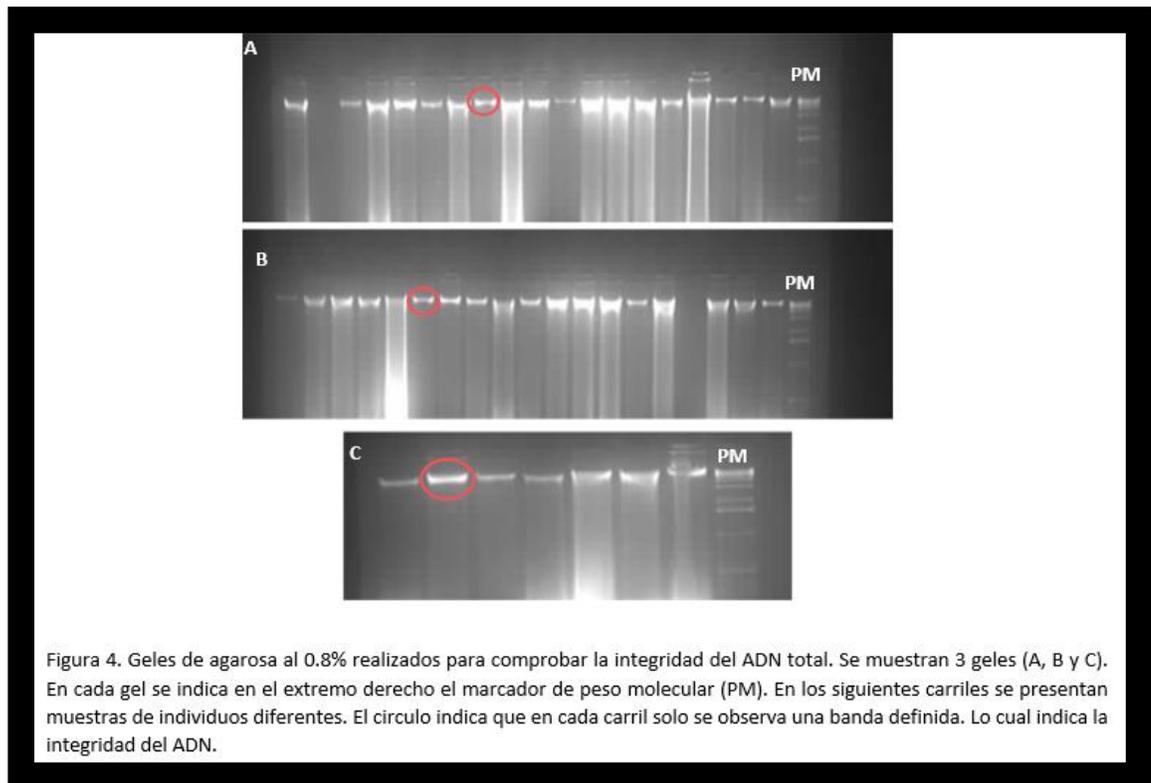
Al día siguiente, las muestras fueron removidas de la incubadora y se dejaron enfriar por 10 minutos a temperatura ambiente, después se agregaron 3 µl de RNAsa y se mezcló cada muestra invirtiendo el tubo, luego se incubaron las muestras por 30 minutos a 37°C y concluido este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 200µl de “protein precipit solution” a cada muestra y fueron puestas sobre el vortex por 20 segundos a alta velocidad, para después ser colocadas en hielo durante 5 minutos.

A continuación, las muestras fueron colocadas en una centrifuga por 4 minutos a 14000 g. Al finalizar el tiempo, se removió el sobrenadante y fue colocado en tubos que contenían 600µl de isopropanol. Después en se procedió a mezclar por inversión las muestras hasta que el ADN formó una masa visible y después se centrifugaron las muestras por un minuto a 14,000 g para obtener el precipitado que contenía el ADN.

Posteriormente el sobrenadante fue descartado y a cada tubo se le agregaron 600µl de etanol al 70% y se mezclaron las muestras por inversión con la finalidad de limpiar el ADN. Posteriormente se centrifugaron las muestras por 1 minuto a 14,000 g. Al concluir el tiempo, se extrajo el etanol cuidadosamente de cada tubo para evitar retirar el precipitado que contenía el ADN. Una vez concluida esta parte, se colocó cada tubo boca abajo sobre una sanita durante 15 minutos. Al terminar dicho tiempo, se voltearon los tubos y se les agregó 100µl de “ADN rehydratation solution”.

b) Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis

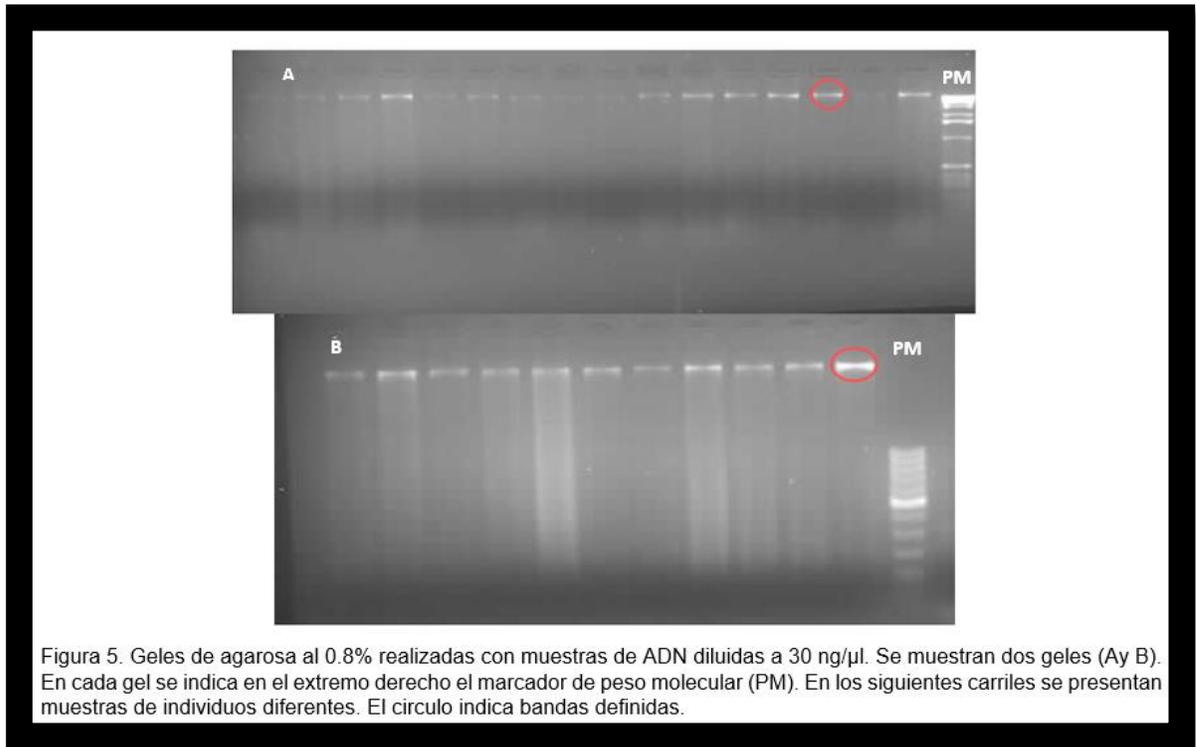
Para determinar la integridad del ADN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 150 V (volts) durante 35 minutos con buffer TAE 1X y 1.5 de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). También se utilizó un marcador de pares de bases (1kb de ADN ladder Invitrogen) para conocer el tamaño de los fragmentos de ADN. Los cuales fueron observados en un transiluminador de luz UV SYNGENE. En la figura 4, se muestran los geles realizados.



c) Cuantificación y dilución de ADN

Se estimó el rendimiento del ADN con un biofotómetro (V1.35, Eppendorf, Alemania). El cual permitió corroborar la pureza del ADN al tomar la proporción de absorbancia (260/280) en la cual se obtuvieron valores de 1.8 que indicaron la presencia de ADN puro (proporciones por debajo de este valor demuestran la presencia de proteínas). Posteriormente, se realizaron las diluciones correspondientes para cada muestra de ADN con agua ultra pura hasta obtener 30 ng/ μl que es la cantidad sugerida para llevar a cabo la técnica de microsatélites

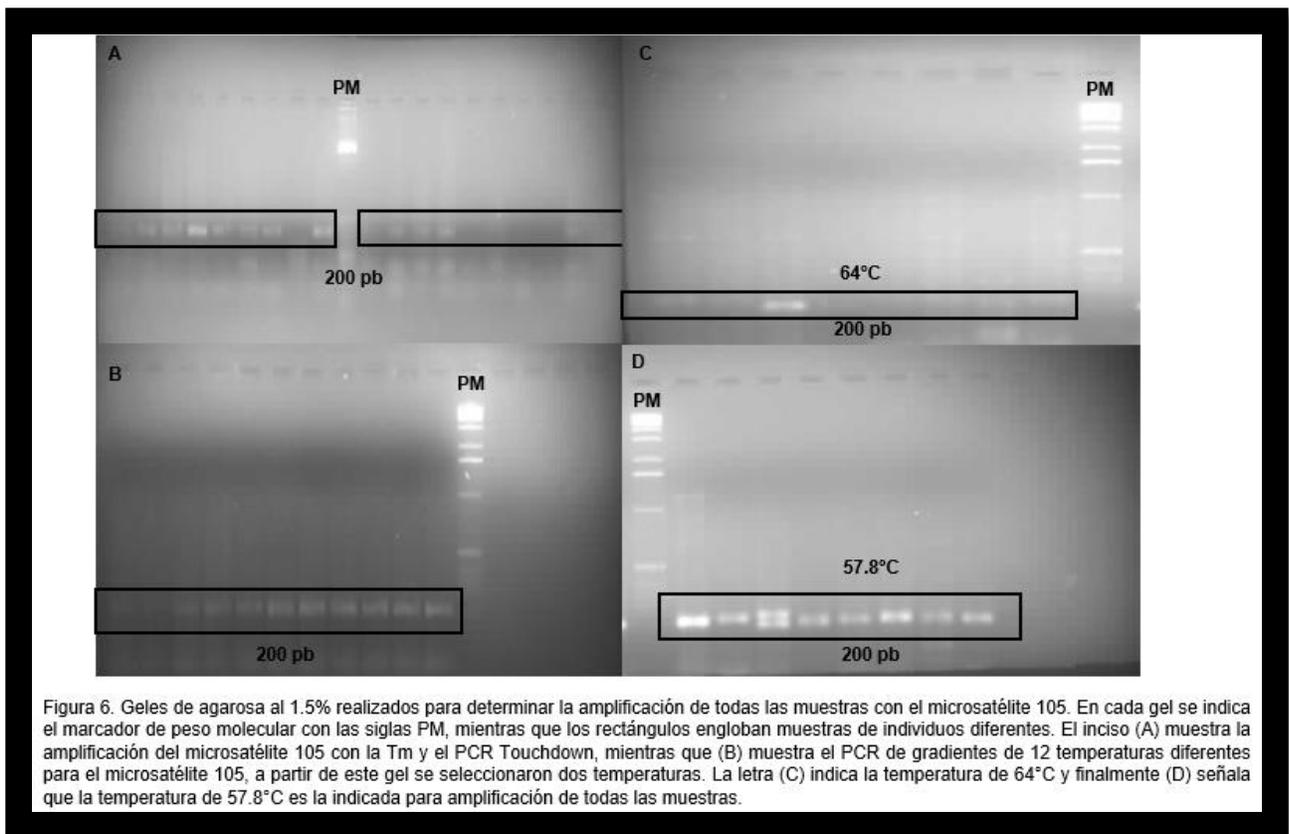
(Alejos, *et al.*, 2014). Una vez concluido este paso, se procedió a volver a cuantificar las muestras de ADN disueltas y se realizó otro gel de agarosa al 0.8% (Figura 5). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C . Hasta el momento, se han cuantificado y diluido el ADN de todos los individuos colectados.



d) Amplificación de microsatélites

Los microsatélites que se utilizaron para el análisis de daño genético se muestran en la Tabla 4. La amplificación de secuencias de microsatélites consistió en implementar la técnica conocida como PCR Touchdown en la cual se aumenta la especificidad y sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa al usar ciclos donde la temperatura de alineamiento inicial se encuentra por encima del T_m (temperatura a la cual los oligonucleótidos se unen al sitio que es complementario) del microsatélite. A continuación, la temperatura de alineamiento es gradualmente disminuida hasta alcanzar la temperatura de alineamiento calculada para los microsatélites usados (Korbie y Mattick, 2008). Adicionalmente, para conocer la temperatura óptima de alineación para cada microsatélite, se realizó un PCR de Gradientes de 12 temperaturas tomando como referencia la temperatura media de

alineación que fue 64.5°C y a partir de esta se elevó y bajo la temperatura 5°C. A continuación, se muestra un gel como ejemplo de los resultados obtenidos con cada una de las técnicas de PCR (Figura 6), el mismo procedimiento se realizó con todos los microsatélites. El tamaño del fragmento esperado se encontraba entre 143 y 258 pares de bases (pb). En la Tabla 4, se muestran las temperaturas de alineación específicas para cada uno de los microsatélites.



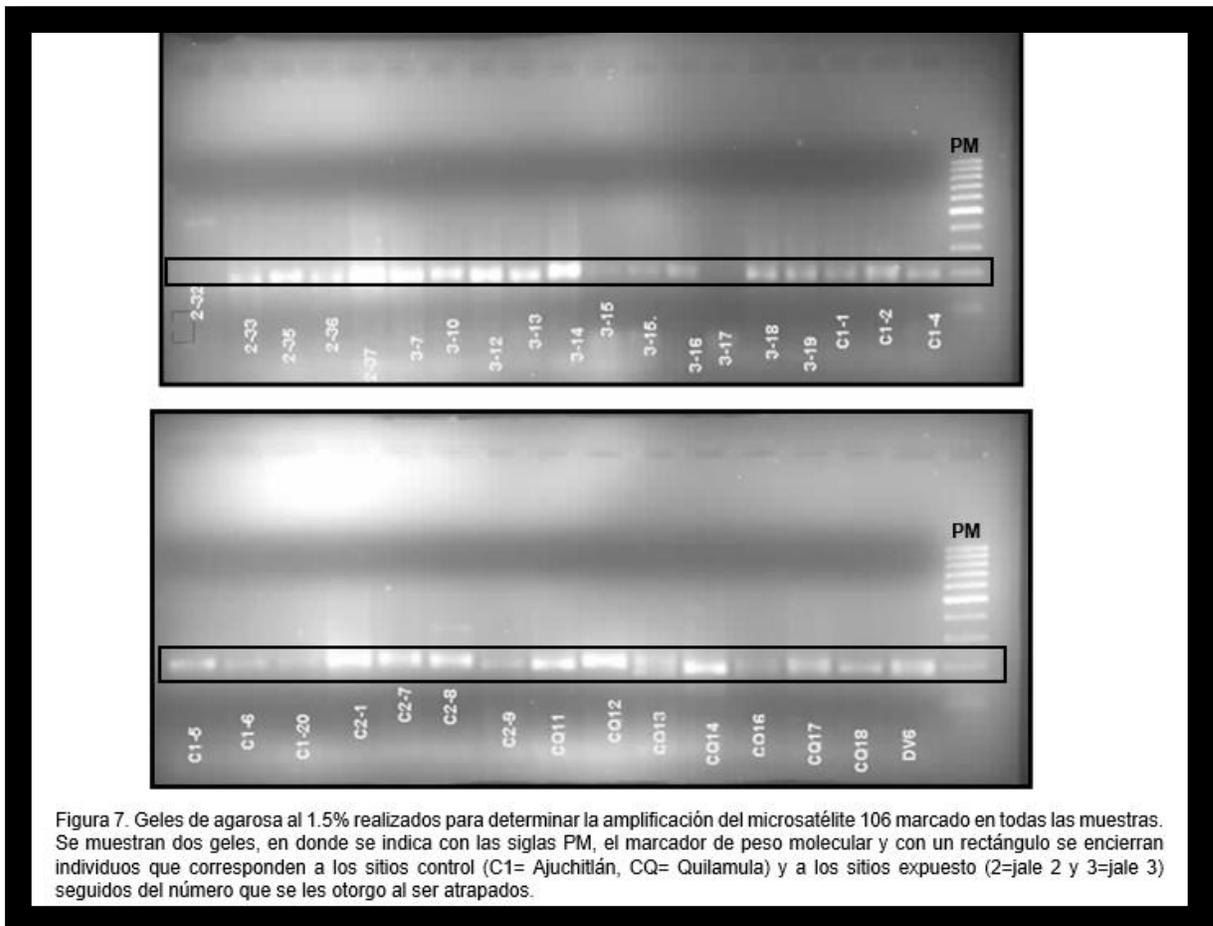
Una vez que se comprobó que todos los microsatélites amplificaban para la mayoría de las muestras, fueron marcados con un fluorocromo distinto, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de microsatélites de *Peromyscus maniculatus* (Chirhart *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2006). Se muestran las secuencias S (5' a 3') y A (3' a 5') de los ocho microsatélites que amplificaron en los individuos de *Peromyscus melanophrys* junto con su respectiva temperatura de amplificación y el fluoróforo con que fueron marcados.

Microsatélite	Secuencia	Temperatura de amplificación °C	Fluoróforo
103	S: GCCATTAGTCTATGTGACAG A: GCGATGTACCCAGAAAT	53	NED
104	S: CATAAGGTGGCTCGGAATCA A: CAGGAAGGGGAAATGACCAT	55	NED
105	S: CTGAGCCAAAAGTGGTCCTT A: TGAAGACAGCCCCTCTCTG	57.8	6FAM
106	S: CAGGGCTGTAGAGGGAGAAC A: ACTGGAGCAGAGGCATTTG	59.1	6FAM
107	S: GCCTCTTGACCCAGTGAAT A: TCCATTGGTGTACTTTTTG	53	HEX
109	S: GAATCCATACACCCATGC A: TTGCTTTTCGCAAGTTTT	59.1	NED
111	S: ACCCCCGAGTGCTGAGATT A: TTTGCTGCTTTCCCCAGAGA	61.4	6FAM
112	S: GCAGCCTGTATTCTCTCACA A: GCCAACCATTTCTCAAGTG	60.2	NED

e) Amplificación de microsatélites marcados

Se realizaron geles de agarosa al 1.5% con los microsatélites marcados para todas las muestras. En la (Figura 7), se muestra un gel representativo del procedimiento.



Los microsatélites que presentaron las siguientes características: 1) bandas claras, 2) polimorfismo y 3) amplificación de la mayoría de los individuos fueron enviados al secuenciador del laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología (UNAM) para conocer el tamaño exacto en pares de bases. Cabe mencionar que dichos microsatélites han sido desarrollados, utilizados y amplificados exitosamente para *Peromyscus melanophrys* (Chirhart *et al.*, 2000; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

Los datos proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología (UNAM), fueron analizados con el programa GeneMarker V2.7.0. El cual, permitió obtener el número de pares de bases por individuo correspondiente a cada

uno de los ocho microsatélites evaluados. Cabe indicar que el número de pares de bases fueron empleados para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

20. Tejido óseo y fluctuación asimétrica en el cráneo

f) Remoción de piel y limpieza de tejido óseo

El procedimiento consistió en retirar la piel de todos los cadáveres (40), amarrarlos con hilo cáñamo en posición fetal y colocarlos dentro de cada uno de los espacios de las tapas de huevo, mismas que se encontraban en el interior de una caja con tapa (la tapa tenía pequeños orificios) adicionalmente se agregaron larvas y adultos de del escarabajo de la especie *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) para remover del tejido de los huesos. Este proceso fue concluido después de dos meses. Posteriormente, para eliminar restos de tejido y el mal olor, fue necesario lavarlos con ayuda de un cepillo de dientes, agua y jabón, sin embargo, este lavado no fue suficiente, debido a que los huesos seguían presentando manchas, restos de tejido fuertemente adheridos y mal olor, por tanto, fue necesario sumergirlos en agua oxigenada por 4 horas. Lo que permitió la obtención de huesos totalmente limpios y libres de mal olor. No obstante, durante el proceso de limpieza algunos cráneos se rompieron y el número de muestra se redujo a (32). Finalmente, todos los huesos fueron depositados en recipientes de plástico previamente etiquetados.

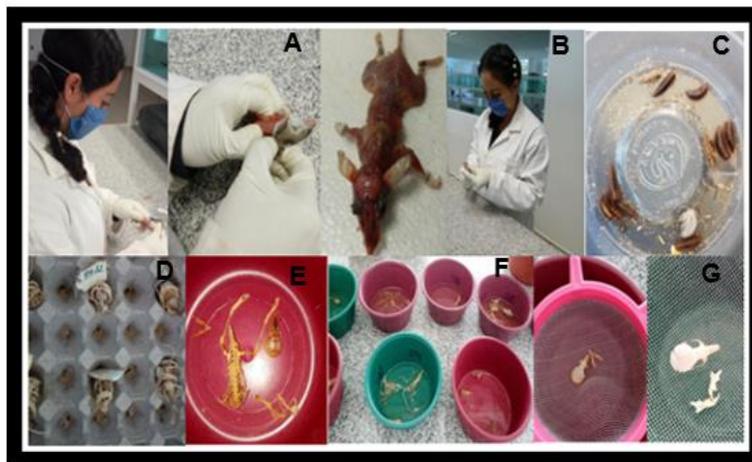


Figura 8. La obtención del cráneo de la especie *Peromyscus melanophrys* consistió en remover la piel de todos los individuos (A-B), amarrarlos con hilo cáñamo en posición fetal y colocarlos dentro de cada uno de los espacios de las tapas de huevo, mismas que se encontraban en el interior de una caja, adicionalmente se agregaron larvas y adultos de derméstidos (C-D). Posteriormente todos los huesos obtenidos fueron lavados y sumergidos en agua oxigenada (E-D) para la obtención de estructuras totalmente limpias y libres de malos olores (G).

g) Evaluación de la inestabilidad en el desarrollo del cráneo a través de fluctuación asimétrica

Cada cráneo, fue colocado en vista ventral sobre una base de plastilina y acompañado con una regla para establecer una escala comparativa entre cada fotografía, posteriormente fueron introducidos dentro del Photosimile 360 integrado a una cámara EOS T5I marca Canon. En total se tomaron 32 fotografías, de las cuales 17 corresponden al sitio testigo y 15 al sitio expuesto.

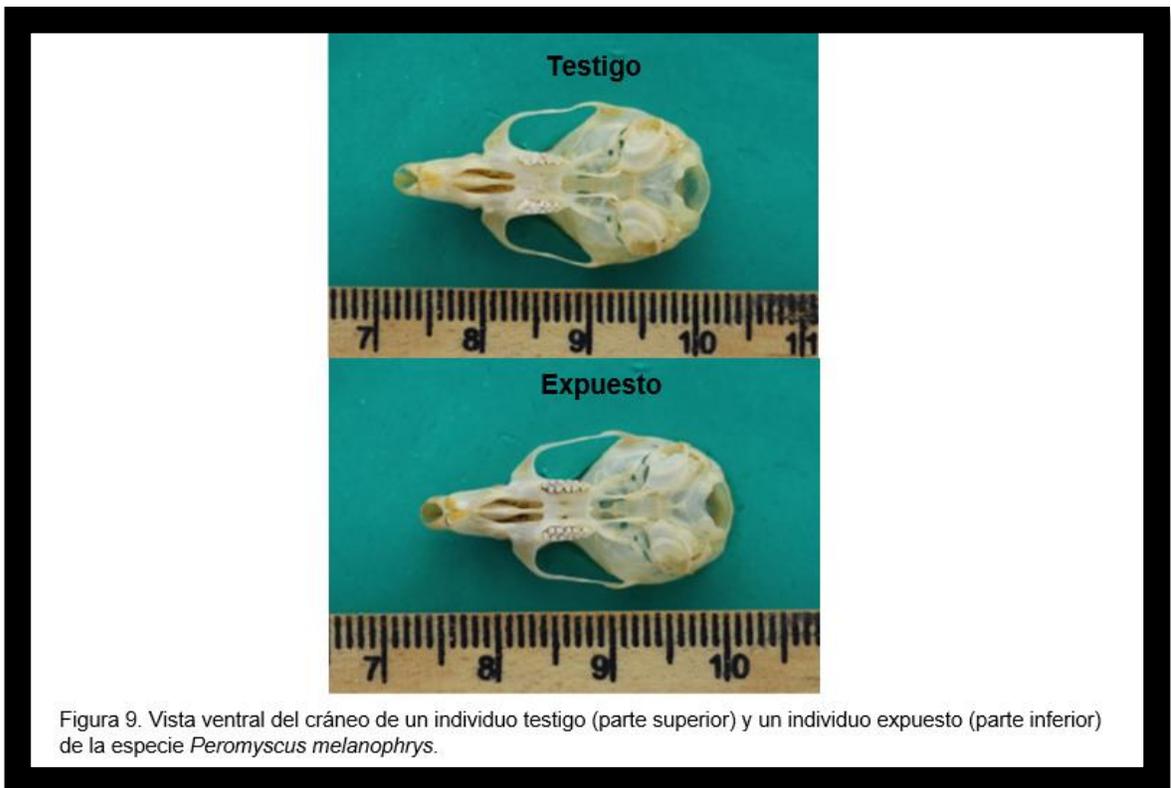


Figura 9. Vista ventral del cráneo de un individuo testigo (parte superior) y un individuo expuesto (parte inferior) de la especie *Peromyscus melanophrys*.

Se utilizó el programa tpsUtil 1.72 (F.J. Rohlf, <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>), para cargar las fotografías, posteriormente se digitalizaron diez pares de marcas (Tabla 5) a ambos lados de la estructura con ayuda del programa tpsDig 2.29 (F.J. Rohlf, <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) (Figura 9). La posición de cada marca fue elegida tomando como referencia trabajos previos (Oleksyk *et al.*, 2004, Vargas-Jaramillo, 2010; Mayares-Salvador, 2012) bajo el supuesto de que estas marcas son homólogas entre individuos (Zelditch, *et al.*, 2004). Para evitar el error de medición

se realizaron tres réplicas de cada fotografía, dando un total de 51 fotografías digitalizadas para el grupo testigo y 45 para el grupo expuesto.

Tabla 5. Nombre y número de las marcas digitalizadas en el lado ventral del cráneo de la especie *Peromyscus melanophrys*.

MARCAS EN EL CRÁNEO (VISTA VENTRAL)			
*Extremo anterior del nasal	*Extremo posterior del foramen magnum	1. Borde exterior del arco zigomático	2. Borde interior del escamoso
3. Bula timpánica	4. Saliente del basioccipital	5. Hueso posterior de la fosa mesopterigoidea	6. Hueso anterior de la fosa mesopterigoidea
7. Proceso pterigoideo externo	8. Unión entre el 1° molar y el 2° molar	9. Extremo posterior del foramen incisivo	10. Extremo anterior del foramen incisivo

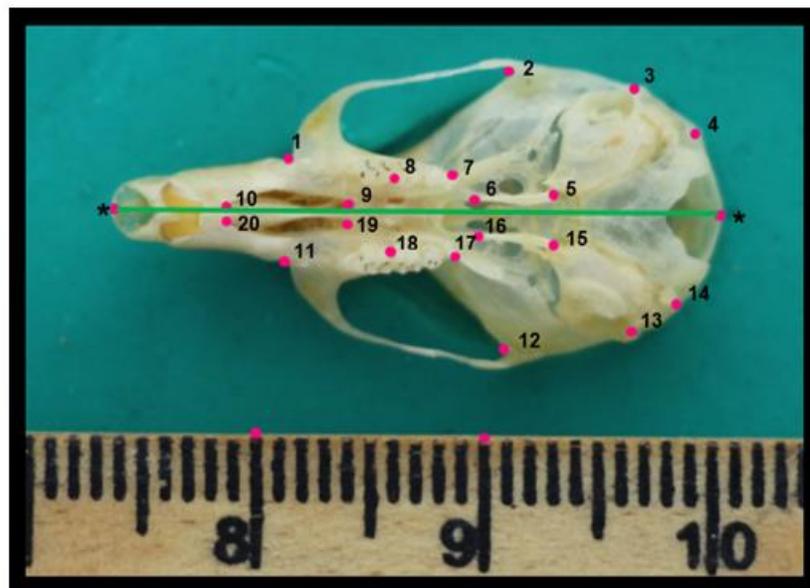


Figura 10. Representación visual de la posición de cada par de marcas respecto al eje de simetría a ambos lados del cráneo de la especie *Peromyscus melanophrys*. Los puntos acompañados de un asterisco son las marcas que permitieron establecer el eje de simetría que se muestra con una línea verde, mientras que los puntos que se encuentran sobre la regla establecieron una escala comparativa de un centímetro entre cada fotografía.

El formato tps resultante de la digitalización de las marcas para cada grupo (testigo/expuesto), junto con su respectivo protocolo de alineación fueron analizados por separado en el programa SAGUE (<http://www-personal.umich.edu/~emarquez/morph/>) en donde se realizó un ajuste de Procrustes para eliminar la información que no estaba asociada a la forma del cráneo (Richtsmeier *et al.*, 2002; Zelditch *et al.*, 2004). Las coordenadas Procrustes resultantes del ajuste de Procrustes del grupo testigo y expuesto, fueron empleadas para los análisis estadísticos correspondientes.

VIII. RESULTADOS

21. Daño genético

Inicialmente se realizó una prueba de normalidad de los resultados obtenidos (tamaños en pares de bases por individuo de los ocho microsatélites evaluados), el cual mostro que los datos presentan una distribución normal (Shapiro-Wilk $W=.94593$, $p=.0585$), seguido de ello, se hizo una prueba de t para muestras independientes con la finalidad de evaluar si existen diferencias estadísticas entre los promedios de las mutaciones puntuales del grupo testigo y el grupo expuesto. Los resultados indican que los individuos del grupo expuesto presentan mayor daño genético (inestabilidad en el microsatélite) en comparación con los individuos del grupo testigo ($t=2.309$, $df=38$, $p=0.03$) (Tabla 6).

Tabla 6. Valores promedio \pm error estándar del número de mutaciones puntuales entre el grupo expuesto y el grupo testigo mediante una prueba de T.

Mutaciones puntuales					
	Testigo	Expuesto	Valor de T	df	p
promedio	7.792	4.687	2.309	38	0.03
e.e	0.985	0.717			

22. Relación entre la concentración de metales pesados y el daño genético

Análisis de regresión lineal fueron utilizados para conocer la relación entre la concentración de los metales en hueso Zn, Ni, Cu, Fe y Mn el daño genético (mutaciones puntuales) (Figura 11, 12, 13, 14 y 15 respectivamente). Cabe mencionar que los datos de concentraciones de metales fueron obtenidos de (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012) y posteriormente se realizaron los análisis de regresión con los datos de daño genético obtenidos en la presente tesis. En el caso del Zn, Ni y Cu se muestra una relación significativa y positiva, en la cual, a mayor concentración del metal ($p < 0.05$) mayor es el daño genético encontrado. El decir, el coeficiente de determinación r^2 muestra que el Zn contribuye con 85% del daño genético observado, mientras que el Ni y Cu contribuyen con un 77%. Por otra parte, las concentraciones de Fe y Mn no mostraron relación con el daño genético.

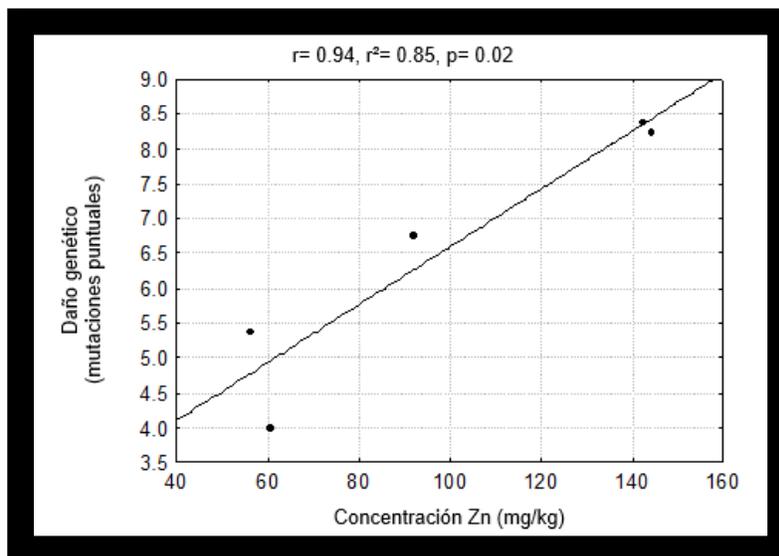


Figura 11. Análisis de regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Zn y el número de mutaciones puntuales en individuos de *Peromyscus melanophrys*. Se observa una relación significativa y positiva.

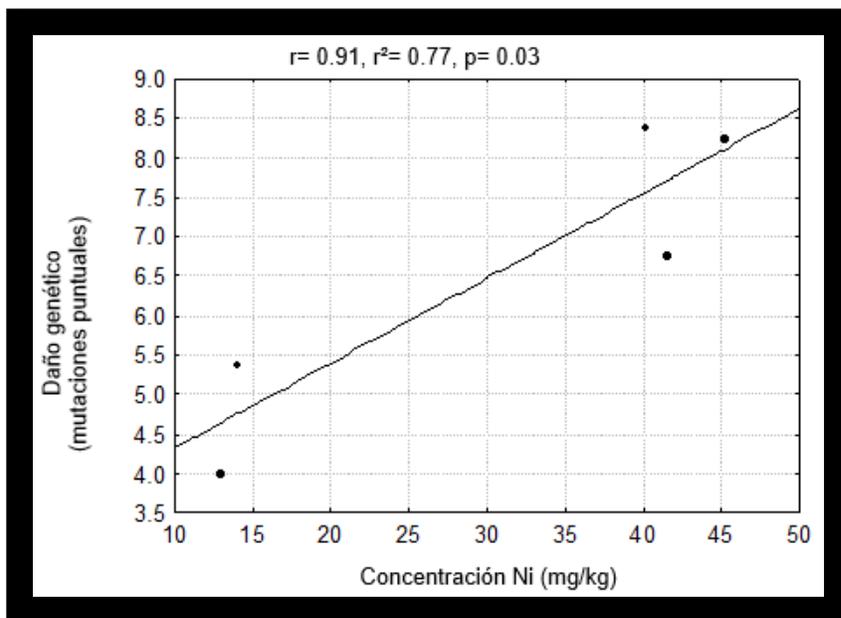


Figura 12. Análisis de regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Ni y el número de mutaciones puntuales en individuos de *Peromyscus melanophrys*. Se observa una relación significativa y positiva.

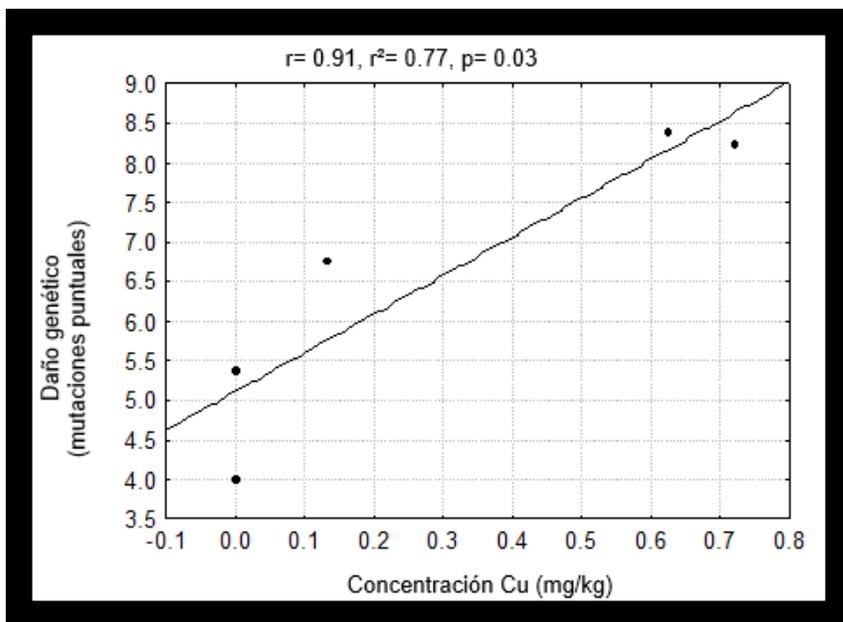


Figura 13. Análisis de regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Cu y el número de mutaciones puntuales en individuos de *Peromyscus melanophrys*. Se observa una relación significativa y positiva.

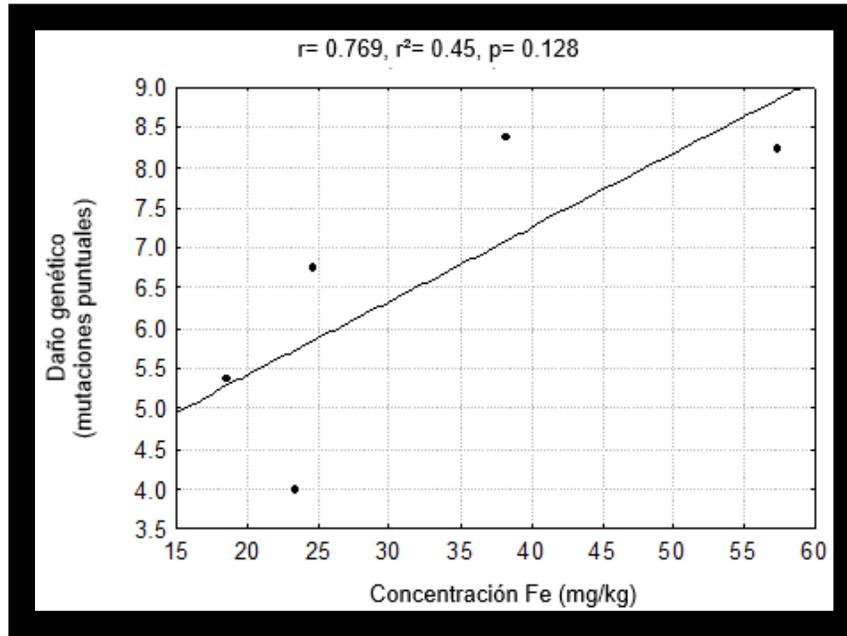


Figura 14. Análisis de regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Fe y el número de mutaciones puntuales en individuos de *Peromyscus melanophrys*.

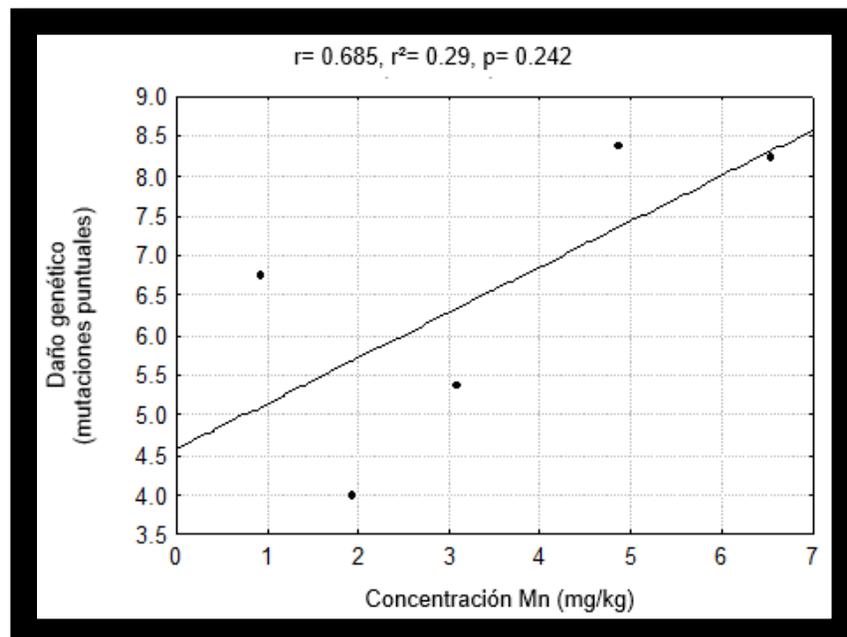


Figura 15. Análisis de regresión lineal para conocer la relación entre la concentración de Mn y el número de mutaciones puntuales en individuos de *Peromyscus melanophrys*.

23. Microsatélites como biomarcador de daño genético

Para determinar si los microsatélites pueden considerarse un buen biomarcador de daño genético en individuos de la especie *Peromyscus melanophrys* que se encuentran crónicamente expuestos a MP, se planteó comparar los resultados obtenidos con este biomarcador (mutaciones puntuales) con los resultados encontrados con otro biomarcador de daño genético (rompimientos de cadena sencilla) reportados por Tovar-Sánchez *et al.*, 2012 para *Peromyscus melanophrys*.

Los resultados muestran que hay una correlación positiva respecto al daño genético encontrado con ambos biomarcadores (mutaciones puntuales y rompimiento de cadena) por la exposición crónica a MP tanto a nivel individual ($r= .90728$) como poblacional ($r= .95359$) (Figura 16 y 17 respectivamente).

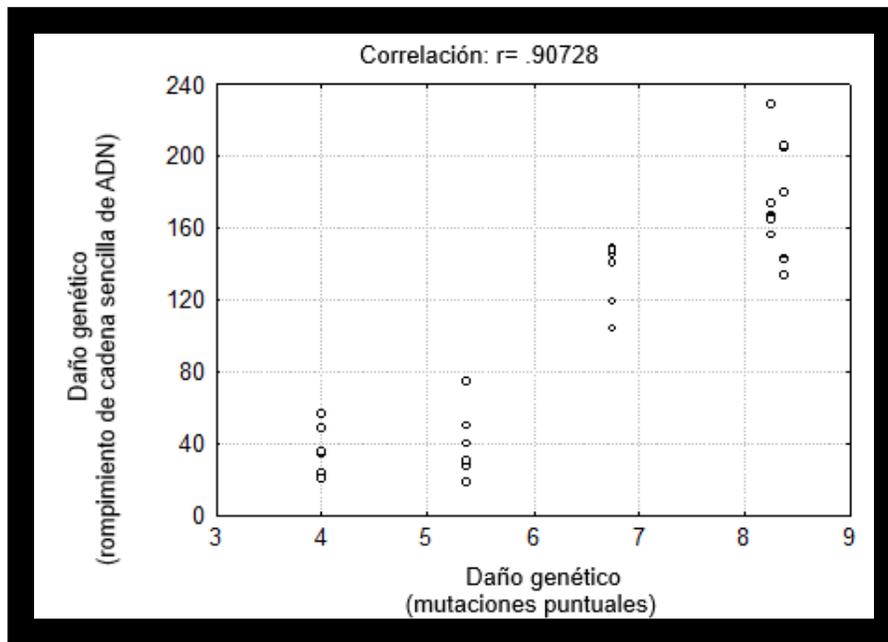


Figura 16. Correlación de biomarcadores de daño genético a nivel individual. Análisis de correlación, $r=.90728$.

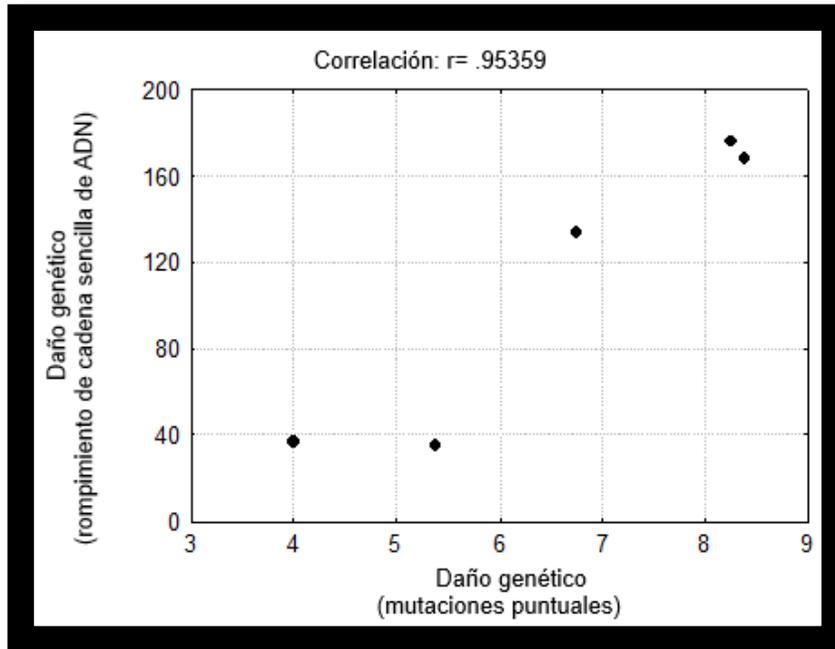


Figura 17. Correlación de biomarcadores de daño genético a nivel poblacional. Análisis de correlación, $r=.95359$.

24. Análisis de componentes principales (PCA), gradillas de deformación y descripción de la forma del cráneo del grupo testigo.

En los animales testigo se realizó un análisis de componentes principales para conocer la variación en la forma del cráneo. El componente uno explica el 48.69% de la variación en la forma del cráneo entre individuos de la muestra testigo, mientras que el componente dos explica el 27.63% de la variación. Cabe mencionar, que la variación en la forma del cráneo está dada por la direccionalidad y desplazamiento que toma cada uno de los vectores (flechas azules) en los diez pares de marcas (círculos rojos) que pueden apreciarse en las dos gradillas de deformación (Figura 18).

La descripción de la forma del cráneo de los individuos testigo está basada en las dos gradillas de deformación (A y B) que se obtuvieron de cada componente principal (Figura 18). De acuerdo con ambas gradillas de deformación, se muestra que en la bóveda craneal (recuadro negro) las marcas 2, 3 y 4 (borde interior del escamoso, bula timpánica y saliente del basioccipital respectivamente) del lado derecho se desplazan hacia el eje de simetría y hacia la parte anterior del cráneo

(Figura 18 A y B), mientras que en el lado izquierdo las marcas 12, 13 y 14 se desplazan en dirección contraria al eje de simetría y hacia la parte posterior del cráneo (Figura 18 A y B). Entretanto, las marcas que se encuentran en el centro de la bóveda craneal (recuadro negro) del lado derecho 5,6 (hueso posterior y anterior de la fosa mesopterigoidea respectivamente) se desplazan en dirección contraria del eje de simetría y su contraparte izquierda 15,16 en dirección al eje de simetría (Figura 18 A y B).

En resumen, la bóveda craneal en los animales testigo tiende a ser angosto y de longitud reducida en contraste con el lado izquierdo que es ancho y relativamente más largo. Asimismo, la parte central de la bóveda craneal del lado derecho es ancha, mientras que el lado izquierdo es angosto.

En lo que respecta a la región palatal (recuadro amarillo) de los individuos testigo, el desplazamiento de las marcas 7,8 (proceso pterigoideo externo, unión entre el 1° molar y el 2° molar, respectivamente) del lado derecho tienen dirección opuesta al eje de simetría (Figura 18 A y B), mientras que su contraparte izquierda 17,18 se desplaza en dirección al eje de simetría (Figura 18 A y B), lo cual implica que el lado derecho de la región palatal tiende a ser ancho y el lado izquierdo angosto.

Finalmente, se puede apreciar que el desplazamiento de las marcas 9,10 extremo posterior y anterior del foramen incisivo (recuadro morado) respectivamente del lado derecho y su contraparte 19, 20 del lado izquierdo de los individuos testigo es prácticamente imperceptible, por tanto, no se presentó ningún cambio en la zona (Figura 18 A y B). No obstante, las marcas 1 (lado derecho) y (11) lado izquierdo del arco zigomático, indican que esta estructura del lado derecho es angosta y del izquierdo es ancho (Figura 18 A y B). Asimismo, la marca anterior del cráneo correspondiente al eje de simetría mostró un desplazamiento del nasal hacia el lado derecho, lo cual sugiere, que la parte derecha del nasal es más ancha con respecto al lado izquierdo.

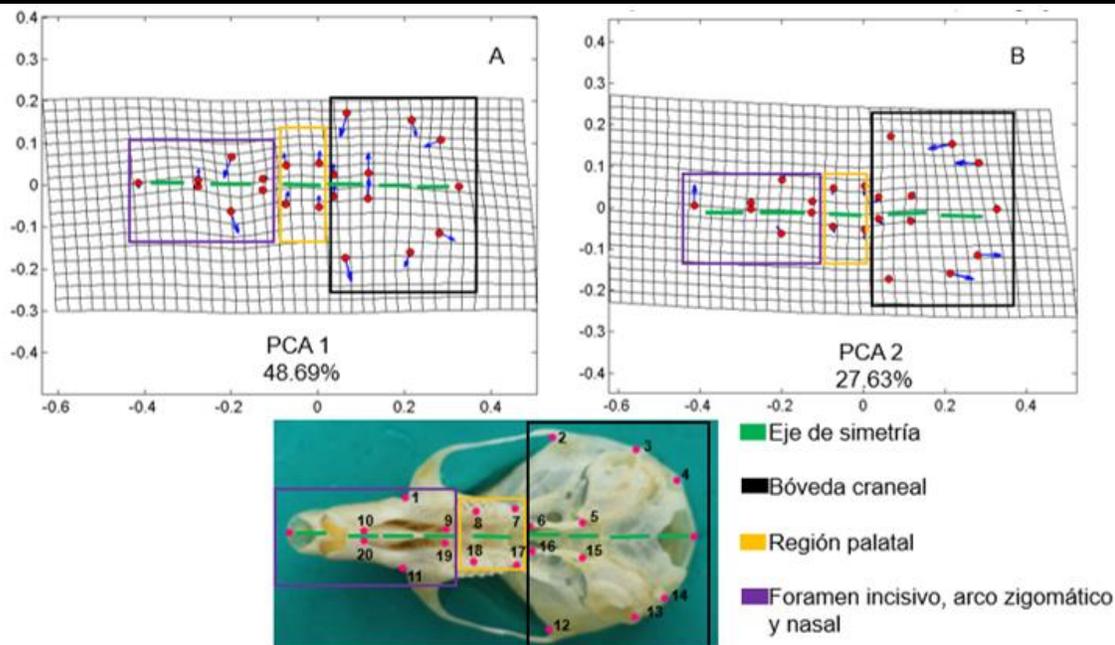


Figura 18. Gradillas de deformación de los animales testigo aumentada 3 veces. El lado derecho del cráneo de los individuos testigo correspondiente a la bóveda craneal (recuadro negro) tiende a ser angosta y de longitud reducida en comparación con el lado izquierdo que es ancho y relativamente más largo, mientras que la parte central de la bóveda craneal del lado derecho es ancha en comparación con el lado izquierdo es angosta. Asimismo, la región palatal correspondiente al lado derecho es ancho y el lado izquierdo angosto (recuadro amarillo), de igual manera, el arco zigomático derecho es angosto, mientras que el izquierdo es ancho y el nasal tiende a ser más ancho en el lado derecho (recuadro morado). El nombre de cada marca se muestra en la (Tabla 7).

25. Análisis de componentes principales (PCA), gradillas de deformación y descripción de la forma del cráneo del grupo expuesto a metales pesados.

Se realizó un análisis de componentes principales para conocer la variación en la forma del cráneo de los animales expuestos. El componente uno explica 33.62% de la variación en la forma del cráneo entre individuos expuestos a MP. Mientras que el componente dos explica el 27.57% de la variación (Figura 19). De manera similar que en el grupo testigo, la variación en la forma del cráneo está determinada a partir de la direccionalidad y desplazamiento de cada uno de los vectores (flechas azules) en los diez pares de marcas (círculos rojos), como se señala en las dos gradillas de deformación (A y B).

La descripción de la forma del cráneo de los individuos expuestos a metales pesados está basada en las dos gradillas de deformación (A y B) que se obtuvieron

de cada componente principal (Figura 19). Los individuos expuestos a MP presentan una forma del cráneo en la cual la bóveda craneal (recuadro negro) del lado derecho indicado por las marcas 2, 3 y 4 (borde interior del escamoso, bula timpánica y saliente del basioccipital respectivamente) se desplazan ligeramente hacia el eje de simetría y hacia la parte anterior del cráneo, mientras que en el lado izquierdo las marcas homologas (12, 13 y 14) se desplazan ligeramente en dirección contraria al eje de simetría y hacia la parte posterior del cráneo (Figura 19 A y B). Asimismo, las marcas 5 y 6 (hueso posterior y anterior de la fosa mesopterigoidea respectivamente) que se encuentran en la parte central del lado derecho de la bóveda craneal se orientan en dirección opuesta al eje de simetría, mientras que las marcas localizadas en el lado izquierdo (15, 16) se orientan hacia el eje de simetría (Figura 19 A y B),

En resumen, el lado derecho de la bóveda craneal de los individuos expuestos a MP tiende a ser angosto y de longitud reducida, mientras que el lado izquierdo es ancho y de mayor longitud. No obstante, en la región central de la bóveda craneal el desplazamiento de los vectores fue mínimo, por lo que no se presentó un cambio considerable en la forma de dicha región.

Con respecto a la zona palatal (recuadro amarillo) de los individuos expuestos, el desplazamiento de los vectores 7 y 8 (proceso pterigoideo externo, unión entre el 1er molar y el 2do molar, respectivamente) en el lado derecho se presenta en dirección contraria al eje de simetría, mientras que en el lado izquierdo el desplazamiento de los vectores homólogos 17 y 18 va en dirección al eje de simetría (Figura 19 A y B). Dado que el desplazamiento de los vectores hacia ambos lados es mínimo, se puede mencionar que no se presentaron cambios importantes en la zona palatal.

En lo que concierne al foramen incisivo (recuadro morado) de los individuos expuestos no se apreciaron cambios importantes en ninguno de los lados (Figura 19 A y B). Sin embargo, en el arco zigomático (recuadro morado) del lado derecho el desplazamiento de la marca 1 se dio en dirección al eje de simetría (Figura 19 A y B). Mientras que el desplazamiento de la marca 11 va en dirección contraria al eje

de simetría, lo cual indica que el arco zigomático derecho es angosto en contraste con el lado izquierdo que es ancho (Figura 19 A y B).

Por último, el desplazamiento de la marca anterior del eje de simetría correspondiente al nasal se dio en dirección contraria al eje de simetría, por tanto, el nasal tiende a ser más ancho en el lado izquierdo.

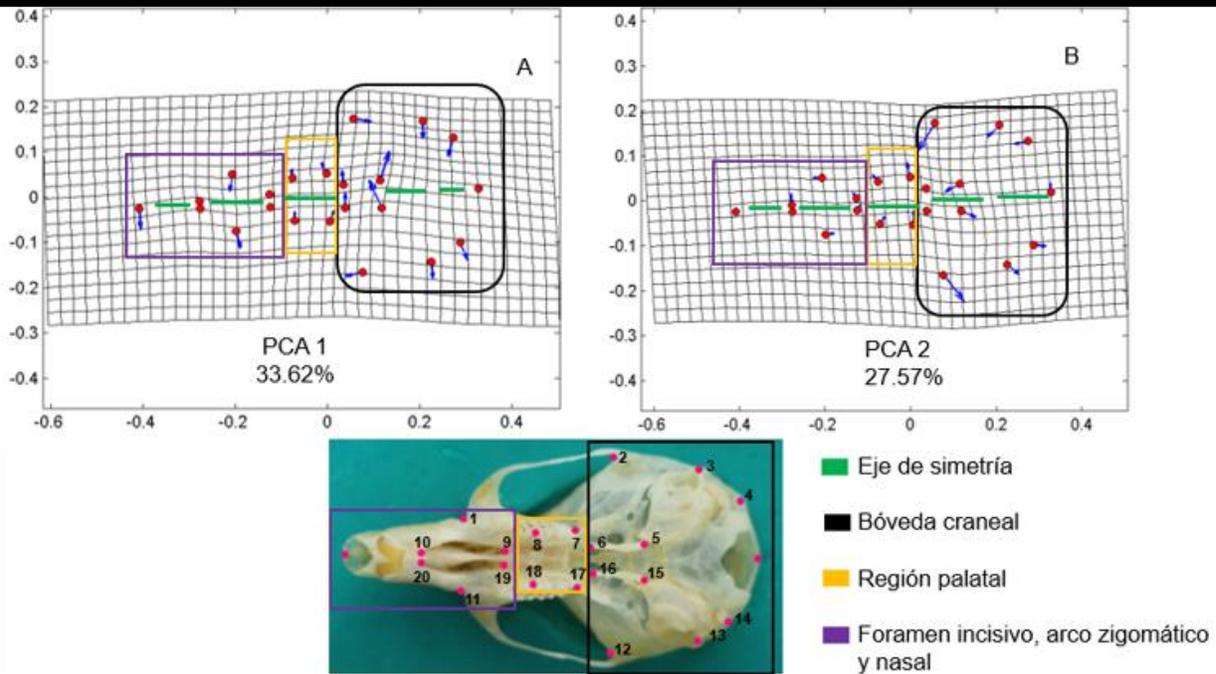


Figura 19. Gradillas de deformación de los animales expuestos aumentada 3 veces. El lado derecho del cráneo de los individuos expuestos correspondiente a la bóveda craneal (recuadro negro) tiende a ser angosto y de longitud reducida en comparación con el lado izquierdo que es ancho y de mayor longitud, sin embargo, en la parte central de la bóveda craneal el desplazamiento de los vectores fue mínimo por lo que no se presentó un cambio considerable en esa zona. Asimismo, el desplazamiento de los vectores en la región palatal (recuadro amarillo) y el foramen incisivo (recuadro morado) fue mínimo por lo que no se presentó un cambio en la forma. Por otra parte, el arco zigomático derecho es angosto mientras que el lado izquierdo es ancho (recuadro morado) y el nasal izquierdo tiende a ser más ancho en el lado izquierdo comparación con el lado derecho. El nombre de cada marca se muestra en la (Tabla 7).

26. Análisis multivariado de varianza

Con la finalidad de evitar la variación isotrópica en la cual se asume que la cantidad de variación alrededor de cada marca es igual, se empleó un análisis multivariado de varianza (modelo no isotrópico) en la cual, la dirección de la variación (desplazamiento de los vectores respecto a cada par de marcas) no es ignorada y es tomada en cuenta al comparar la configuración de marcas original, la reflejada y la re etiquetada (Klingenberg, *et al.*, 2002). Dicho análisis multivariado de varianza

estimó la presencia de fluctuación asimétrica del cráneo de los individuos testigos y expuestos a través de la interacción de los individuos por sus lados. Los resultados muestran que los individuos expuestos presentan mayor fluctuación asimétrica (g.l.=14, $p=0.01$) en comparación con los individuos testigo (g.l.=16, $p=0.07$).

IX. DISCUSIÓN

Esta investigación es la primera en su clase debido a que es integrativa al evaluar los efectos de la exposición crónica a MP a nivel genético; a través del uso de microsatélites para la evaluación del daño genético y a nivel morfológico a través de la estimación de fluctuación asimétrica en el cráneo en una especie silvestre de roedor considerada como centinela.

27. Daño genético en *Peromyscus melanophrys* y su relación con la concentración de metales

Los individuos de la especie silvestre *Peromyscus melanophrys* que se encuentran crónicamente expuestos a una mezcla de MP presentaron mayor daño genético en el hígado en comparación con los individuos del sitio testigo. Esto se puede deber a que los individuos del sitio expuesto bioacumulan mayor cantidad de metales en el hígado en comparación con los testigo (Tovar-Sánchez., 2012 y Mussali-Galante, 2013). En general se ha observado que los individuos que mayormente bioacumulan metales son aquellos que presentan los niveles de daño genético más elevados (Tovar-Sánchez., 2012 y Mussali-Galante, 2013). Lo anterior se puede deber a distintos factores relacionados con la toxicidad del metal que depende de la dosis, la ruta de exposición, la especie química, la genética, el estado nutricional (Tchounwou *et al.*, 2012) y la eficiencia de los mecanismos de detoxificación de los organismos expuestos respecto a los testigo.

En *Peromyscus melanophrys*, se hallaron metales esenciales bioacumulados en el hígado que a pesar de ser considerados como componentes cruciales en los

sistemas biológicos pueden llegar a ser tóxicos a altas concentraciones (Hartwig, 1998; Hartwig, 2002; Nriagu, 2007; Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007).

El hígado se encarga de la detoxificación del organismo (Bello y López, 2001). En este sentido, los metales son metabolizados en el hígado donde se unen a metalotioneínas (MT) que actúan como mecanismo de protección al formar complejos MT-MP que evitan que los MP se unan a los grupos sulfhidrilo (-SH) de las membranas de los hepatocitos (De Ocampo y Ocampo, 1999; Souza *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha reportado que cuando se supera la capacidad de producción de metalotioneínas debido a una elevada concentración de metales se produce daño en los hepatocitos porque los metales se unen a los grupos sulfhidrilo de la membrana hepatocelular (Souza *et al.*, 2012) y esto provoca que los lípidos insaturados de la membrana (linoleico y linolénico) al oxidarse produzcan hidroperóxidos lipídicos que pueden formar ROS que peroxidan, a su vez a otros lípidos, produciéndose así una reacción en cadena que resulta en lesiones de la membrana (Repetto, 1988). A pesar de que cada metal puede tener su propio mecanismo de acción, la generación de ROS parece ser un mecanismo de acción compartido que desencadena señalizaciones celulares (Leonard *et al.*, 2004) como la estimulación de procesos inflamatorios que involucran la secreción de factores quimiotácticos, factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, inactivación de enzimas antiproteolíticas, entre otras (Wang y Shi, 2001; Ding y Shi, 2002; Leonard *et al.*, 2004).

Autores como Tenenbein (2001) y Raam y Ruddell (2005) han reportado que altas concentración del metal esencial (Fe) produce hepatotoxicidad principalmente por la generación de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, se ha identificado que las cuproenzimas involucradas en las reacciones redox dependen de la capacidad de transición del Cu entre un estado oxidativo Cu (II) y un estado reducido Cu (I) que como efecto colateral potencializa la propiedad toxica del Cu porque la transición Cu (II) a Cu (I) puede generar radicales superóxido e hidroxilo (Tchounwou *et al.*, 2008 y Stern, 2010).

Las ROS tienen tres blancos moleculares. El primer blanco molecular de ROS son las membranas celulares en donde rompen las cadenas de ácidos grasos que median la fluidez y permeabilidad de la membrana, el segundo blanco de ROS son las proteínas en las cuales modifican los aminoácidos y rompen el péptido favoreciendo con ello el incremento de la degradación proteolítica y finalmente ROS pueden dañar la azúcar desoxirribosa al remover el átomo de hidrogeno o bien modificar la estructura del ADN al degradar bases de purina o adenina que involucran rupturas de cadena sencilla y doble en el ADN (Jadoon y Malik, 2017), las cuales denotan un daño al ADN.

Otro mecanismo que explica el daño genético es la interferencia de los metales pesados en los sistemas de reparación del ADN, lo cual se ve reflejado en la inestabilidad del microsatélite, en la cual, el número de repeticiones del microsatélite es diferente al número de repeticiones que estaban en el ADN cuando fue heredado (NIH, 2018). Dicha inestabilidad en el microsatélite puede deberse a la característica intrínseca de su elevada tasa de mutación que es mediada por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN. Sin embargo, algunos investigadores han encontrado que los MP aumentan la tasa de mutación de los microsatélites, al interferir con los sistemas de reparación del ADN. De manera particular, con el sistema de desapareamiento que se encarga de reconocer y reparar la incorporación incorrecta de bases mediada por la ADN polimerasa, así como del reconocimiento y sustitución de bases dañadas (oxidadas) (García-Lestón, *et al.*, 2010; Martín-López *et al.*, 2013).

Autores como El-Ghor *et al.*, (2010), Oliveira *et al.*, (2012) y Du *et al.*, (2013) confirman que la exposición por vía oral o por inyección subcutánea de diferentes dosis (2.93 mg/kg, 1mg/kg y 0.25/ 0.5 mg/kg) de CdCl₂ en ratas machos adultos así como de ratones macho resulta en un incremento de la inestabilidad en el microsatélite en loci de sitio frágiles del genoma de rata; testículos/loci de riñón y leucocitos respectivamente de los individuos expuestos en comparación con los testigo.

De igual manera, Monteiro *et al.*, (2009) Rodríguez *et al.*, (2013); Correia *et al.*, (2014) y Wang *et al.*, (2016) reiteran que la exposición a concentraciones altas de Cd (100 μM), Pb^{2+} (2000 mg L^{-1}), Al (400 μM) y Cd (8.0 mg L^{-1}) da como resultado mayor inestabilidad en el microsatélite (perdida o ganancia en pares de bases) en raíces de *Lactuca sativa*, *Pisum sativum*, *Plantago almogravensis/Plantago lagopus* y en plántulas de *Arabidopsis sp* respectivamente, en comparación con los testigos. Por lo que se concluye en los estudios antes mencionados que los metales pesados tienen la capacidad de generar inestabilidad en el microsatélite en distintas especies tanto animales como vegetales.

No obstante, también se ha reportado que factores como la radiación UV, enfermedades, exposición a campos electromagnéticos e ionización producen inestabilidad en el microsatélite al bloquear la replicación y transcripción de genes, favoreciendo así la acumulación de mutaciones que no pueden ser reparadas o por la pérdida de heterocigocidad (Pierce, 2006; Jover y Payá, 2003; Mairs *et al.*, 2007).

El análisis de regresión lineal muestra que el daño genético observado en *Peromyscus melanophrys* está dado en un 85% por Zn y en un 77% por el Ni y el Cu.

Una posible explicación del 85% de influencia del Zn sobre los niveles de daño genético puede ser atribuido al plegamiento correcto de los dominios de dedo de zinc que sirven como sitios de unión al ADN, por lo tanto, el Zn actúa como un factor de transcripción que regula la expresión génica en los organismos (Cooper y Hausman, 2014). Es por ello, que altas concentraciones de este metal podrían incrementar la transcripción de microsatélites inestables. Cuando los microsatélites se encuentran en regiones codificantes, su traducción afecta la estructura y función de la proteína, sin embargo, cuando se localizan en regiones no codificantes su transcripción pueden alterar la función del ARNm y provocar toxicidad celular (Brower *et al.*, 2009).

Con respecto al Ni, concentraciones superiores a las requeridas en el organismo inhiben el sistema de reparación e incisión de nucleótido/base debido a que el Ni al sustituir al Zn en las proteínas involucradas en el reconocimiento del ADN dañado

evita que dichas proteínas se unan al nucleótido oxidado, lo que favorece un incremento de la frecuencia total de bases de ADN oxidadas (Hartwig, 1998; Hartwig *et al.*, 2002).

Asimismo, se ha descrito que la sustitución de Mg por Ni durante la replicación del ADN disminuye la fidelidad de la replicación (Sirover y Loeb, 1976, 1977). Es decir, debido a que los microsatélites son propensos a no alinearse correctamente a causa del deslizamiento de la polimerasa, si las mutaciones (inserciones, deleciones o mutaciones puntuales) no son detectadas y corregidas por las proteínas del sistema de apareamiento que se encargan de reparar el ADN, las mutaciones acumuladas finalmente derivan en una alteración en la longitud del microsatélite que denota una inestabilidad genética general (Hartwig, 2001; Jover y Payá, 2009; Custodio, 2015).

En lo que respecta al Cu, si se sobrepasan las concentraciones traza requeridas, el Cu puede reemplazar al Zn en los dedos de zinc o bien puede oxidar las cisteínas que lo conforman, en ambos casos los dedos de zinc pierden la capacidad de unirse al ADN así como su función enzimática de reparación al ADN dañado (Hartwig *et al.*, 2002) y por tanto se incrementan las inserciones y deleciones de motivos en los microsatélites, lo cual, propicia una marcada inestabilidad.

Por otra parte, no se encontró una correlación entre la concentración de Fe y Mn con el daño genético observado, lo cual probablemente se debe a que Zn, Cu y Ni estén reemplazando al Fe y Mn (Sirover y Loeb, 1976, 1977).

28. ¿Animales de laboratorio o silvestres para estudios ecotoxicológico?

De acuerdo con la sección previa, existen diversos factores involucrados en la inestabilidad de los microsatélites. Es por ello, que las decisiones que involucran la elección de la especie de estudio y el lugar en que se llevaran a cabo (laboratorio o campo) son fundamentales, debido a que los escenarios plantean retos diferentes para el investigador.

En trabajos de laboratorio como los mencionados anteriormente, es relativamente más sencillo tener control sobre un mayor número de variables como el tamaño de muestra, la dosis, el tipo de genotóxico al que se expone al individuo, el género de la especie, edad, sexo, vía de administración, tiempo de exposición, entre otras, que facilitan el diseño de la metodología empleada para la investigación y al mismo tiempo evita que se cometan errores de tipo I o II. No obstante, dichos trabajos solo pueden aportar información relacionada con las dosis máximas permitidas en los individuos antes de que se presente inestabilidad en el microsátélite, así como de algunos mecanismos de acción específicos para cada metal evaluado.

Por otra parte, las investigaciones realizadas en campo con especies silvestres como es el caso del presente estudio, resulta imposible tener control sobre todas las variables mencionadas en el párrafo anterior porque la investigación depende por ejemplo, en el caso del sexo, de la proporción de sexos que se encuentre en ese momento en la población, es decir, que sexo se encuentra más representado en el momento de la colecta, de igual manera, la vía de administración no puede asegurarse porque los individuos se encuentran expuestos al menos por tres vías (inhalación, oral y subcutánea), asimismo, el tamaño de muestra está sujeta a la capacidad del investigador de implementar nuevas técnicas que le permitan completar la n y por supuesto a la inversión de más tiempo con la finalidad de coleccionar todos los ejemplares necesarios.

Y así como los ejemplos antes mencionados existen otros factores que dificultan el control de un mayor número de variables. No obstante, a pesar de lo mencionado anteriormente, las investigaciones conducidas en campo tienen un valor mayor porque se desarrollan sobre un escenario realista, en el cual, la especie de estudio (*Peromyscus melanophrys*) vive dentro de los jales, se encuentra en contacto directo con sólidos, agua y aire contaminados con una mezcla de metales pesados (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012) y no con un solo metal y además el tiempo de exposición a metales se extiende más allá de días o meses como sucede en los estudios de laboratorio, ya que como es el caso de la presente investigación los individuos han estado expuestos crónicamente a una mezcla de MP generación tras

generación por aproximadamente 50 años, por lo cual, las concentraciones de cada uno de los metales encontrados en el hígado de *Peromyscus melanophrys* es lo más cercano a la realidad, dado que hay otros factores como el género y la salud del individuo (nutrido/desnutrido, parasitado/no parasitado, enfermo/no enfermo) que exacerban los efectos de los MP sobre el individuo.

Finalmente, lo que vuelve aún más relevante este estudio en contraste con otros, es que la evaluación de la inestabilidad en el microsatélite fue realizada en *Peromyscus melanophrys*, la cual, es considerada como una especie centinela, lo cual, implica que la especie en cuestión es altamente sensible a la exposición por MP y responde bioacumulando los MP biodisponibles en distintos órganos incluyendo el hígado.

29. ¿Son los microsatélites un buen biomarcador de daño genético?

Anteriormente y en la actualidad las evaluaciones del daño genético por la presencia de MP son realizadas con biomarcadores de efecto temprano como los RAPD que detectan polimorfismo en el ADN (Ahmad *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2016) o por el ensayo cometa que dependiendo del pH que se utilice en la técnica revela rompimientos de cadena sencilla, doble y sitios retardados de reparación (Rojas *et al.*, 1999). Dichos biomarcadores son buenos detectando el daño inducido por los MP, sin embargo, con los RAPD se amplifican al azar fragmentos de todo el genoma del ADN y por ello dicha técnica requiere un proceso de estandarización adecuada o de lo contrario es cuestionable su confiabilidad y reproducibilidad (Ahmad *et al.*, 2012). En contraste el ensayo cometa analiza el ADN nuclear de manera individual de cualquier tipo de célula eucariótica (Rojas *et al.*, 1999) por lo que puede estimarse el daño genético por célula.

Por otra parte, los microsatélites se encuentran mayormente en regiones no codificantes del genoma (Malk y Khan, 2009), en donde se encuentran inmersos junto con los elementos a distancia (potenciadores, silenciadores y aisladores) en procesos de regulación de la expresión génica y epigenética (Jover y Paya, 2003 y

Khurana *et al.*, 2016). Además, presentan una elevada tasa de mutación, son codominantes y constituyentes importantes de telómeros y centrómeros (Malk y Khan, 2009). Por lo que pueden ser usados como biomarcadores de efecto temprano (Jover y Paya, 2003; Malk y Khurana *et al.*, 2016).

Los resultados de las correlaciones entre las mutaciones puntuales y el rompimiento de cadena sencilla evidenciaron que los microsatélites son un buen biomarcador de daño genético debido a que el incremento de las mutaciones puntuales como consecuencia de la exposición crónica a MP puede compararse con los rompimientos de cadena sencilla observados bajo las mismas condiciones de exposición a metales en individuos de la especie *Peromyscus melanophrys*, en el mismo sitio de estudio.

Es por ello, que tomando como referencia investigaciones anteriores, donde autores como Monteiro *et al.*, (2009), El-Ghor *et al.*, (2010), Oliveira *et al.*, (2012), Du *et al.*, (2013), Rodríguez *et al.*, (2013); Correia *et al.*, (2014) y Wang *et al.*, (2016) indican que las variaciones que sufren los microsatélites los convierte en los marcadores moleculares más sensibles para el diagnóstico temprano y la evaluación del daño genético provocado por los efectos de los MP en estudios ecotoxicológicos.

Aunado con la aportación del presente estudio, se confirma que los microsatélites también pueden aplicarse exitosamente en la evaluación del daño genético en la especie centinela silvestre de *Peromyscus melanophrys* que está crónicamente expuesta a una mezcla de MP.

30. Fluctuación asimétrica como biomarcador de inestabilidad en el desarrollo del cráneo

Los resultados del análisis multivariado de varianza revelaron que los individuos de *Peromyscus melanophrys* que viven en los jales presentaron mayor fluctuación asimétrica en el cráneo en comparación con los testigos. Lo anteriormente expuesto, concuerda con lo documentado en la literatura, en donde de manera general se ha visto que especies silvestres como *Mus spretus*, *Crocidura russula* y *Podarcis muralis* que viven en ambientes contaminados con una mezcla de MP (Cr,

Mn, Fe, Cu, Zn y Se / Pb, Hg, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr, Mo, Sr, Ba, B, Cd / MP, bencenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos, respectivamente) presentan mayor fluctuación asimétrica en los molares inferiores, mandíbula y cabeza, respectivamente en comparación con los individuos que viven en el sitio testigo (Nunes *et al.*, 2001; Oleksyk *et al.*, 2004; Kurbalija *et al.*, 2010; Sánchez-Chardi *et al.*, 2013; Lazic *et al.*, 2014).

En lo que respecta, a estudios realizados en el laboratorio, los resultados encontrados por Kurbalija *et al.* (2010) reiteran que la exposición a diferentes concentraciones (10 µg/ml y 100 µg/ml) de acetato de plomo (Pb (CH₃COO)₂·3H₂O) durante siete generaciones de *Drosophila subobscura* resulta en un incremento de la FA en machos de la última generación.

Por otra parte, también es importante resaltar que la FA puede presentarse como resultado de la exposición a otro tipo de genotóxicos como son la radiación ionizante los pesticidas y los alcaloides o bien por el padecimiento de alguna enfermedad (Oleksyk *et al.*, 2004; Coda *et al.*, 2013; Padró *et al.* 2014 y Weisensee *et al.*, 2013)

En relación con lo anteriormente expuesto, queda claro que existe una relación entre la exposición a algún de genotóxico y el incremento de la FA. Esto se debe a que los individuos que viven bajo condiciones de stress tienden a acumular una mayor cantidad de errores durante su desarrollo o bien disminuyen su capacidad de amortiguar las fluctuaciones que se presentan durante el mismo (Klingenberg, 2015).

El carácter evaluado en este estudio (cráneo), es un tejido óseo dinámico que constantemente requiere concentraciones traza de flúor (F), magnesio (Mg), hierro (Fe) y manganeso (Mn) para realizar la remodelación ósea (Tortora y Derrickson, 2006). Sin embargo, concentraciones superiores a las requeridas pueden ser tóxicas en los organismos, en este contexto Tovar-Sánchez *et al.*, 2012 reportaron la bioacumulación en hueso de Fe y Mn en *Peromyscus melanophrys* que habitan en zonas expuestas a metales.

Debido a que el Fe y el Mg pueden alterar la homeostasis en el hueso por el incremento de ROS o el intercambio de Mg por Mn en los centros activos de las enzimas, estos mecanismos de acción podrían estar interfiriendo con la estabilidad en el desarrollo del cráneo de los individuos expuestos, por lo que se aprecia mayor FA en ellos en comparación con los testigos. Un incremento en la FA deriva en la presencia de asimetría en el carácter, por tanto, los individuos de *Peromyscus melanophrys* expuestos a MP son asimétricos respecto al cráneo en contraste con los testigos. Dicha asimetría en el cráneo podría tener implicaciones en el funcionamiento adecuado del aparato masticatorio debido a que, por ejemplo, el hueso temporal está involucrado en la masticación, deglución y postura mandibular en reposo Herrera-Atoche, J. R. (2002).

31. Posibles causas implicadas en la inestabilidad del desarrollo del cráneo en *Peromyscus melanophrys*

Los microsatélites también pueden ser considerados como biomarcadores de efecto permanente aún a pesar de no encontrarse en regiones codificantes del genoma porque los cambios o alteraciones sufridos en la secuencia del microsatélite pueden impedir que el microsatélite regrese a su estado inicial y por tanto el cambio sufrido se vuelve permanente cuando los alelos fijados contribuyan a la disminución o aumento de la variabilidad genética, porque una vez que la variabilidad genética se pierde la población ya no puede regresar al estado inicial (Mussali-Galante *et al.*, 2013).

A menos que aumente el flujo génico o la deriva génica favorezca la fijación de alelos tolerantes que puedan contender mejor contra el efecto genotóxico de los metales pesados, lo cual, definitivamente no es el caso las poblaciones de *Peromyscus melanophrys* porque en lo que respecta al flujo génico el número de migrantes por generación para las poblaciones expuestas fue de uno en contraste con casi seis migrantes por generación en las poblaciones testigo (Mussali-Galante *et al.*, 2013) y además la disminución de la heterocigocidad de las poblaciones expuestas (Mussali-Galante *et al.*, 2013) aunado al incremento de los niveles de

endogamia (Mussali-Galante *et al.*, 2013) que estas presentan disminuyen la posibilidad de resiliencia de las poblaciones expuestas.

Lo anteriormente expuesto podría ayudar a dilucidar los resultados encontrados en este estudio “presencia de mayor FA en el cráneo de los individuos de *Peromyscus melanophrys* expuestos a una mezcla de MP en comparación con los testigo”. De acuerdo con la teoría de la heterocigosidad los niveles de heterocigosidad pueden ser inversamente correlacionados con los niveles de inestabilidad en el desarrollo (Lerner, 1954; Livshits y Kobylansky, 1985). Por tanto, se puede inferir que la pérdida de diversidad genética reportada para las poblaciones expuestas de *Peromyscus melanophrys* (Mussali-Galante, 2013) podría estar implicada en el aumento de la FA del cráneo en *Peromyscus melanophrys*. Dicho de otra forma “la pérdida de heterocigosidad en los individuos expuestos incrementa la inestabilidad en el desarrollo de dicho carácter”. Y esto se debe, de acuerdo con Lerner (1954) a que los heterocigotos tienen una mayor capacidad de permanecer dentro de las normas de canalización (desarrollo del mismo fenotipo), así como de la homeostasis del desarrollo. De tal modo que los heterocigotos presentan una tendencia incrementada de expresar las características morfológicas propias de la especie (Leary *et al.*, 1985) aun cuando se encuentren bajo condiciones de estrés.

En este sentido, diversos autores confirman la relación que existe entre la homocigosidad y el incremento en la inestabilidad del desarrollo (Mather 1953; Thoday 1953; Reeve 1960; Bruckner 1976). Asimismo, el incremento de los niveles de endogamia en las poblaciones expuestas de *Peromyscus melanophrys* aunado al bajo flujo genético (Mussali-Galante, 2013) podrían estar exacerbando la predominancia de genotipos homocigotos que son incapaces genéticamente hablando de contrarrestar la acumulación de errores que provocan la exposición a MP durante el desarrollo del cráneo en *Peromyscus melanophrys*.

X. CONCLUSIONES

Los individuos de *Peromyscus melanophrys* bioacumulan metales pesados y presentan mayor daño genético (inestabilidad en el microsatélite) en comparación con individuos testigo.

Un aumento en la concentración de Zn, Ni y Cu en hígado de *Peromyscus melanophrys* está relacionado con un aumento en el número de mutaciones puntuales. En contraste Fe y Mn que no se encontró una relación.

El análisis de correlación mostró que el daño genético observado con microsatélites (incremento de mutaciones puntuales) está relacionado con el incremento de rompimiento de cadena sencilla en el ADN de *Peromyscus melanophrys*. Lo cual muestra que los microsatélites son un buen biomarcador de daño genético.

La fluctuación asimétrica en el cráneo de los individuos expuestos a metales pesados de la especie *Peromyscus melanophrys* es mayor en comparación con los individuos del sitio testigo.

Los individuos expuestos a metales pesados presentaron inestabilidad en el desarrollo del cráneo en comparación con los testigo.

XI. LITERATURA CITADA

Adams, C. D., Rohlf, J. F., & Slice, E. D. (2011). Geometric Morphometrics: Ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*, 75, 5-16.

Ahmad, M. A., Gaur, R., & Gupta, M. (2012). Comparative biochemical and RAPD analysis in two varieties of rice (*Oryza sativa*) under arsenic stress by using various biomarkers. *Journal of Hazardous Materials*, 141-148.

Arango, V., & Sandra, S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30, 75-82.

Arbillaga, L., Ezpeleta O., & López A. (2004). ¿Es la ocratoxina A una micotoxina mutagénica?. *Revista de Toxicología*, 21, 1-10.

Arencibia, D. F., & Rosario, L. A. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y los micronúcleos in vitro. *Revista de Toxicología en Línea*, 20, 25-38.

Armienta, M. A., Villaseñor, G., Rodríguez, R., Ongley, L. K., & Mango, H. (2005). The role of arsenic-bearing, rocks in groundwater pollution at Zimapán Valley, México. *Environmental Geology*, 40, 571-581.

Ballesteros, L., Virseda-Chamorro, I., Peral-Jiménez, R., Grimaldi, S., Tejada, R., & López-Colón, J. L. (2011). Metilmercurio en el cabello de población infantil. *Sanidad Militar*, 67, 299-303.

Barceló, J., & Poschenrieder, CH. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2, 345-361.

Bedford N. L., & Hoekstra, H. E. (2015). *Peromyscus* mice as a model for studying natural variation. *eLIFE*, 4, 1-13.

Berckmoes, V., Scheirs, J., Jordaens, K., Blust, R., Backeljau, T., & Verhagen, R. (2005). Effects and environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood

mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2898-2907.

Brouwer, R. J., Willemsen, R., & Oostra A. B. (2009). Microsatellite repeat instability and neurological diseases. *BioEssays*, 31, 71-83.

Carleton, M. D. (1982). Distribution and systematics of *Peromyscus* (Mammalia: Rodentia) of Nayarit, Mexico. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 352, 1-46.

Carleton, M. D. (1989) Systematics and Evolution. En: Kirkland, D. L. y Layne, J., *Advances in the Study of Peromyscus (Rodentia)*. Lubbock: Texas Tech University Press, 367.

Coda, J., Gomez, D., Martínez, J., & Steinmann, A. (2016). The use of fluctuating asymmetric as a measure of farming practice effects in rodents: A species-specific response. *Ecological indicators*, 70, 269-275.

Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Aguilar, B. R., & Munive, M. G. R. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. *SEMARNAT, INECC, UAM-I*, 1-17.

De Anna, E. B., Bonisoli-Alquati, A., & Mousseau, T. A. (2013). The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A meta-analysis. *Ecological Indicators*, 30, 218-226.

De Ocampo, A. A., & Ocampo, C. L. (1999). Diagnóstico del estrés en peces. *Veterinaria México*, 30, 337-344.

Dermience M., Lognay G., Mathieu F., & Goyens, P. (2015). Effects of thirty elements on bone metabolism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 32, 86–106.

Depledge, M.H. (1993). Ecotoxicology: a science or a management tool. *Ambio* 22, 51–52.

Du, X., Lan, T., Yuan, B., Chen, J., Hu, J., Ren, W., & Chen, Z. (2013). Cadmium-induced microsatellite instability in the kidneys and leukocytes of C57BL/6J mice. *Environmental Toxicology*, 56, 1-10.

Dewey, M. J., & Dawson, W. D. (2001). Deer mice “the drosophila of north America mammalogy”. *Genesis*, 29, 105-109.

El-Ghor, A. A., Noshay, M. M., Ashmaoui, H. M., Eid, J. I., & Hassanane, M. S. (2010). Microsatellite instability at three microsatellite loci (D6mit3, D9mit2 and D15Mgh1) located in different common fragile sites of rats exposed to cadmium. *Mutation Research*, 696, 160-166.

Escobar-Sánchez, O. (2010). Bioacumulación y Biomagnificación de mercurio y selenio en peces pelágicos mayores de la costa occidental de Baja California Sur, México, Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, 1-3.

Fortoul, T. I., Mussali-Galane, P., Avila-Costa, M. R., Piñón-Zarate, G., Martínez-Levy, G., Rodríguez-Lara, V., Rojas-Lemus, M., Díaz-Bech, P., Hernández-Escobar, S., Bizarro, N. P., Colib-Berenque, L., & Avila-Casado, M. C (2006). Early biomarkers of effect in human health: dna damage evaluation. En C. R. Woods (Ed) *Frontiers in DNA Research* (1-9). New York: Nova science publishers.

Garza, A., Chávez, H., Vega, R., & Soto, E. (2005). Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental*, 28, 48-58.

Góngora, P. J., (2013). Evolución reciente de la minería en México. *Comercio Exterior*, 63, 2-6.

Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F. M., & González-Hernández, D. (2007). Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 24, 170-184.

Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*. 8, 3-11.

Hartwig A, Schwerdtle T. (2002). Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, 127, 47-54.

- Herbert, P. D., & Luiker, M. M. (1996). Genetic effects of contaminant exposure toward assessment of impacts on animal population. *The Science of the Total Environment*, 191, 23-58.
- Herrera-Atoche, J. R. (2002). Cambios en la morfología craneofacial en ratas Spraguedawley con resección bilateral de los músculos temporales y meseteros. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, 19.
- Jadoon, S., & Malk, A. (2017). DNA Damage by Heavy Metals in Animals and Human Beings: An Overview. *Biochemistry and Pharmacology, an open access journal*, 6, 1-8.
- Jarne, P., & Lagoda, P.J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 10, 424-9.
- Junaid, M., Murthy, R. C., & Saxena, D. K. (1996). Embriotoxicity of orally administered chromium in mice: exposure during the period of organogenesis. *Toxicology Letters*, 84, 143-148.
- Klingenberg, C. P., Barluenga, M., & Mayer, A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *The Society for the Study of Evolution*, 56, 1909-1920.
- Klosinska, T. (1996). Ecological characteristics of the bank vole population in the habitat contaminated with heavy metals. *Polish Ecological Studies*, 22, 51-59.
- Kurbalija, Z., Stamenkovic-Radak., M., Pertoldi, C., & Andjelkovic, M. (2010). The effect of lead on the developmental stability of *Drosophila subobscura* through selection in laboratory conditions. *Archives of Biological Sciences*, 1, 83-91.
- Lam, P. K., & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 182–186.
- Lazić, M. M., Carretero, M. A., Crnobrnja-Isailović, J., & Kaliontzopoulou, A. (2014). Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: an integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in Lizard head shape. *The American Naturalist*, 1, 44-58.

Leonard, S., Bower, J., & Shi, X. (2004). Metal induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255, 3-10.

Lindberg, H. K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G. C. M., Norppa, H., & Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folated-deprived human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 617, 33-45.

Longsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. I. (2001). El manejo del cianuro en la extracción de oro. *The International Councilon Metals and the Environment*, 7-10.

López, M., Grau J. M. (2005). Metales pesados, Materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de los pastos de la España peninsular. II Resultados por Provincias. Ministerio de Educación y Ciencia e Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria, 23-35.

Mancera-Rodríguez, N. J., & Álvarez-León, R. (2006). Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11, 3-24.

Martínez-López, E., María-Mojica, P., Martínez, J. E., Calvo, J. F., & García-Fernández, A. J. (2002). Pluma de águila calzada (*Hieraaetus pennatus*) como unidad biomonitora de la exposición ambiental a cadmio y plomo. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 18, 69-74.

Mairs R. J., Hughes K., Fitzsimmons S., Prise K. M., Livingstone A., Wilson L., Baig N., Clark A. M., Timpson A., Patel G., Folkard M., Angerson W. J., & Boyd M. (2007). Microsatellite analysis for determination of the mutagenicity of extremely low-frequency electromagnetic fields and ionizing radiation in vitro. *Mutation Research* 626, 34 – 41.

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.

Musser, G. G., & Carleton, M. D. (2005). Family Cricetidae. En D. E. Wilson (Ed) *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference* (824-830). Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.

Mussali-Galante, P. (2008). Estudio sobre la inducción de daño al ADN en sangre periférica de individuos expuestos a metales en el agua de bebida, en la población de Huautla, Morelos. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, 27-53.

Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Valencia-Cuevas, L., & Rojas, E. (2013). Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanophrys* chronically exposed to mine tailing in Morelos, México. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 7666-7679.

Mutanen, M., & Pretorius, E. (2007). Subjective visual evaluation vs traditional and geometric morphometrics in species delimitation: a comparison of moth genitalia. *Systematic Entomology*, 33, 371-386.

Mutteroecker, P., & Gunz, P. (2009). Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*. 36, 235-247.

Moonga, B. S., & Dempster, D. W. (1995). Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 453-457.

Monteiro, M., Santos, C., Mann, R. M., Soares, A., & Lopes, T. (2007). Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 421-427.

Moriarty, F. (1999). Ecotoxicology: The study of pollutants in ecosystems. En F. Moriarty. *Ecotoxicology* (289). London: Academy Press.

National Research Council. (1999). Animals as sentinels of environmental health hazards (33-48). Washington, DC: National Academy Press.

Nava, R. C., & Méndez, A. M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, arsénico, plomo y talio). *Archivos de neurociencia*, 16, 140-147.

- Nunes, A. C., Auffray, J. C., & Mathias, M. L. (2001). Developmental instability in a riparian population of the algerian mouse (*Mus spretus*) associated with a heavy metal-polluted area in central Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 515-521.
- Oleksy, T. K., Novak, J. M., Purdue, J. R., Gashchak, S. P., & Smith, M. H. (2004). High levels of fluctuating asymmetry in populations of *Apodemus flavicollis* from the most contaminated areas of Chernobyl. *Journal of Environmental Radioactivity*, 73, 1-20.
- Olive, P. L., Banath, J. P., & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". *Radiation Research*, 122, 86-94.
- Oliveira, H., Lopes, T., Almeida, T., Pereira, M. L., & Santos, C. (2012). Cadmium-induced genetic instability in mice testis. *Human and Experimental Toxicology*, 31, 1228-1236.
- Ostrosky-Wegman, P., & Gonsebatt, M. E. (1997). Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos xenobióticos. *Gaceta Médica de México*, 133, 93-96.
- Padró, J., Carreira, V., Corio, C., Hasson, E., & Soto, I. M. (2014). Host alkaloids differentially affect developmental stability and wing vein canalization in cactophilic *Drosophila buzzatii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 27, 2781-2797.
- Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1997). Fluctuating asymmetry and developmental stability: heritability of observable variation vs heritability of inferred cause. *Journal of Evolutionary Biology*, 10, 39-49.
- Pañuela, O. A. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para la investigación. *Colombia Médica*, 36, 215-225.
- Parkinson, A & Ogilvie, B. W. (2008). Biotransformation of xenobiotics. En C. D. Klaassen (Ed). *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (161). United states: McGraw Hill Professional.

Perera, F. P., & Weintein, I. B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 21, 517-524.

Phelps, K. L., & McBeen, K. (2000). Population parameters of *Peromyscus leucopus* (white-footed deermice) inhabiting a heavy metal contaminated superfund site. *The Southwestern Naturalist*, 55, 363-373.

Pounds, J. G., Long, G. J., & Rosen, J. F. (1991). Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental Health Perspectives*, 91, 17-32.

Ramel, C. (1997). Mini y microsateclites. *Environmental Health Perspectives*, 4,781-789.

Ramírez, E. (2001). Almacenamiento de residuos mineros en México. Memoria del seminario "Almacenamientos de Residuos Mineros" CNA – SMMS - CMM, México D.F. México.

Ramos-Arroyo, Y. R., & Siebe-Grabach. C. D. (2006). Estrategia para identificar jales con potencial de riesgo ambiental en un distrito minero: estudio de caso en el distrito de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 23, 54-74.

Ramos, G. M., Avelar, J., Medel, R. A., Yamamoto, L., Godínez, L., Ramírez, M., Guerra, R., & Rodríguez, F. (2012). Movilidad de metales en jales procedentes del distrito minero de Guanajuato, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28, 49-59.

Reif, J. S. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Reports*, 126, 50–57.

Repetto, J. M., & Reppeto K. G. (2009). Biotransformación de los tóxicos. En M. Repetto (Ed). *Toxicología fundamental* (118-132). Paris: Díaz de Santos.

Richtsmeier, T. J., Burke, D. V., & Lele, R. S. (2002). The promise of geometric morphometrics. *Yearbook of Physical Anthropology*, 45, 4-22.

- Rodríguez, E., Azevedo, R., Moreira, H., Souto, L., & Santos, C. (2013). Pb²⁺ exposure induced microsatellite instability in *Pisum sativum* in a locus related with glutamine metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 19-22.
- Romero, M. F., & Gutiérrez, R. M. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62, 43-53.
- Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology*, 8, 129-132.
- Sabath, E., & Robles-Osorio, M. L. (2012). Medio ambiente y riñón: nefrotoxicidad por metales pesados. *Revista Nefrología*, 32, 279-286.
- Sánchez-Chardi, A., García-Pando, M., & Lopez-Fuster, M. (2013). Chronic exposure to environmental stressors induces fluctuating asymmetry in shrews inhabiting protected mediterranean sites. *Chemosphere*, 93, 916-923.
- Sahuquillo, A., Rigol, A., & Rauret, G. (2003). Overview of the use of leaching/extraction test for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 152-159.
- Schäfer, S., Buchmeier, G., Claus, E., Duester, L., Heininger, P., Körner, A., Mayer, P., Paschke, A., Rauert, C., Reifferscheid, G., Rüdell, H., Schlechtriem, C., Schöter-Kermani, C., Schudoma, D., Smedes, F., Steffen, D., & Vietoris, F. (2015). Biaccumulation in aquatic systems: methodological approaches, monitoring and assessment. *Environmental Sciences Europe*, 27, 2-10.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365-371.
- Sepúlveda, T. V. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Instituto Nacional de Ecología, 19-31.
- Silice, D. E. (2007). Geometric morphometrics. *Annual Review of Anthropology*, 36, 261-281.

Solís-Miranda, M. B. (2016). Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 37-57.

Soto-Jiménez, M. F. (2011). Transferencia de elementos traza en tramas tróficas acuáticas. *Hidrobiología*, 21, 239-248.

Souza, A. V., Martínez, F. K., Bucio, O. L., Gómez-Quiroz, L.E., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2012). Liver and cadmio toxicity. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology*, 1, 2-7

SEMARNAT (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-141SEMARNAT-2003. Que establece los requisitos para la caracterización del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación. 14 de enero de 2004.

SEMARNAT (2004). Secretaria del medio ambiente y recursos naturales. Dirección general del centro nacional de investigación y capacitación ambiental. Dirección de investigación en residuos peligrosos y proyectos regionales. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Tania, L. Volke Sepúlveda, J. Antonio Velasco Trejo, D. Alejandro de la Rosa Pérez, Gustavo Solórzano Ochoa. Etapa I.

SEMARNAT (2005). Secretaria del medio ambiente y recursos naturales. 2005. 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. Etapa II.

StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patolla, A. K., & Sutton, D.J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 133-153.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). The single cell gel /comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.

Toro, I. V., Manríquez, S. G & Suazo, G. I. 2010. Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28, 1-14.

Tortora G, J & Derrickson, B. H. (2006). Sistema esquelético: tejido óseo. En Principios de anatomía y fisiología (174-179). Buenos aires: Medica Panamericana.

Tovar-Sánchez, E., Cervantes, L.T., Martínez, C., Rojas, E., Valverde, M., Ortiz-Hernández, L., & Mussali-Galante, P. (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1677-1686.

Vázquez, L. A., & Morales, A. E. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Capítulo: 14 Microsatélites. *Secretaría de medio ambiente y Recursos Naturales*, 75-100.

Volke S.T. L., Velasco T. J. A., & De la Rosa P. D. A. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. SEMARNAT-INE. México. 141.

Von Osten, J. R. (2005) Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos. Golfo de México: contaminación e impacto Ambiental: diagnóstico y tendencias, 121-140.

Waalkers, M. P., Fox, D. A., States, J. C., Patierno, S. R., & McCabe M. J. (2000). Metals and disorders of cell accumulation: Modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicological Sciences*, 56, 255-261.

Wang, S & Shi, X. (2001). Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Biochemistry*, 222, 3-9.

Wang, H., He, L., Song, J., Cui, W., Zhang, Y., Jia, C., Francis, D., Rogers, H. J., Sun, L., Tai, P., Hui, X., Yang, Y., & Liu, W. (2016). Cadmium-induced genomic

instability in Arabidopsis: molecular toxicological biomarkers for early diagnosis of cadmium stress. *Chemosphere*, 150, 258-265.

White, T. A & Searle, J. B. (2008). Mandible assymetry and genetic diversity in island populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 636-641.

Yamaguchi, M., & Yamaguchi, R. (1986). Action of zinc on bone metabolism in rats. *Biochemical Pharmacology*, 35, 773-777.

Zamble, D., & Lippard, S. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends in Biochemical Science*, 20, 435-439.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: A microsatélite. Elsevier Academi Press, Nueva York y Londres. 1-457.

Zienolddiny, S., Svendsrud, D. H., Ryberg, D., Mikalsen, A. B., & Haugen, A. (2000). Nickel (II) induces microsatellite mutations in human lung cancer cell lines. *Mutation Research*, 452, 91-100.

Consultas en internet

Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano " Glosario Hablado de Términos Genéticos". Consultado el 14 de enero 2016, desde <https://www.genome.gov/glossaryS/?id=65>

Cámara Minera de México "mapas de indicadores mineros". Consultado el 14 de enero 2016, desde <https://camimex.org.mx>

The Global Source, The Silver Institute. Consultado el 1 de enero del 2016 desde <http://www.silverinstitute.org/site/publications>



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (Tutor principal)
Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Efraín Tovar Sánchez
Dra. Isela Hernández Plata

Tesis: "EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus melanophrys* QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

Alumno que la presenta a revisión: **JANETH ESTEVES AGUILAR**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

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
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (Tutor principal)
Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Efraín Tovar Sánchez
Dra. Isela Hernández Plata

Tesis: "EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus melanophrys* QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

Alumno que la presenta a revisión: **JANETH ESTEVES AGUILAR**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE


DRA. MA. LAURA ORTIZ HERNANDEZ



**Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 03/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (Tutor principal)
Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Efraín Tovar Sánchez
Dra. Isela Hernández Plata

Tesis: "EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus melanophrys* QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

Alumno que la presenta a revisión: **JANETH ESTEVES AGUILAR**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE


DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 03/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (Tutor principal)
Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Efraín Tovar Sánchez
Dra. Isela Hernández Plata

Tesis: "EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus melanophrys* QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

Alumno que la presenta a revisión: **JANETH ESTEVES AGUILAR**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. EFRAIN TOVAR SANCHEZ



**Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 03/12/18

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Patricia Mussali Galante (Tutor principal)
Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Dr. Edgar Dantan González
Dr. Efraín Tovar Sánchez
Dra. Isela Hernández Plata

Tesis: "EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y LA INESTABILIDAD EN EL DESARROLLO DEL CRÁNEO EN LA ESPECIE CENTINELA *Peromyscus melanophrys* QUE HABITA EN ZONAS MINERAS.

Alumno que la presenta a revisión: **JANETH ESTEVES AGUILAR**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. ISELA HERNANDEZ PLATA