



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



**EFFECTO DE LA BIACUMULACIÓN DE METALES EN LA  
POBLACIÓN DE *Liomys irroratus* (Gray 1868) QUE HABITA LOS  
JALES DE HUAUTLA, MORELOS: UN ENFOQUE  
MULTIBIOMARCADORES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A

NATALIA DE LA CRUZ GUARNEROS

TUTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE

Cuernavaca, Morelos

MAYO, 2018



## **AGRADECIMIENTOS**

A la maestría en Biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM por permitirme realizar mis estudios de posgrado. Asimismo, agradezco la beca otorgada por CONACyT (No.599201) para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

A la *DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE*, mi directora de tesis, por su orientación y supervisión continúa, pero sobre todo por su paciencia.

A la *DRA. LETICIA VALENCIA CUEVAS*, la *DRA. MA. LAURA ORTIZ HERNÁNDEZ*, al *DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ*, y al *DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ*, miembros del jurado revisor de mi tesis, por sus críticas y observaciones.

A todos los integrantes del Laboratorio de Investigaciones Ambientales del CEIB, y a los del Laboratorio de Marcadores Moleculares del CIByC, principalmente:

Al *M. en C. ALFREDO LÓPEZ CAAMAL* por explicarme los fundamentos de las técnicas de laboratorio y enseñarme a utilizar los programas necesarios para el análisis de los datos, por todas las horas de trabajo en las que estuvo a mi lado, por siempre pensar en una solución a todos los contratiempos que se presentaron, por las respuestas a mis miles de dudas, por su enorme paciencia, porque a pesar de todo me regaló de su tiempo y siempre estuvo ahí apoyándome incondicionalmente en todos los sentidos. ♡

A la *DRA. ISELA HERNÁNDEZ PLATA* por sus comentarios y sugerencias a este trabajo, por su apoyo en técnicas de laboratorio y su ayuda en las salidas de campo.

A la *LIC. ANAID FUENTES*, *BIÓL. JANETH ESTEVES*, la *M. en B. MAGALI SOLIS*, la *M. en B. ANA KAREN FLORES*, al *M. en B. MIGUEL SANTOYO*, y al *BIÓL. MARCOS ROSAS* por todo el apoyo que me brindaron, ya fuera en trabajo de laboratorio y/o en salidas a campo.

A la Estación Biológica de Quilamula, principalmente al *SR. GOYO*, al *SR. LUCAS* y al *SR. AMADO* por toda la ayuda brindada durante mi estancia en la estación.

*A MIS PADRES*



## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Minería en México y contaminación ambiental	3
Metales: mecanismos de toxicidad	4
Biomarcadores y su importancia en estudios ecotoxicológicos	7
Biomarcadores de moléculas a individuos	8
Biomarcadores a nivel de población: efectos permanentes	9
Biomarcadores a nivel de comunidad y ecosistema	11
Especies centinelas como modelo para estudios ecotoxicológicos	11
ANTECEDENTES	12
Contaminación por metales en Huautla, Morelos	12
Mamíferos pequeños como especies centinelas para biomonitoreo ambiental	14
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	17
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Sitios de estudio	17
Especie de estudio: <i>Liomys irroratus</i> (Gray, 1868)	20
Muestreo de <i>Liomys irroratus</i>	21
Daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de <i>Liomys irroratus</i>	21
Concentración de metales en hígado de <i>Liomys irroratus</i>	22
Estructura y diversidad genética de población de <i>Liomys irroratus</i>	23

Extracción de ADN	23
Amplificación de microsatélites en PCR	23
Análisis de la estructura y diversidad genética	25
RESULTADOS	27
Concentración de metales en hígado de <i>Liomys irroratus</i>	27
Daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de <i>Limoyis irroratus</i>	27
Correlación entre la concentración de metales en hígado y daño genético de individuos de <i>Liomys irroratus</i>	30
Estructura y diversidad genética en poblaciones de <i>Liomys irroratus</i>	31
Extracción de ADN de hígado de <i>Liomys irroratus</i>	31
Amplificación de los microsatélites por PCR.	32
Diversidad genética poblacional de <i>Liomys irroratus</i>	35
Estructura poblacional de <i>Liomys irroratus</i>	37
Índice de parentesco de <i>Liomys irroratus</i>	38
Correlación entre el índice de parentesco y la acumulación de metales en hígado de individuos de <i>Liomys irroratus</i>	40
Correlación entre el índice de parentesco y el daño genético observado en los individuos de <i>Liomys irroratus</i>	41
DISCUSIÓN	42
Bioacumulación de metales en hígado de <i>Liomys irroratus</i>	42
Daño genético en <i>Liomys irroratus</i> y su relación con la concentración de metales en hígado de estos individuos	45
Estructura y diversidad genética en población de <i>Liomys irroratus</i>	49
<i>Liomys irroratus</i> como especie centinela	53
CONCLUSIONES	56
LITERATURA CITADA	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de la localización geográfica de los sitios de estudio	18
Figura 2.	Sitio expuesto en Huautla, Tlaquiltenango, Morelos (Jale 1)	19
Figura 3.	Sitio expuesto en Huautla, Tlaquiltenango, Morelos (Jale 2)	19
Figura 4.	Daño genético (rompimiento de cadena sencilla, micras) en individuos de <i>Liomys irroratus</i> por sitio de estudio	28
Figura 5.	Niveles de rompimiento de cadena sencilla por individuo	29
Figura 6.	ADN extraído de hígado de individuos de <i>Liomys irroratus</i>	31
Figura 7.	Electroforesis de los siete microsatélites amplificados para <i>Liomys irroratus</i>	33
Figura 8.	Electroferogramas	34
Figura 9.	Índice de parentesco de las poblaciones analizadas en los tres sitios de estudio	39
Figura 10.	Relación entre el índice de parentesco y el daño genético presentado en los individuos de <i>Liomys irroratus</i>	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias de cebadores de <i>Liomys pictus</i>	24
Tabla 2.	Programas de PCR utilizados para la amplificación de los distintos cebadores de la serie <i>Liomys pictus</i>	24
Tabla 3.	Concentración promedio ( $\pm$ desviación estándar) de metales en hígado de <i>Liomys irroratus</i>	27
Tabla 4.	Efecto de la concentración de cada metal sobre los niveles de rompimiento de cadena sencilla del ADN de <i>Liomys irroratus</i>	30
Tabla 5.	Estimación de la diversidad genética de las poblaciones de <i>Liomys irroratus</i> en los tres sitios de estudio	36
Tabla 6.	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) usando $F_{ST}$ y $R_{ST}$ para <i>Liomys irroratus</i>	37
Tabla 7.	Análisis pareados de $F_{ST}$ y $R_{ST}$	38
Tabla 8.	Efecto de la concentración de cada metal sobre el índice de parentesco de <i>Liomys irroratus</i>	40

## RESUMEN

La industria minera es una actividad importante debido a que contribuye con el cuatro por ciento del Producto Interno Bruto Nacional en México. Desafortunadamente, la explotación de estos recursos genera gran cantidad de contaminantes, representando para México el 65% del total de los residuos industriales producidos. Principalmente, su contenido de metales pesados constituye una fuente importante de contaminación de los recursos naturales. En particular, en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos se han detectado 780 mil toneladas de residuos mineros en donde los metales disponibles son arsénico, cadmio, cobre, hierro, manganeso, plomo, y zinc. Lo anterior, ha afectado a la población humana y a la biota circundante, lo que también podría comprometer el equilibrio del ecosistema. Por ello, es importante el realizar estudios ecotoxicológicos utilizando biomarcadores en distintos niveles de organización biológica que evalúen el efecto de los metales sobre los individuos y las poblaciones de animales silvestres que están expuestos a los residuos localizados en esta región, y así realizar una propuesta de un organismo centinela que genere información para programas de biomonitoreo ambiental y salud humana. Dentro de los biomarcadores más utilizados en estudios de ecotoxicología se incluyen la cuantificación del daño genético (biomarcador de efecto temprano) y los cambios en la estructura y diversidad genética de las poblaciones silvestres (biomarcadores permanentes). Por lo tanto, para fines de este proyecto, se colectó la sangre de 43 individuos de *Liomys irroratus*, roedor que habita en los jales ubicados en Huautla, y de 32 individuos del sitio testigo (Quilamula) para el análisis del daño genético. Además, el hígado de cada uno de los individuos fue utilizado para extraer el ADN para su amplificación con siete cebadores de microsatélites mediante PCR, y así poder inferir el efecto de los metales sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones expuestas. En este trabajo se observó que los individuos de *L. irroratus* están expuestos a una mezcla de metales, ya que se encontró bioacumulación de aluminio, cobre, hierro, níquel, plomo, y zinc en hígado de estos individuos. Los individuos colectados en los jales, presentaron un enriquecimiento mayor en la bioacumulación de metales en comparación con los

individuos colectados en el sitio testigo. Así mismo, los individuos que presentaron significativamente una mayor fragmentación del ADN fueron los colectados en los jales. Sin embargo, no se observa una estructuración genética entre los individuos colectados de los distintos sitios de estudio, por lo cual, *L. irroratus* no puede ser considerado una especie centinela en estudios ecotoxicológicos.

## INTRODUCCIÓN

### Minería en México y contaminación ambiental

La minería es una de las principales fuentes de contaminación ambiental de origen antropogénico y una de las principales actividades económicas de mayor tradición en México. Las 32 entidades federativas de la república mexicana registran yacimientos mineros, debido a que se encuentra localizada en una región volcánica rica en minerales (Volke *et al.*, 2005). En este país, se extraen minerales metálicos como: bismuto (Bi), cadmio (Cd), cobre (Cu), molibdeno (Mo), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Volke & Velasco, 2002; Velasco *et al.*, 2004; Pérez, 2014; SE, 2017), ocupando el primer lugar en la producción de Ag a nivel mundial (SE, 2017). La minería es una de las principales fuentes de ingreso económico desde el periodo de la colonia (Volke *et al.*, 2005; Pérez, 2014), y actualmente representa el cuatro por ciento del Producto Interno Bruto Nacional (SE, 2017). Es el principal suministro de insumos a industrias de construcción, metalúrgica, siderúrgica, química y electrónica, generando infraestructura para el desarrollo del país (Volke & Velasco, 2002; Volke *et al.*, 2005). Sin embargo, la minería genera el 65% del total de los residuos industriales (INEGI, 2010), debido a que los suelos, el aire y los cuerpos de agua son contaminados por derrames, fugas, incendios y acumulación clandestina de residuos peligrosos generados de los procesos que se llevan a cabo para la extracción de los minerales con valor económico (Volke *et al.*, 2005), además de un manejo inadecuado del cierre de minas y de los residuos mineros (Velasco *et al.*, 2004).

En particular, a los residuos mineros se les conoce como jales (del náhuatl “*xalli*” que significa, arenas finas) o relaves mineros, los cuales, son sitios de acumulación de residuos sólidos producidos por los procesos llevados a cabo para la extracción de los minerales de interés (Volke *et al.*, 2005). Los residuos contienen altos niveles de elementos potencialmente tóxicos (EPT), como arsénico (As), selenio (Se), Pb, Cd, entre otros metales pesados (Armienta *et al.*, 2005; Volke *et al.*, 2005). Por lo anterior, los jales son considerados una fuente de contaminación importante que provocan la acidificación del suelo, generan drenaje ácido o lixiviados que contaminan el medio circundante (Armienta *et al.*, 2005).

Sin embargo, se desconoce el número de jales que se encuentran en México y las condiciones de seguridad ambiental en las que se encuentran (Volke *et al.*, 2005). La acumulación de residuos producidos por la industria minera no estaba controlada, sino hasta el 2004, año en el que se aprobó la norma de disposición de jales, NOM-141-SEMARNAT-2004, la cual sólo aplica para proyectos iniciados a partir de ese año (SEMARNAT, 2004). En México existe la acumulación de estos residuos mineros en estados como Baja California Sur, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, debido a la actividad minera registrada en cada uno de ellos (SEMARNAT, 2004; Velasco *et al.*, 2004).

### **Metales: mecanismos de toxicidad**

Los metales pueden estar presentes en el ambiente de forma natural debido a la historia geológica del área, sin embargo, el aumento de las actividades humanas ha jugado un papel importante en su incremento en el ambiente a través del tiempo, acumulándose localmente y bioacumulándose en los organismos vivos que se encuentran expuestos a los metales en sitios contaminados (Jaishankar *et al.*, 2014).

Los metales son definidos como cualquier elemento que es buen conductor de calor y electricidad, químicamente tienden a perder electrones para formar iones positivos, además de que presentan una densidad superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  en su forma elemental (Jaishankar *et al.*, 2014). Sin embargo, no es una definición estricta, ya que incluye a algunos elementos como el As y el Se que no son metales, sino metaloides, los cuales tienen propiedades tanto de los metales como de los no metales (McLean *et al.*, 1996). Estos elementos químicos han sido clasificados entre las sustancias más tóxicas, por sus propiedades de bioacumulación (WHO, 2007) y de óxido-reducción (Jaishankar *et al.*, 2014). La bioacumulación se refiere a cierta cantidad de dicha sustancia que no es metabolizada ni excretada, acumulándose en el tejido de los organismos, lo que le permite entrar y permanecer en la cadena trófica amplificándose en cada nivel de la cadena, proceso que se conoce como biomagnificación (Teitelbaum, 2012). Mientras que

la propiedad de óxido-reducción hace posible la evasión de mecanismos de control como la homeostasis, transporte y compartimentalización celular (Jaishankar *et al.*, 2014). Los metales cuando evaden los mecanismos de control pueden causar daño celular a través de dos mecanismos: 1) Estrés oxidativo, el cual se da por un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y aniones superóxidos ( $O_2^-$ ) (Hartwig, 2000; Jaishankar *et al.*, 2014), y/o especies reactivas de nitrógeno (ERN), así como el agotamiento de reservas intracelulares de antioxidantes y la inhibición de la actividad enzimática que participa en el metabolismo y desintoxicación de ERO (Jan *et al.*, 2015). Este mecanismo puede causar daño oxidante a diversas proteínas, lípidos pero principalmente al ADN (Jaishankar *et al.*, 2014). 2) Unión a distintas macromoléculas, lo que deriva en un cambio conformacional o remplazo de sus sitios activos o sitios de unión a cationes divalentes y monovalentes esenciales como  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  (Jaishankar *et al.*, 2014); algunos ejemplos de metales que utilizan estos mecanismos de toxicidad son el As, Cu (Leonard *et al.*, 2004), aluminio (Al), Cd, cromo (Cr), hierro (Fe) y Pb (Jaishankar *et al.*, 2014). Ambos mecanismos alteran la homeostasis celular debido a que afecta la señalización intra e intercelular, el plegamiento de proteínas y por ende su actividad, alteración de las enzimas involucradas en la reparación del material genético, la alteración de la liberación de neurotransmisores, la regulación de factores de transcripción, entre otros efectos, generando un mal funcionamiento de la célula (Hartwig, 2000; Leonard *et al.*, 2004; Jaishankar *et al.*, 2014). De manera particular, el Cd puede interferir en la actividad biológica de proteínas uniéndose y desplazando a metales esenciales, por ejemplo, uniéndose a grupos tiol (-SH) libres, catalizando la oxidación del lado amino de la cadena e interfiriendo en el plegamiento de la estructura terciaria (Jan *et al.*, 2015). Elementos como el mercurio (Hg), As y Pb, pueden formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y acumularse en las células (Volke *et al.*, 2005).

En general, los metales pesados causan daño genotóxico, como es el rompimiento de cadenas dobles o sencillas del ADN, mutaciones (Leonard *et al.*, 2004), aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas,

formación de micronúcleos, oxidación y alquilación de bases nitrogenadas (Mussali-Galante *et al.*, 2013a), formación de aductos y alteración de la regulación genética (Hartwig, 2000); de forma directa o indirectamente a través de la producción de estrés oxidativo (Mussali-Galante *et al.*, 2013a).

A pesar de que los metales se identifican como sustancias potencialmente tóxicas para los organismos vivos, existen metales que son esenciales para el buen funcionamiento del organismo, por ejemplo, el calcio (Ca), potasio (K) y sodio (Na). Otros metales como el Se, Zn (Jan *et al.*, 2015), cobalto (Co), Cr, Cu, Fe, níquel (Ni) y manganeso (Mn) están en bajas concentraciones en los organismos pero en dosis altas pueden ser tóxicos (Volke *et al.*, 2005; Valavanidis & Vlachogianni, 2010). Por otra parte, están los metales que no son necesarios para el metabolismo y que son altamente tóxicos en dosis muy bajas como, el As, estaño (Sn), Hg y Pb (Valavanidis & Vlachogianni, 2010). Sin embargo, la toxicidad que presente un metal es realmente distinta, ya que depende de diversos factores que rodean tanto al compuesto químico como al organismo.

La toxicidad en los organismos puede ser definida de acuerdo a la cantidad absorbida, el tipo y tiempo de exposición (Leonard *et al.*, 2004; Jaishankar *et al.*, 2014), el género (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007; Tovar-Sánchez *et al.*, 2012) y el estado ontogénico del organismo (Palanza *et al.*, 2002; Sánchez-Chardi *et al.*, 2007). Otro punto importante es la forma en que son metabolizados dentro del organismo, puesto que pueden ser convertidos a productos más o menos tóxicos. El As, por ejemplo, puede ser metabolizado generando varios metabolitos finales teniendo diferentes caminos, como el ácido monometilarsénico V (MMA) y el ácido dimetilarsénico V (DMA) que al final son excretados del organismo a través de la orina, la transformación de arsénico a arsénico metilado (MMA V y DMA V) es un proceso enzimático de detoxificación. De manera contraria, el MMA III es altamente tóxico para el organismo, no es excretado y permanece dentro de la célula como un producto intermediario (Jaishankar *et al.*, 2014). Otro metal que es metabolizado a un producto potencialmente tóxico es el mercurio que dentro de los organismos es biotransformado a su forma orgánica metilmercurio (Jaishankar *et al.*, 2014); un metal que es metabolizado a un producto menos tóxico es el

cromo, este metal en su forma hexavalente Cr VI es más tóxico debido a la mayor permeabilidad que presenta. Dentro de la célula eventualmente es reducido en su forma trivalente (Cr III) que es menos tóxico, sin embargo, en este proceso se genera estrés oxidativo (Hartwig, 2000; Jaishankar *et al.*, 2014). Por otro lado, también el estado en el que se encuentran los metales en el ambiente, ya sea en conjunto con otras sustancias químicas o aislados (Wright *et al.*, 2007), sus propiedades físico-químicas (Palanza *et al.*, 2002) y las características del entorno pueden cambiar el estado de oxidación, movilidad en el ambiente y así su toxicidad (McLean *et al.*, 1996; Armienta *et al.*, 2005; Volke *et al.*, 2005), siendo factores determinantes de la biodisponibilidad de un metal, es decir, fracciones disponibles que pueden ser absorbidas por un organismo (Armienta *et al.*, 2005; Jan *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015).

### **Biomarcadores y su importancia en estudios ecotoxicológicos**

Generalmente nos referimos a los metales y su toxicidad a nivel de individuo, lo cual es muy común debido a que tienen un efecto inmediato a nivel celular y molecular. Sin embargo, existen efectos emergentes que se extienden a nivel de población, alterando la diversidad genética dentro y entre poblaciones, y por ende la dinámica del ecosistema (Bickham *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2007). La ecotoxicología estudia los efectos emergentes dados en niveles de organización biológica más complejos como lo es la población. Sin embargo, la escala de tiempo mayor y la serie de factores ambientales que influyen en este nivel de organización hace complicado establecer una conexión que pruebe que la exposición a cierto tóxico está alterando las propiedades emergentes de la población (Mussali-Galante *et al.*, 2013a, 2014). Esto ha impulsado la generación de información para el establecimiento de “señales tempranas de alerta” mediante el uso de biomarcadores que reflejen los efectos por contaminantes ambientales (NRC, 1987; Bickham *et al.*, 2000). De acuerdo a *The National Research Council* (NRC, 1987), los biomarcadores son definidos como “indicadores de eventos en sistemas biológicos o muestras” y los clasifica en tres categorías: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Sin embargo, esta clasificación sólo

hace referencia a biomarcadores a nivel de molécula, célula e individuo. En los estudios ecotoxicológicos es importante considerar además otro tipo de biomarcadores que abarquen niveles de organización más complejos como la población, la comunidad y el ecosistema. Este enfoque ha permitido ampliar el concepto de biomarcador como “identificación de cambios específicos moleculares, bioquímicos, fisiológicos y etológicos en poblaciones expuestas a contaminantes” (Handy *et al.*, 2003). Algo que se debe tener en cuenta es que existe variabilidad en la respuesta de los marcadores biológicos. Esto puede ser atribuido a los factores abióticos como temperatura, oxígeno, pH, entre otros; y a factores bióticos como genotipo, plasticidad fenotípica, tolerancia, edad, género, talla, etc. Tanto los factores abióticos como bióticos a su vez varían en el tiempo y en el espacio (Handy *et al.*, 2003).

### ***Biomarcadores de moléculas a individuos***

Los biomarcadores de exposición nos dan información acerca de la dosis actual de una sustancia dentro de un organismo (Handy *et al.*, 2003), el cual puede ser medido en varios tipos celulares, órganos o fluidos del organismo. Estos tipos de biomarcadores también son conocidos como “dosímetros biológicos” o “biomarcadores de dosis interna”, algunos ejemplos son la cantidad acumulada (bioacumulación) en uñas, pelo, sangre y órganos. Sin embargo, cuando es medible el producto temprano de la interacción de la célula y la sustancia química son denominados “biomarcadores de dosis efectiva biológica”, un ejemplo de estos son los adúctos en el ADN (NRC, 1987; Mussali-Galante *et al.*, 2013a).

Otro tipo de biomarcadores son los de efecto, los cuales son alteraciones bioquímicas, genéticas, fisiológicas o etológicas medibles dentro de un organismo que depende de la magnitud y que puede asociarse posteriormente con problemas de salud (NRC, 1987). Dentro de este tipo de biomarcadores, aquellos que miden daño genético han sido ampliamente utilizados. El daño genotóxico puede ser evaluado a través de las aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y rompimiento de cadena sencilla y doble del ADN (Mussali-Galante *et al.*, 2013a). La técnica de electroforesis unicelular alcalina o “ensayo cometa” es la

más utilizada y es una de las principales herramientas para estudios de biomonitorio ambiental, ya que es una técnica rápida, simple y sensible que se utiliza para el análisis de rompimiento de cadena sencilla y doble del ADN, sitios lábiles alcalinos y para la detección de sitios de reparación retardada (Rojas *et al.*, 1999). Es una técnica dependiente del pH y se realiza en cualquier tipo de células eucarióticas individuales, además de que sólo necesita poca muestra (Rojas *et al.*, 1999).

Por otra parte, los biomarcadores de susceptibilidad, son indicadores de una habilidad adquirida o inherente de un organismo para responder a la exposición a un tóxico específico (Mussali-Galante *et al.*, 2013a). La respuesta de los organismos hacia los contaminantes puede ser muy variable debido a que el metabolismo, los niveles de inmunoglobulinas, la capacidad de reserva en órganos, entre otros, pueden ser determinados a través de factores genéticos o ambientales (NRC, 1987).

### ***Biomarcadores a nivel de población: efectos permanentes***

A nivel poblacional, los parámetros de diversidad genética son importantes, ya que proporcionan información importante sobre la dinámica de las frecuencias alélicas, a través del tiempo, que se han dado dentro y entre poblaciones, lo cual permite que sea una herramienta esencial en estudios ecotoxicológicos (Bickham *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2007). Es normal que las frecuencias alélicas de una población vayan cambiando de forma dinámica a través del tiempo, esto sucede desde hace millones de años y tienen lugar dentro de lapsos de tiempo largos, siglos o milenios, por consecuencia de las fuerzas evolutivas: flujo génico, mutaciones, endogamia, selección natural y deriva génica (Mussali-Galante *et al.*, 2014). Sin embargo, la destrucción de hábitats naturales y el aumento de contaminantes, como los metales, aceleran los procesos evolutivos ocurriendo en un lapso de tiempo corto, en años o después de pocas generaciones (Bickham *et al.*, 2000; Hoffmann & Dabron, 2007; Medina *et al.*, 2007). Estos cambios fueron definidos por Medina y colaboradores (2007) como “microevolución debido a la contaminación”.

El monitoreo de patrones genéticos de poblaciones silvestres hace posible la evaluación de impactos ambientales en un sistema natural, a estos patrones se les denomina marcadores biológicos neutros, por ser secuencias de ADN polimórficas dentro de una población o especie que no se encuentran bajo selección (Arif & Khan, 2009). El uso de estas secuencias polimórficas ayudan a la estimación de la diversidad y estructura genética de poblaciones, ya que informan sobre los procesos demográficos y pueden arrojar información acerca de los cambios en el tamaño de la población derivados de alteraciones ambientales y adaptación (Bickham *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2007, Arif & Khan, 2009).

Dentro de los marcadores biológicos neutros que se utilizan en estudios ecotoxicológicos se pueden mencionar el ADN mitocondrial (ADNmt), ADN nuclear (ADNn), las aloenzimas, los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), los microsátélites o secuencia simple repetitiva (SSR, por sus siglas en inglés), entre otros (Hoffman & Dabron, 2007; Arif & Khan, 2009). Sin embargo, los SSR son considerados uno de los marcadores genéticos más informativos y utilizados, debido a que poca cantidad de ADN es suficiente para ser analizado, su expresión codominante permite la identificación de homocigotos y heterocigotos, por su amplia distribución tanto en regiones codificadoras como en no codificadoras del genoma y sus niveles altos de polimorfismo dada por la alta tasa de mutación de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por generación (Arif & Khan, 2009; Mussali-Galante *et al.*, 2014).

Algo importante de mencionar, es que cuando la variabilidad genética se pierde, la población no puede regresar a su estado inicial, lo que, se vuelve un cambio permanente. Por ende, se sugiere que los cambios tanto del reservorio genético como de los patrones de distribución de la diversidad genética de las poblaciones expuestas, pueden ser un biomarcador predictivo de la salud del ecosistema. Estos cambios fueron denominados por Mussali-Galante y colaboradores (2014) como “biomarcador de efecto permanente” y definiéndolo como “medición de cambio o alteración en procesos biológicos y/o químicos que una vez alterados no vuelven a la forma original”. Debido a que la variación genética es la base de la biodiversidad y evolución (Medina *et al.*, 2007), y a que

la pérdida de variabilidad puede ser permanente dependiente del tamaño de la población y de la tasa de mutación, investigar cómo los químicos ejercen sus efectos sobre la estructura genética de las poblaciones, es una prioridad en programas de biomonitoreo ambiental y conservación (Mussali-Galante *et al.*, 2014).

### ***Biomarcadores a nivel de comunidad y ecosistema***

Los estudios a nivel de comunidad y ecosistema se vuelven aún más complejos, debido a la dificultad de relacionar los efectos de la exposición a un contaminante con los cambios que se puedan observar en estos niveles, además de que estas alteraciones pueden derivar en efectos evolutivos (Medina *et al.*, 2007). Los cambios en la composición, riqueza y diversidad de especies forman parte de los indicadores de alteración en una comunidad (Mussali-Galante *et al.*, 2013a); y a nivel de ecosistema, el cambio de su dinámica es señal de alteración, como por ejemplo: la pérdida de una especie clave desequilibra los niveles por arriba y debajo de la cadena trófica llegando a afectar todo el ecosistema (Medina *et al.*, 2007).

### **Especies centinelas como modelo para estudios ecotoxicológicos**

Las especies centinelas son piezas clave en estudios ecotoxicológicos debido a que muestran la relación entre la exposición y el efecto de los contaminantes, como los metales, en cada nivel de organización biológica (Basu *et al.*, 2007; Mussali-Galante *et al.*, 2014). Son bioindicadores que evalúan la presencia y aumento de un agente tóxico, además de proporcionar información del tipo, cantidad, disponibilidad y los efectos de la exposición a través del tiempo (Basu *et al.*, 2007; Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). No todas las especies pueden ser consideradas una especie centinela, ésta se debe caracterizar por, tener una amplia distribución geográfica, gran abundancia, hábitos alimenticios generalistas, ciclos de vida cortos, altas tasas reproductivas, captura fácil, amplio conocimiento de su biología, habilidad para bioacumular contaminantes, capacidad de reproducción en cautiverio, fácil determinación de la especie, áreas de actividad

reducida y sensibilidad a contaminantes (Beeny, 2001; Basu *et al.*, 2007; Levengood & Heske, 2008).

Por lo anterior, el uso de especies centinelas en estudios ecotoxicológicos se vuelve importante debido a que se puede generar información para el biomonitoreo ambiental y programas de conservación en beneficio de otras especies, incluido el humano (Valavanidis & Vlachogianni, 2010; Mussali-Galante *et al.*, 2013a).

## **ANTECEDENTES**

### **Contaminación por metales en Huautla, Morelos**

En el estado de Morelos se ha documentado una gran cantidad de minerales no metálicos, y varias plantas para su transformación como, cementeras, caleras y plantas de trituración para agregados pétreos y carbonato de calcio, además de calcinadores de yeso, bancos de basalto, tezontle, mármol, y otros para la industria de la construcción (SE, 2014). La extracción de minerales no metálicos tiene relevancia en el fortalecimiento de la economía de la entidad. Por su parte, el potencial de los minerales metálicos se restringen al distrito minero de Huautla, región que se localiza en el municipio de Tlaquiltenango, al sur del estado de Morelos (SE, 2014). Huautla fue un municipio minero orientado especialmente en la extracción de Pb, Ag, Au, Cu y Zn (Velasco *et al.*, 2004; SE, 2014) del siglo XVI hasta 1988, finalizando su explotación en 1993 (Velasco *et al.*, 2004), y en 1996 se decretó la zona como patrimonio de la humanidad por la UNESCO, encontrándose dentro de una reserva natural protegida conocida como: “Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH)”, por ende, las zonas explotadas por la industria minera quedaron dentro de esta área (SEMARNAT, 2004).

Debido a las actividades de minería que hubo en su tiempo en esta zona, en sus alrededores se encuentran varios jales, los cuales no recibieron tratamiento para reducir el impacto ambiental (Volke *et al.*, 2005; SEMARNAT, 2005). Se estima que hay alrededor de 780 mil toneladas de residuos mineros en la zona (SEMARNAT, 2005), donde los principales contaminantes son metales como el Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn (Solís-Miranda, 2016). Los jales se encuentran a cielo

abierto y sin ningún tipo de cuidado, a pesar de las altas concentraciones que se han detectado de Cd (27.05 mg/kg) y Zn (2778.42 mg/kg) (Solís-Miranda, 2016), las cuales rebasan los límites máximos permisibles (LMP) en normas internacionales, 1 mg/kg y 150 mg/kg, respectivamente (U.S. EPA, 2007), y de Pb (3340 mg/kg) y As (274 mg/kg) (SEMARNAT 2005; Tovar-Sánchez *et al.*, 2016), los cuales rebasan los LMP internacionales, así como nacionales propuestos por la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, As (20 mg/Kg suelo residencial y 40 mg/Kg suelo industrial) y para Pb (200 mg/kg residencial y 1500 mg/Kg industrial). Además, Solís-Miranda (2016) reportó los porcentajes de biodisponibilidad de Pb (45.2-78.3%), Cd (18.9-44.1%), Cu (72.9-83.3%), Zn (26.1-53.55%), Mn (36.3-54.4%) y Fe (12.45-27.9%).

Esto representa un gran riesgo, ya que los jales se encuentran ubicados a unos 500 m del poblado de Huautla y cercanos al “Arroyo Chico” que se junta con los arroyos Juchitlán, Salitre y Atlipa formando el “Arroyo Grande”, el cual desemboca en el Río Amacuzac (Velasco *et al.*, 2004; SEMARNAT, 2005), por lo que, la lixiviación de estos metales hacia los cuerpos de agua superficiales y subterráneos y el transporte a otras regiones, tiene una gran probabilidad de ocurrir. Aunado a esto, su clima semiárido influye en la dispersión eólica de los jales (Mussali-Galante *et al.*, 2013b).

Existen estudios realizados en la zona, donde reportan una concentración mayor de metales en especies vegetales colectadas en los jales, así como variación morfológica (Hernández-Lorenzo, 2014) y daño genético (Murillo-Herrera, 2015) en *Prosopis leavigata* y *Acacia farnesiana* (Santoyo-Martínez, 2016) en comparación con las colectadas en sitios testigo. Por otra parte, también se han realizado trabajos importantes donde se observa el efecto de metales en poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas a los jales. Tovar-Sánchez y colaboradores (2016), evaluaron la concentración de arsénico en agua de bebida y sangre periférica de pobladores de Huautla. El agua es obtenida de la mina “Pájaro Verde” donde se registraron niveles altos de As ( $0.24 \pm 0.008 \mu\text{g/mL}$ ), excediendo la norma nacional NOM-127-SSA1-1994 ( $0.025 \mu\text{g/mL}$ ) y las normas internacionales de *World Health Organization* ( $0.010 \mu\text{g/mL}$ ). Además, esto se

correlacionó positivamente con la concentración de As en sangre (60 µg/L) y el daño genético que presentaron los individuos expuestos, con respecto al sitio testigo.

### **Mamíferos pequeños como especies centinelas para biomonitoreo ambiental**

En general, varias especies silvestres se han utilizado como especies centinelas en estudios ecotoxicológicos, ejemplos de estas son las lombrices (Peles *et al.*, 2003), los caracoles de jardín (Nedjoud *et al.*, 2009), las aves marinas (Burger & Gochfeld, 2004), y los cangrejos (Anton, 2000). Sin embargo, los mamíferos pequeños han sido excelentes candidatos para ser organismos centinelas debido a que tiene un papel ecológico importante como intermediarios en la transferencia de metales en la cadena trófica debido a que están en contacto con los contaminantes que se encuentran en suelo y agua a través de los alimentos que consumen como insectos, plantas y semillas, a su vez, los mamíferos pequeños sirven de alimento para otras especies de mayor tamaño (Levengood & Heske, 2008). Asimismo, muchas de sus especies presentan una amplia distribución geográfica, tienen una gran abundancia, ciclos de vida cortos y su genoma se encuentra ampliamente estudiado (Levengood & Heske, 2008). Otro punto importante en el uso de mamíferos para este tipo de estudios es la similitud de sus sistemas fisiológicos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los tóxicos, con los de humanos (Basu *et al.*, 2007).

Algunos ejemplos de especies de mamíferos pequeños que han sido utilizados como centinelas son: *Apodemus sylvaticus*, *Microtus agrestis*, *Sorex araneus* (Cooke *et al.*, 1990), *Peromyscus maniculatus* (Laurinolli & Bendell-Young, 1996; Rodríguez-Estival & Smits, 2016), *Clethrionomys glareolus* (Milton *et al.*, 2003), *Crociodura russula* (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007), *Apodemus sylvaticus* (Tête *et al.*, 2015). En particular, Tovar-Sánchez y colaboradores (2012) realizaron un trabajo en los jales del poblado de Huautla, en el cual se evaluó el efecto genotóxico de los metales en la especie *Baiomys musculus*, que fue propuesta como centinela, y *Peromyscus melanophrys*. Los resultados muestran que los individuos expuestos a jales mineros tienen un rompimiento de cadena sencilla significativamente mayor

con respecto al sitio testigo (Quilamula). Asimismo, reportaron bioacumulación de metales (Fe, Mn, Ni, y Zn) en hueso e hígado. Además, Mussali-Galante y colaboradores (2013b), reportaron que existe bioacumulación de metales (Al, As, Cd, Cu y Pb) en riñones y que la exposición a metales es uno de los principales factores que alteran la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *P. melanophrys*. En particular, se observó una disminución en la densidad de las poblaciones expuestas y la tasa de migración, un aumento en los niveles de endogamia, así como una distancia genética significativa entre la población expuesta y la testigo, es decir, que son diferentes genéticamente.

En el distrito minero de Huautla, las especies de roedores más abundantes son *Baiomys musculus* con el 47.76%, *Liomys irroratus* con el 35.01%, *Peromyscus levipes* y *Peromyscus melanophrys* con el 15.21% en conjunto (Cadena, 2003). *L. irroratus* es una de las especies dominantes en términos de abundancia relativa en la REBIOSH (Cadena, 2003). Este roedor habita en los jales de la región y no se ha evaluado en cuanto a su potencial como especie centinela para estudios de ecotoxicología. Datos de nuestro grupo de trabajo apuntan a que esta especie puede ser afectada por los metales ya que algunos individuos han presentado daño genético.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las evidencias antes mencionadas, demuestran que los recursos naturales de Huautla están contaminados por metales provenientes de los jales de la región, debido a la actividad minera que existió en ese lugar. Lo anterior, ha afectado a la población humana y a la biota circundante, lo que podría comprometer el equilibrio del ecosistema. La suma de estas situaciones hace importante realizar estudios ecotoxicológicos en donde se evalúe la presencia de metales y los efectos de éstos sobre las poblaciones de animales silvestres que habitan en los jales de esta región. Además, con el empleo de biomarcadores en distintos niveles de organización biológica se podría inferir el impacto que tienen los metales a nivel del ecosistema. Sin embargo, a pesar de que los mamíferos pequeños juegan un papel ecológico importante y aunque son considerados como bioindicadores de contaminación, no existen trabajos que evalúen la relación entre la exposición a los jales de Huautla, el daño genético y cambios sobre la estructura y diversidad genética de las poblaciones de un mamífero dominante en términos de abundancia relativa en Sierra de Huautla, *Liomys irroratus*.

## **HIPÓTESIS**

Debido a que en los jales de Huautla, Morelos se encuentran metales biodisponibles, se espera que las poblaciones de *L. irroratus* asociados a los jales bioacumulen metales, por ende se espera la elevación del nivel de daño genético de los individuos y la reducción de la diversidad genética de la población.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar el efecto de la bioacumulación de metales pesados en *Liomys irroratus* en términos de daño genético y diversidad genética en poblaciones asociadas a jales de Huautla, Morelos y comparar con los individuos del sitio testigo.

### **Objetivos particulares**

- 1) Analizar la bioacumulación de Al, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn (biomarcador de exposición) en hígado de individuos de *L. irroratus* que habitan en los jales y en individuos de los sitios testigo.
- 2) Evaluar la inducción de daño genético (biomarcador de efecto temprano. Rompimientos de cadena de ADN) en linfocitos de sangre periférica de *L. irroratus* que habitan en los jales y en individuos de los sitios testigo.
- 3) Evaluar la estructura y diversidad genética (biomarcador permanente) de las poblaciones de *L. irroratus* que habitan en los jales y en los sitios testigo.
- 4) Con base a los resultados obtenidos analizar si *L. irroratus* puede ser considerada una especie centinela de contaminación ambiental por metales.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

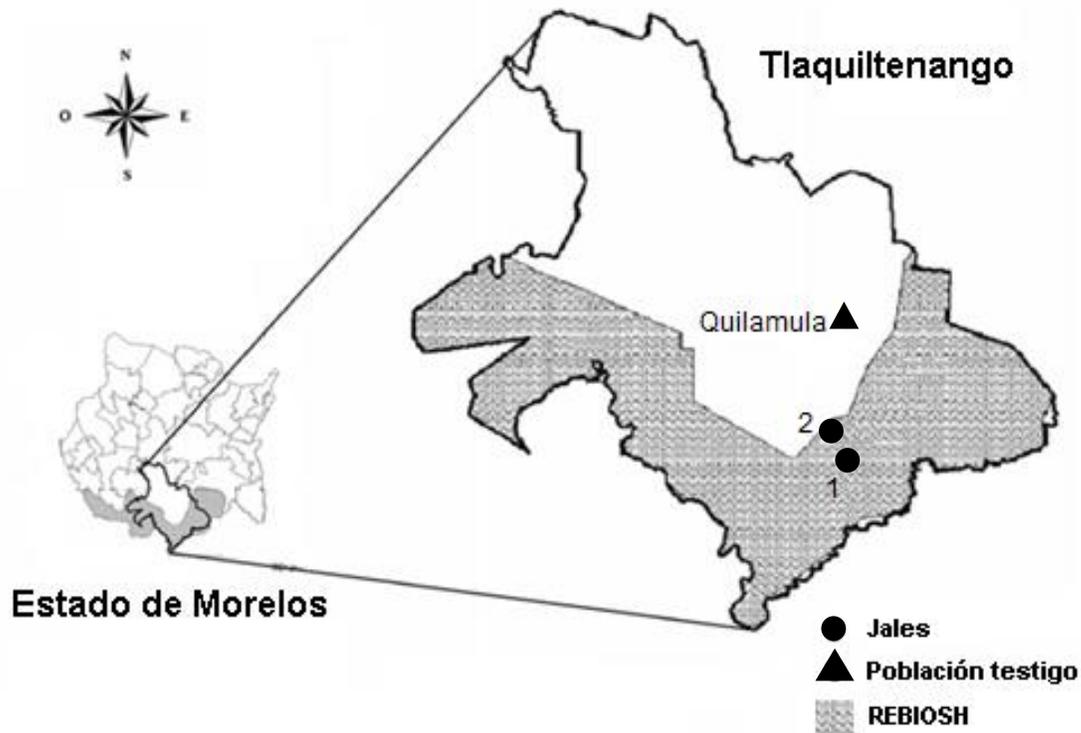
### **Sitios de estudio**

Los organismos fueron colectados en tres sitios; un sitio testigo (ST), ubicados en Quilamula; y dos sitios contaminados con metales (Jales), los cuales se encuentran ubicados dentro de la REBIOSH (Figura 1).

Sitio testigo: Quilamula se encuentra ubicada geográficamente a 18°30'52" latitud N y 98°59'59" longitud O (INEGI, 2009). El sitio testigo se eligió debido a que no se encuentran minas cercanas y no existe reporte de contaminación por metales. Además, las características climáticas, ecológicas y geográficas son muy similares a las zonas contaminadas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).

Sitios contaminados: Huautla, se encuentra ubicada geográficamente a 18°26' latitud N – 99°01' longitud O (INEGI, 2010). En esta zona, se encuentra el Jale 1 que se encuentra a 500 m de la población de Huautla (Figura 2) y el Jale 2 (Figura 3) que geográficamente se encuentran ubicados a 18°25'40.60" N – 99°01'57.82" O y 18°26'22.62" N – 99°01'51.71" O, respectivamente. En ambos jales se han reportado concentraciones de metales como: As, Cd, Pb y V en el 2005, siendo el As (139 mg/kg) y Pb (2297.9 mg/kg) los que presentaron mayor concentración

(Volke *et al.*, 2005). Recientemente en el 2016, se reportaron concentraciones abundantes de Cd 48.6 mg/kg, Cu 214.8 mg/kg, Fe 28296.7 mg/kg, Mn 605.4 mg/kg, Pb 5265.9 mg/kg y Zn 3778.3 mg/kg tanto para el Jale 1 como para el Jale 2, así como un porcentaje considerable de biodisponibilidad (Solís-Miranda, 2016).



**Figura 1. Mapa de la localización geográfica de los sitios de estudio.** Sitios ubicados en el Municipio de Tlaquiltenango, Morelos, México. REBIOSH = Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla.



**Figura 2. Sitio expuesto en Huautla, Tlaquiltenango, Morelos (Jale 1).** La flecha indica el jale 1.



**Figura 3. Sitio expuesto en Huautla, Tlaquiltenango, Morelos (Jale 2).** Las flechas indican el jale 2.

**Especie de estudio: *Liomys irroratus* (Gray, 1868)**

*Liomys irroratus* (Rodentia: Heteromyidae) es conocido como el ratón espinoso mexicano, se encuentra ampliamente distribuida en el centro y noreste de México, y en el extremo sur de Texas (Dowler & Genoways, 1978; Wilson & Reeder, 2005; Linzey *et al.*, 2008). Habita usualmente en zonas áridas y tropicales, así como en vegetación xerófila, matorrales, pastizales, selvas secas y algunos bosques de pino encino (Dowler & Genoways, 1978).

*Liomys irroratus* es un ratón de color gris con café en la parte dorsal y blanco en la parte ventral; generalmente, presentan una raya lateral de color rosa pálido; en el lomo, la presencia de una mezcla de pelos espinosos duros y suaves le da una apariencia un tanto áspera. El pelaje juvenil es grisáceo y se compone principalmente de pelos finos suaves (Dowler & Genoways, 1978). Esta especie es territorial (Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012) y tiene hábitos nocturnos. Presentan dimorfismo sexual, machos más grandes que las hembras, con una longitud promedio de 238 mm machos y 226 mm hembras; y un peso de 40-60 g machos y 35-50 g hembras (Dowler & Genoways, 1978). *Liomys irroratus* cría durante todo el año pero su pico reproductivo aparece en los meses de agosto a noviembre (Dowler & Genoways, 1978). Su ciclo reproductivo es monoéstrico y dura entre 21 y 28 días, el número de crías varía de dos a ocho por camada con un promedio de cuatro (Dowler & Genoways, 1978; Linzey *et al.*, 2008).

Se alimentan de una gran variedad de semillas, de hojas y tallos, así como de artrópodos, sin embargo, se señala que la dieta varía de acuerdo a las poblaciones, lo que sugiere su carácter oportunista (Mason-Romo, 2005). Poseen abazones en las mejillas cubiertas de pelaje, los cuales, le permiten la recolección eficiente y el transporte de alimento hasta su madriguera construida bajo troncos, rocas o arbustos (Dowler & Genoways, 1978; Linzey *et al.*, 2008; Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). El área de actividad de *Liomys irroratus* es en promedio de 90–120 m<sup>2</sup>, siendo mayor la de machos con respecto a las hembras (Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). De acuerdo a “The IUCN Red List of Threatened Species”, su estatus es de preocupación menor.

### **Muestreo de *Liomys irroratus***

Para la colecta de ejemplares de *L. irroratus*, en cada sitio se trazaron cuatro transectos de 20 por 100 m, donde se colocaron trampas tipo Sherman en el suelo cada 5 m, con un total de 132 trampas por día. Las trampas se colocaron con un cebo de cacahuate mezclado con avena y vainilla. Los muestreos se realizaron a partir de septiembre a noviembre de 2016, hasta obtener un tamaño de muestra de 20 individuos por sitio. Los criterios de colecta fueron, no gestantes, no ectoparásitos, salud aparente y que fueran juvenil-adulto. Posteriormente, los individuos colectados se transportaron a la estación biológica de Quilamula, donde se sacrificaron en una cámara letal que contenía algodón con cloroformo. Se obtuvo sangre periférica de cada uno de los ejemplares para la obtención de datos de daño genético y se extrajo el hígado de cada individuo almacenándolos en nitrógeno líquido y se transportaron al Laboratorio de Investigaciones Ambientales del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, para el posterior análisis de bioacumulación de metales y la diversidad y estructura genética. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la regulación Mexicana sobre el muestreo y manejo ético de especímenes animales FAUT-0251.

### **Daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de *Liomys irroratus***

El análisis de genotoxicidad se evaluó con la técnica de ensayo cometa. Se utilizaron 15  $\mu\text{L}$  de sangre de cada uno de los individuos de *L. irroratus* mezclado con 75  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA 0.5%). Esta mezcla se puso en un portaobjetos con 170  $\mu\text{L}$  de agarosa de fusión normal gelificado (NMPA 1%) y se cubrió con un cubreobjetos para formar un microgel. Una vez gelificada la capa de agarosa con muestra biológica, se prosiguió a la adición de otros 75  $\mu\text{L}$  de agarosa pero sin mezclar. En cuanto las tres capas del microgel se gelificaron, se sumergieron en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-base, NaOH, DMSO y Triton x-100 a pH 10, 4°C) durante tres/cuatro días, en oscuridad. Posteriormente, permanecieron durante 20 min en buffer de corrida (300 mM NaOH y 1 mM EDTA, a pH >13). La migración del material genético se realizó

con electroforesis a 25 V 300 mA durante 20 min a 4°C en oscuridad. Después, se neutralizó cada laminilla con solución de Tris 0.4 M pH 7.5 y se fijó con etanol frío al 96% durante 15 min. Las laminillas con el microgel fueron teñidas con bromuro de etidio (50 mL de una solución de 20 mg/mL c/u) para su lectura en un microscopio de fluorescencia Olympus BMX-60 (Tovar-Sánchez *et al.*, 2016). De los datos obtenidos, se comprobó que siguieran una distribución normal con la prueba de Shapiro-Wilk para posteriormente ser analizados con un ANOVA de tipo paramétrica y la prueba post-hoc de Tukey en Statistica 6.0 (STATSOFT, 2000).

### **Concentración de metales en hígado de *Liomys irroratus***

Se tomó de forma aleatoria el hígado de seis individuos por cada sitio de estudio para los análisis de concentración de metales en tejido. Primero, se llevó a cabo una digestión con 10 mL de ácido nítrico y 0.20-0.25 g de tejido deshidratado y pulverizado de cada individuo. La digestión ácida se realizó en un Sistema de Reacción de Aceleración en Microondas modelo MARS-5 de CEM corporation, USA con el método programado: EPA 3051H-HP50 a 175°C por 10 min. Posteriormente, las muestras fueron diluidas en un volumen final de 25 mL con agua destilada y enviadas a la Facultad de Química de la UNAM para la determinación y cuantificación de los metales contenidos en hígado de *L. irroratus*, por espectrometría de plasma acoplada a masas (ICP-MS) con un espectrómetro tipo ICP-820 de la serie MS de Bruker, MA, USA (Límite de detección de los metales encontrados en hígado de *L. irroratus* en mg/kg; Al, 0.0126; Cu, 0.0155; Fe, 0.0134; Ni, 0.0117; Pb, 0.0215; Zn, 0.0303). Estos datos se analizaron con una prueba de *T*-student para comparar la concentración promedio de cada metal en el hígado de los individuos expuestos con respecto a los del sitio testigo Statistica 6.0 (STATSOFT, 2000).

Además, se realizó un modelo lineal generalizado de regresión múltiple para determinar la relación que existe entre la concentración de metales en hígado de *L. irroratus* y el daño genotóxico de cada individuo. Los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2000).

## **Estructura y diversidad genética de población de *Liomys irroratus***

### ***Extracción de ADN***

Se extrajo el ADN de hígado (0.015-0.020 g) de cada individuo de *L. irroratus* mediante el kit de extracción de ADN (Wizard genomic DNA purification kit, Promega, USA). Se corroboró la integridad del ADN corriéndose a 150 V durante 35 min en geles de agarosa al 0.8 % (w/v) con buffer TAE 1X y 1.5 µL de bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Los fragmentos fueron observados en un transiluminador de luz UV marca SYNGENE. Seguidamente, se cuantificó por duplicado la cantidad de ADN obtenido de la extracción y su pureza en un biofotómetro Eppendorf (BioPhotometer V1.35, Eppendorf, Alemania). Con la concentración de cada muestra de ADN se hicieron diluciones con agua ultra pura libre de ADNAs y RNAsas para ajustar la concentración a 30 ng/µL. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso posterior.

### ***Amplificación de microsatélites en PCR***

El ADN extraído de cada individuo se utilizó para la amplificación de regiones de microsatélites nucleares, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient y/o Thermo, Px2 Thermal cycler). Se probaron 14 pares de cebadores diseñados para *Liomys pictus* (Vázquez-Domínguez y Garrido-Garduño, 2013), de los cuales solo amplificaron siete (Tabla 1) con los programas de PCR mostrados en la Tabla 2. Los cebadores que amplificaron con éxito fueron marcados con distintos fluoróforos (Tabla 1) para posteriormente ser amplificados en cada uno de los 75 individuos de *L. irroratus*, en un volumen final de 8 µL por reacción (0.66 µL de ADN 30 ng/µL, 0.08 U de Taq 5 U/mL, 0.64 µL de oligo R 5 µM, 0.32 µL de oligo F, 0.16 µL de dNTP's 10 mM, 0.48 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM y 0.8 µL de Buffer 10x), y ser enviados al Instituto de Biología de la UNAM. La amplificación y el tamaño de los fragmentos de cada cebador en cada uno de los individuos se corroboró en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y un marcador molecular de 100 pb. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de UV marca SYNGENE.

**Tabla 1. Secuencias de cebadores de *Liomys pictus*.** En esta tabla se muestran las secuencias de los siete cebadores de *Liomys pictus* que amplificaron en individuos de *Liomys irroratus*.

LOCUS	SECUENCIA (5' - 3')	MOTIVO	FLUOROFORO	TAMAÑO (pb)
mexL8	F: GGGACAGGGGAAATGTCTCT R: AGGCCAACTAGAACCCAAGG	(GT) <sub>17</sub>	FAM	202-234
mexL21	F: TGCAGTCAAGTCCTCAGCAG R: CCTTGGTAGCAGGGAGAGAG	(GT) <sub>15</sub>	FAM	154-178
mexL43	F: CACATCACTAGATCACCCCTTGC R: AGCTGAGATGACTGGGATTGA	(TG) <sub>19</sub>	NED	240-260
mexL44	F: AGACAGCCACAAATCAACCA R: TGCACAGATTTCTGGCAAAG	(TG) <sub>21</sub>	NED	226-300
mexL48	F: AGTGAACCGGGGAACAGAGA R: CCTGGATGTCTGCGTGGTTT	(GT) <sub>22</sub>	HEX	177-197
mexL49	F: TGTAGGGGAAACAGGGCTAT R: GCTCTGAGTTCAAGCCATT	(GT) <sub>20</sub> -5-(GA) <sub>7</sub> - 10-(GA) <sub>7</sub>	HEX	242-344
mexL53	F: ATGGAGTTCAAGGCCAGCTA R: TGAGCAAAAAGAAGCCAAGAA	(TG) <sub>19</sub>	HEX	118-148

**Tabla 2. Programas de PCR utilizados para la amplificación de los distintos cebadores de la serie *Liomys pictus*.**

<i>mexL49</i>	<i>mexL8, mexL21, mexL43, mexL44, mexL48 y mexL53</i>
35 ciclos { 95°C, 4 min 95°C, 1 min 52°C, 1 min 72°C, 1 min	6 ciclos "Touchdown" { 95°C, 2 min 95°C, 1 min 64°C, 1 min 72°C, 1 min
	10 ciclos { 95°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C, 1 min
	10 ciclos { 95°C, 1 min 57°C, 1 min 72°C, 1 min 72°C, 5 min 4°C, ∞

### **Análisis de la estructura y diversidad genética**

En el Instituto de Biología de la UNAM se realizó una electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3500 (Applied Biosystems) usando GeneScan-500 ROX como un tamaño estándar interno. El conteo de los fragmentos en pares de bases se realizó en Geneious v.9.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). Se revisó que no existieran errores de lectura en el conteo de pares de bases, además, se evaluó la calidad de amplificación mediante el programa Micro-Checker (van Oosterhout *et al.*, 2004).

Para el análisis de diversidad genética se obtuvo para cada locus, los parámetros de: número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos privados ( $N_{ap}$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_E$ ) y el índice de endogamia ( $F_{is}$ ), estos parámetros fueron obtenidos del programa GenAIEx v.6.5 (Peakal y Smouse, 2012). El índice de endogamia nos da la relación entre la  $H_o$  y la  $H_E$ , y denota un déficit de heterocigotos si  $F_{is} > 0$ , mientras que valores de  $F_{is} < 0$  indican un exceso de heterocigotos en la población, en base al equilibrio de Hardy-Weinberg (Lowe *et al.*, 2005). La determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg fue calculado corriendo 10,000 interacciones de cadena de Markov en Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Además, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre cada uno de los parámetros de diversidad genética de cada población, los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2000).

Por otra parte, se determinó la diversidad genética individual de los individuos de *L. irroratus*, lo cual, se obtuvo con el “índice de parentesco” ( $IR$ , por sus siglas en inglés) en el programa STORM 2.0 (Frasier, 2008). Valores negativos, en el  $IR$ , indican menor parentesco y de manera contraria, valores positivos indican mayor parentesco entre los individuos de una población. Una vez obtenidos los valores de  $IR$ , se realizó un modelo lineal generalizado de regresión múltiple para determinar la relación que existe entre la concentración de metales en hígado de *L. irroratus* y el índice de parentesco entre los individuos de la población, así como una regresión lineal para ver la relación entre el  $IR$  y el daño genético observado

en los individuos de *L. irroratus*. Los análisis se realizaron utilizando el programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2000).

Para probar cómo la variación en el tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados se reparte dentro y entre poblaciones de todos los sitios de estudio, se realizó el análisis de estructura poblacional de *L. irroratus* que fue estimado a través de un análisis molecular de varianza (AMOVA) realizado con Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010). El AMOVA fue calculado usando dos modelos de mutación  $F_{st}$  (basado en el modelo de mutación de alelos infinitos, IAM por sus siglas en inglés) y  $R_{st}$  (basado en el modelo de mutación por pasos, SMM por sus siglas en inglés), cada uno fue realizado con 10,000 permutaciones para determinar la significancia de los estimados (Excoffier *et al.*, 2005).

## RESULTADOS

### Concentración de metales en hígado de *Liomys irroratus*

En general, se detectó un efecto significativo del sitio (jale vs. testigo) sobre la concentración de seis metales en hígado de individuos de *L. irroratus* por medio de la técnica de espectrometría de plasma masas. En la Tabla 3, se puede observar como todos los metales analizados tuvieron mayor concentración en el hígado de los individuos colectados en los jales en relación a los individuos colectados en el sitio testigo. El aluminio aumentó 655 veces, el níquel 111 veces, el plomo 6 veces, el cobre y el zinc 3 veces, y el hierro 2 veces con respecto a la concentración observada en el hígado de los individuos del sitio testigo.

**Tabla 3. Concentración promedio ( $\pm$  desviación estándar) de metales en hígado de *Liomys irroratus*.** Los datos se analizaron por *t*-student. \*\*\* = diferencias significativas,  $P=0.001$ .

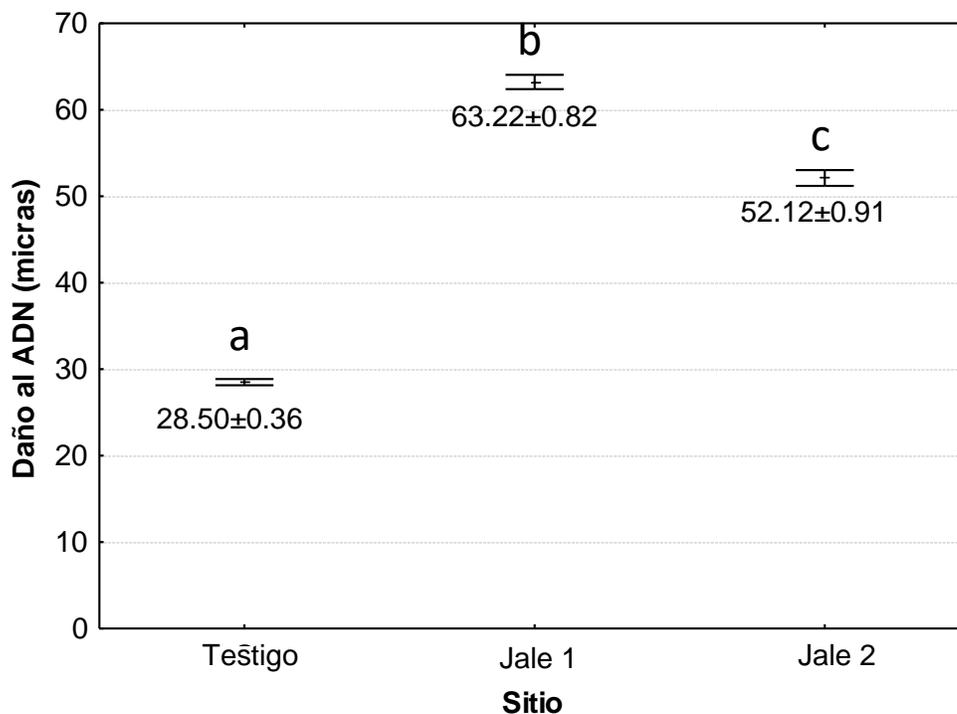
Sitio	n	Metal (mg/kg)					
		Al	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Testigo	6	0.0126 $\pm$ 0.00	6.34 $\pm$ 0.43	464.45 $\pm$ 75.53	0.07 $\pm$ 0.07	2.03 $\pm$ 0.25	38.22 $\pm$ 8.15
Jale	6	8.26 $\pm$ 3.30	17.96 $\pm$ 1.98	1051.99 $\pm$ 108.36	7.76 $\pm$ 2.64	12.48 $\pm$ 1.04	103.21 $\pm$ 12.15
$t_{34}$		4.586***	10.050***	9.420***	5.33***	16.05***	8.14***

### Daño genotóxico en linfocitos de sangre periférica de *Limoyis irroratus*

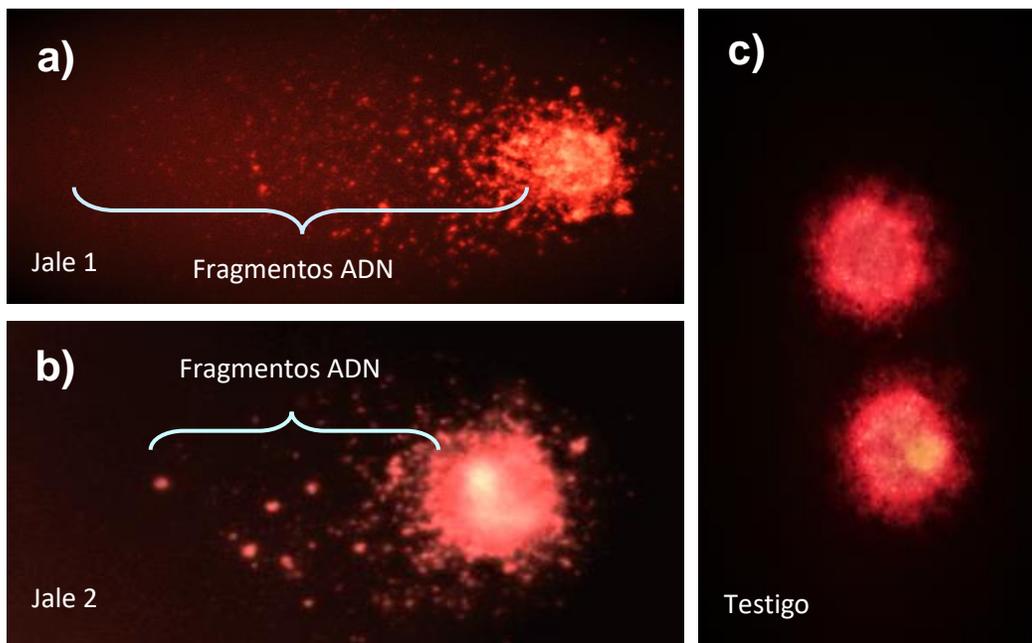
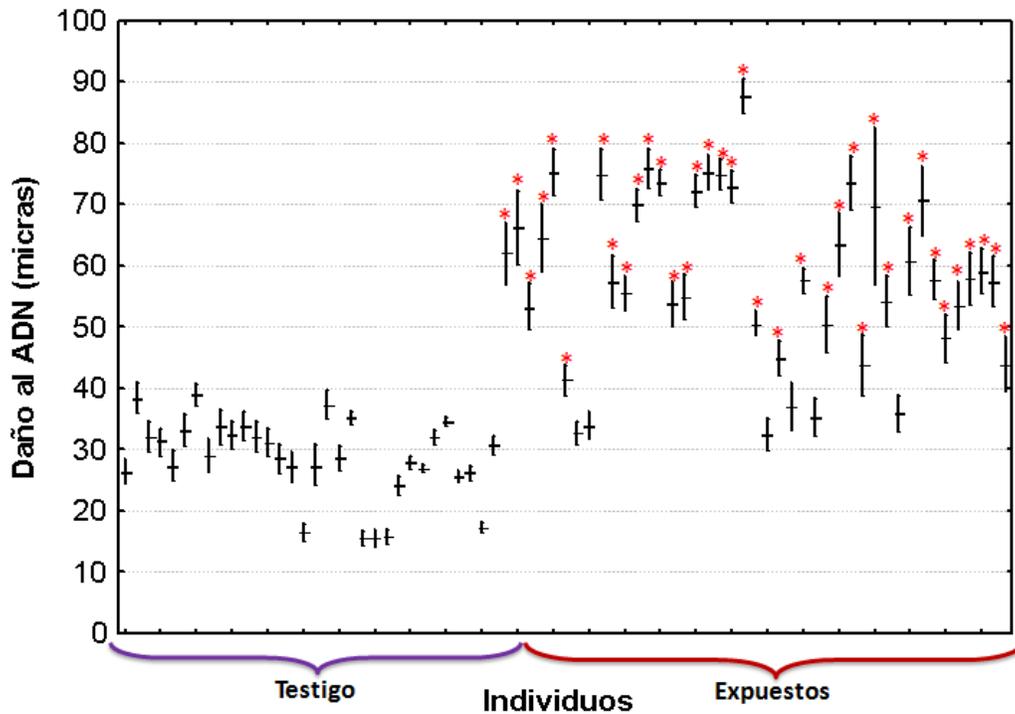
Para los datos obtenidos del daño genético de los individuos de *L. irroratus* se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, donde se observó que tanto los datos obtenidos del sitio expuesto como del testigo no difieren de una distribución normal (Expuesto:  $W=0.96061$ ,  $P=0.14596$  y testigo:  $W=0.93713$ ,  $P=0.0621$ ). Posteriormente, el análisis de varianza de una vía determinó un efecto significativo del sitio de estudio (testigo, jale 1 y jale 2) sobre los niveles de daño genético en individuos de *L. irroratus* ( $F_{2,72}=72.20$ ,  $P<0.001$ ). La prueba de Tukey mostró diferencias significativas entre todos los sitios de estudio, mostrando mayor daño

genético en los individuos colectados en los sitios expuestos (jale 1>jale 2>testigo. Figura 4).

El análisis de varianza de una vía detectó un efecto significativo del individuo sobre los niveles de daño genético ( $F_{74,7363}=33.91$ ,  $P<0.001$ ). En general, la prueba *post hoc* (Tukey,  $P<0.05$ ) registró que los individuos colectados en los sitios expuestos presentaron niveles de daño genético significativamente mayor con respecto a los individuos testigo (Figura 5), exceptuando a seis ratones del sitio expuesto quienes no difirieron significativamente con el daño genético en comparación con los individuos testigo (Figura 5).



**Figura 4. Daño genético (rompimiento de cadena sencilla, micras) en individuos de *Liomys irroratus* por sitio de estudio.** Valores expresados como la media  $\pm$  error estándar. Letras diferentes denotan diferencias significativas (Prueba de Tukey,  $P<0.001$ ).



**Figura 5. Niveles de rompimiento de cadena sencilla por individuo.** La gráfica muestra el daño genético promedio ( $\pm$  error estándar) por cada individuo tanto del sitio testigo como de los expuestos. \* = diferencias significativas con respecto a los individuos del sitio testigo (Prueba de Tukey  $P < 0.05$ ). En las imágenes 40x a) y b) se observan células con daño de individuos expuestos, y en la c) se observan células sin daño de individuos no expuestos.

### **Correlación entre la concentración de metales en hígado y daño genético de individuos de *Liomys irroratus***

Se evaluó el efecto de la concentración de cada metal sobre los niveles de daño genético (rompimiento de cadena sencilla), para lo cual se realizó un modelo lineal generalizado donde se utilizó una regresión múltiple. Este modelo nos permitió observar que a pesar de que todos los metales analizados presentaron valores significativamente más altos en los animales expuestos con respecto a los animales testigo, sólo los metales aluminio, plomo y el níquel registraron una relación positiva y significativa con los niveles de daño genético en los animales de estudio. El plomo contribuye con el 41.16% del daño genético observado, mientras que el níquel con el 13.48% y el aluminio con el 12.62% (Tabla 4).

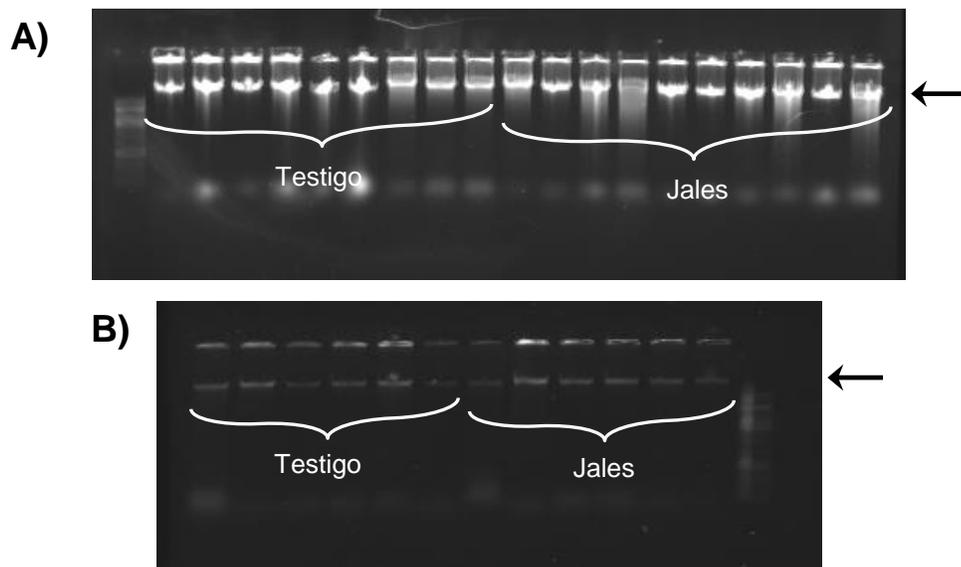
**Tabla 4. Efecto de la concentración de cada metal sobre los niveles de rompimiento de cadena sencilla del ADN de *Liomys irroratus*.** Los datos se analizaron por un modelo lineal generalizado. S.C. = suma de cuadrados, g.l. = grados de libertad, *F* = valor de ANOVA, \* = diferencias significativas, *P*<0.05.

Metal	S.C.	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	% variación
Al	237.54	1	9.581	0.027 *	12.62
Cu	8.323	1	0.336	0.587	0.44
Fe	102.604	1	4.138	0.098	5.45
Ni	253.767	1	10.235	0.024 *	13.48
Pb	774.614	1	31.242	0.003 *	41.16
Zn	0.064	1	0.003	0.962	0.003

## Estructura y diversidad genética en poblaciones de *Liomys irroratus*

### Extracción de ADN de hígado de *Liomys irroratus*

El ADN de todos los individuos se pudo extraer satisfactoriamente, observándose muy poca cantidad de impurezas. En la Figura 6, se muestra la banda de ADN de algunos de los individuos colectados del sitio testigo y de los jales. La concentración de ADN en promedio fue de 290.99 ng/mL para los individuos testigo y 236.55 ng/mL para los individuos colectados en los jales (Figura 6A). El promedio del cociente de absorbancia 260/280 fue de 1.89 para ambos grupos de estudio, el cual se encuentra dentro del intervalo de pureza (1.7 – 2.0) para la realización del PCR (Müller y Schwezer, 1994). En la Figura 6B, la banda de ADN se observa con una mayor definición debido a que el ADN se diluyó a una concentración de 30 ng/μL, la cual es requerida para proceder con la amplificación del ADN con las secuencias cebadoras por PCR.

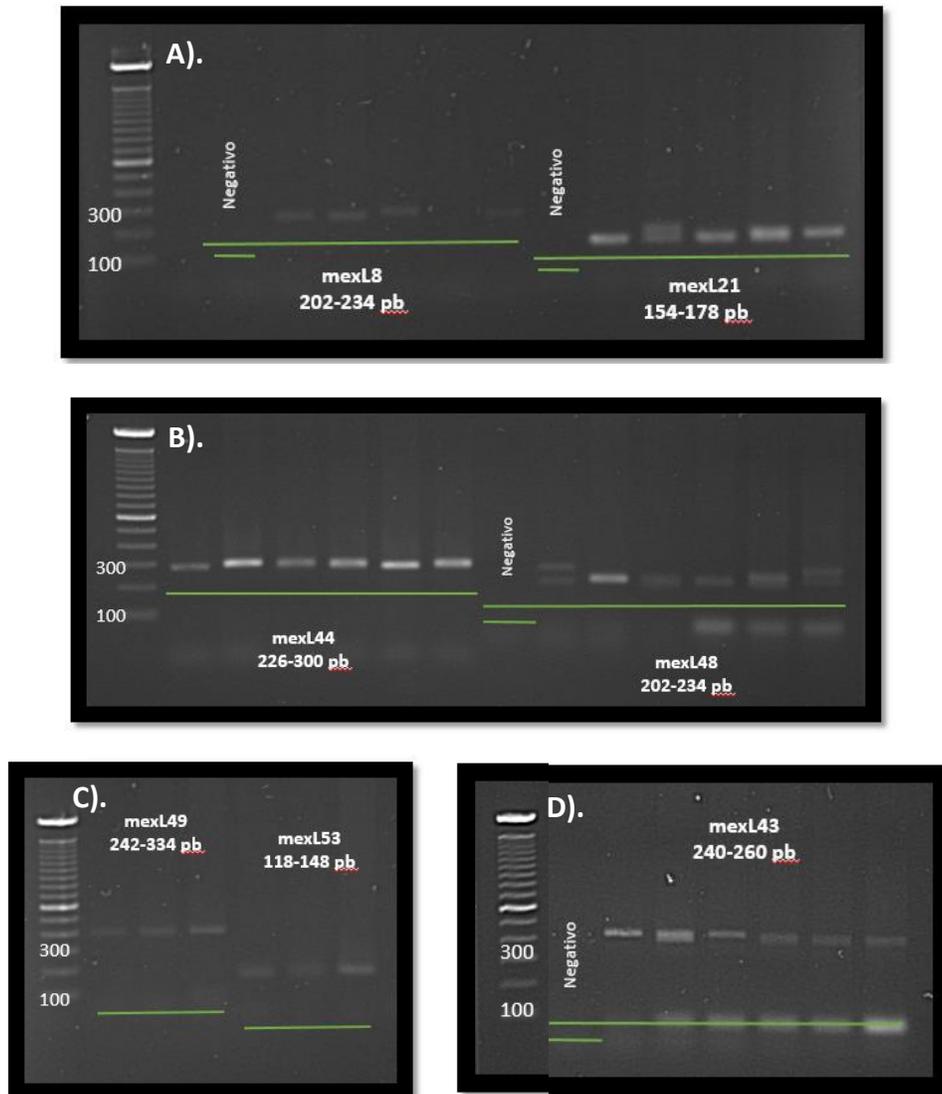


**Figura 6. ADN extraído de hígado de individuos de *Liomys irroratus*.** En la figura A) se observa un gel con el ADN sin diluir, de forma contraria en la B) se observa el ADN con una dilución de 30 ng/μL por lo cual se puede observar las bandas más definidas y el gel más limpio. Las flechas indican las bandas de ADN.

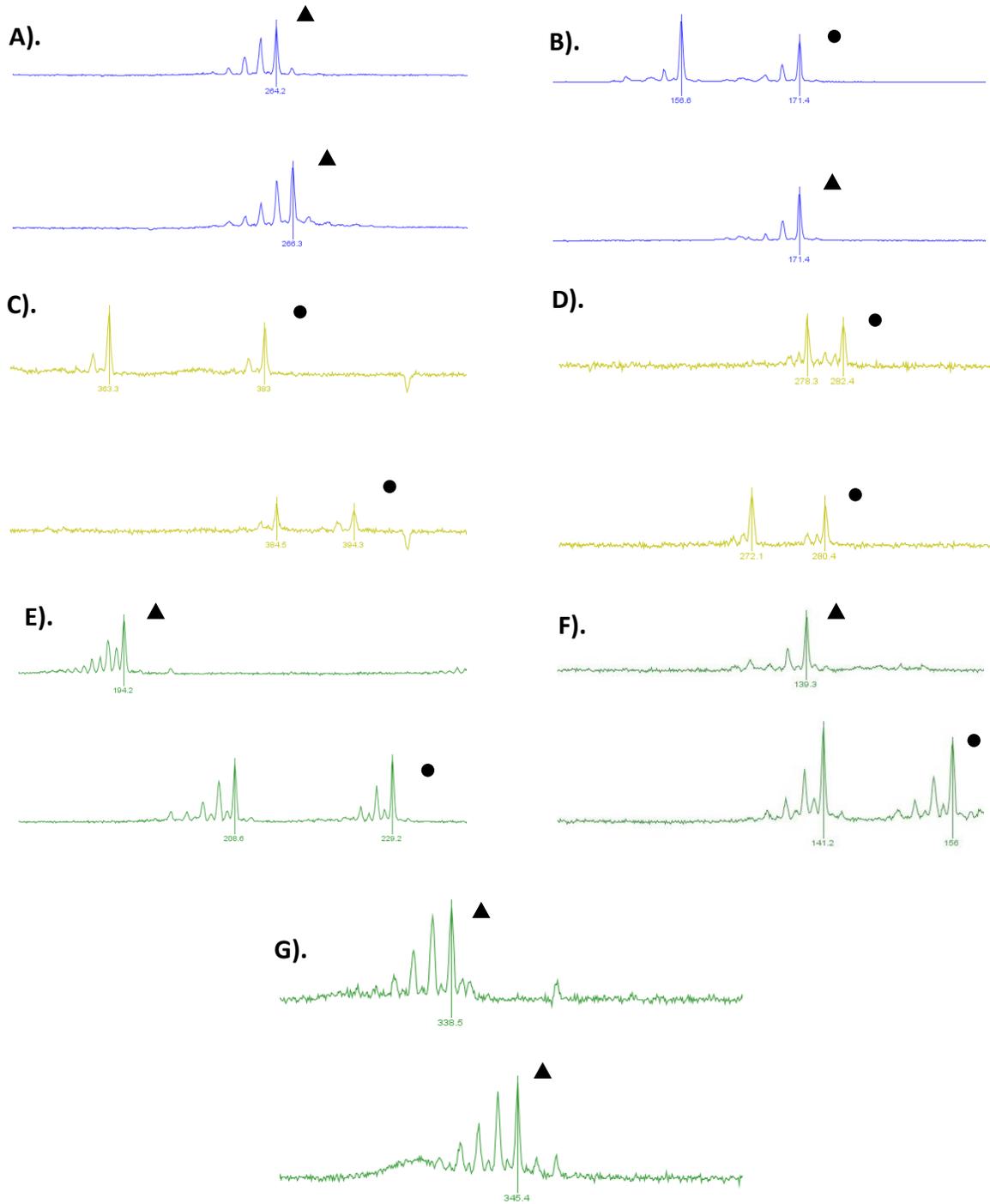
### ***Amplificación de los microsatélites por PCR.***

Los resultados de la amplificación de los siete cebadores marcados se muestran en la Figura 7. En los geles de agarosa, se puede observar bandas bien definidas, obtenidas de los cebadores marcados mexL8, mexL21, mexL43, mexL44, mexL48, mexL49 y mexL53 de la serie *Liomys pictus*. Además, cada uno de los cebadores amplificados se encuentra dentro del rango de tamaño en pares de bases (pb) esperado (Tabla 2), y además, los siete cebadores fueron amplificados exitosamente en los 75 individuos de *L. irroratus*.

Posteriormente, los electroferogramas obtenidos como resultado de la electroforesis capilar se muestran en la Figura 8. En los electroferogramas cada pico representa un alelo, los locus heterocigotos se pueden observar como dos picos continuos y los locus homocigotos muestran solo un pico (Figura 8). El tamaño de cada alelo fue determinado mediante el marcador GeneScan-500 ROX como un tamaño estándar interno y analizados en el programa Geneious v.9.1.5 (Kearse *et al.*, 2012). En este programa, se generó una base de datos que contenía el individuo y el tamaño, en pares de bases, de los alelos de cada cebador. La base de datos fue utilizada para el análisis de diversidad y estructura genética de las poblaciones de *L. irroratus*.



**Figura 7. Electroforesis de los siete microsatélites amplificados para *Liomys irroratus*.** En la imagen A) se muestra mexL8 de 202-234 pb y mexL21 de 154-178 pb, en la B) mexL44 de 226-300 pb y mexL48 de 202-234 pb, en C) mexL49 de 242-334 pb y mexL53 de 118-148 pb, y por último en la D) se muestra a mexL43 de 240-260 pb. Todos los productos de PCR se corrieron junto a un marcador de 100pb.



**Figura 8. Electroferogramas.** En A) y B) se muestran los cebadores mexL8 y mexL21, respectivamente, marcados con FAM; en C) y D) mexL43 y mexL44, respectivamente, marcados con NED; E), F) y G) mexL48, mexL49 y mexL53, respectivamente, marcados con HEX. Los números que se observan en los electroferogramas es el tamaño en pb que presentan. ● = heterocigotos, ▲ = homocigotos.

### **Diversidad genética poblacional de *Liomys irroratus***

Se observó que los siete cebadores utilizados fueron altamente polimórficos, variando en su número de alelos de 8 a 22, con un promedio de 12.66 por locus (Tabla 5). El parámetro de heterocigosis observada ( $H_O$ ) varió de 0.2 a 0.818, mientras que para la heterocigosis esperada ( $H_E$ ), se encontraron valores de 0.752 a 0.934. Con respecto al índice de endogamia, cinco de los siete loci mostraron una deficiencia de heterocigotos significativa con respecto a las expectativas de Hardy-Weinberg, indicando una alta endogamia (valores entre  $F_{IS}=0.78$  y  $0.23$ ,  $P<0.05$ . Tabla 5) en la mayoría de los locus analizados.

En el parámetro de diversidad genética, número de alelos, no se observaron diferencias significativas entre el promedio de los dos sitios expuestos y el sitio testigo ( $H_{2,21}=1.348$ ,  $P=0.509$ ). La frecuencia de alelos privados ( $Nap$ ), fue baja en todas las poblaciones de *L. irroratus* (Testigo  $Nap=2.71$ , Jale 2  $Nap=1.71$ , Jale 1  $Nap=2.14$ ). En relación a la heterocigosis observada ( $H_O$ ), no se observaron diferencias significativas entre los valores promedio de las poblaciones (Testigo  $H_O=0.53$ ; Jale 2  $H_O=0.54$ ; y Jale 1  $H_O=0.46$ ;  $H_{2,21}=6.237$ ,  $P=0.732$ ). Con respecto al promedio de la heterocigosis esperada ( $H_E$ ) de cada población también mostró que las poblaciones expuestas tienen una diversidad genética similar a la población testigo (Testigo,  $H_E=0.88$ ; Jale 2,  $H_E=0.85$ ; y Jale 1,  $H_E=0.87$ ), lo cual se corroboró con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde los valores de cada población no mostraron diferencias significativas ( $H_{2,21}=1.654$ ,  $P=0.437$ ). En general, la heterocigosis observada de cada población fue menor a la heterocigosis esperada, por lo que, el índice de endogamia, mostró un déficit de heterocigotos en las tres poblaciones de estudio teniendo valores para el jale 1 de  $F_{IS}=0.46$ , jale 2 de  $F_{IS}=0.36$ , y testigo de  $F_{IS}=0.39$ ;  $P<0.05$  (Tabla 5).

**Tabla 5. Estimación de la diversidad genética de las poblaciones de *Limoyo irroratus* en los tres sitios de estudio.** En esta tabla se muestra el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los locus, el número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos privados ( $N_{ap}$ ), la heterocigosis esperada ( $H_E$ ), la heterocigosis observada ( $H_O$ ), el índice de endogamia ( $F_{IS}$ ), error estándar (EE). \* = diferencias significativas, n.s. = diferencias no significativas de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg  $P < 0.05$ . Jale 1 = 21 individuos, jale 2 = 22 individuos y Quilamula = 32 individuos.

Sitio	Locus	Tamaño (pb)	$N_a$	$N_{ap}$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	H-W
Jale 1	mexL8	202-234	11		0.200	0.858	0.78	*
	mexL21	154-178	10		0.750	0.850	0.14	n.s.
	mexL43	240-260	17		0.550	0.928	0.42	*
	mexL44	226-300	11		0.619	0.752	0.20	n.s.
	mexL48	177-197	14		0.286	0.901	0.70	*
	mexL49	242-344	16		0.263	0.921	0.73	*
	mexL53	118-148	11		0.550	0.860	0.38	*
Promedio			12.86	2.14	0.46	0.87	0.46	
EE			1.06	0.55	0.08	0.02	0.1	*
Jale 2	mexL8	202-234	8		0.294	0.824	0.66	*
	mexL21	154-178	11		0.818	0.804	0.01	n.s.
	mexL43	240-260	11		0.450	0.806	0.46	*
	mexL44	226-300	8		0.682	0.837	0.21	n.s.
	mexL48	177-197	14		0.545	0.892	0.41	*
	mexL49	242-344	14		0.273	0.907	0.70	*
	mexL53	118-148	12		0.727	0.868	0.18	n.s.
Promedio			11.14	1.71	0.54	0.85	0.36	
EE			0.94	0.42	0.08	0.016	0.01	*
Quilamula	mexL8	202-234	11		0.241	0.880	0.73	*
	mexL21	154-178	9		0.625	0.794	0.23	*
	mexL43	240-260	14		0.533	0.880	0.41	*
	mexL44	226-300	10		0.806	0.848	0.06	n.s.
	mexL48	177-197	22		0.484	0.934	0.49	*
	mexL49	242-344	18		0.345	0.913	0.63	*
	mexL53	118-148	14		0.656	0.896	0.28	*
Promedio			14	2.71	0.53	0.88	0.39	
EE			1.76	0.97	0.07	0.02	0.09	*

### **Estructura poblacional de *Liomys irroratus***

Los resultados obtenidos del análisis de variación genética entre y dentro de las poblaciones de los tres grupos de estudio de *Liomys irroratus* con los dos modelos de mutación IAM ( $F_{ST}$ ) y SMM ( $R_{ST}$ ), se muestran en la Tabla 6. En ambos modelos la mayor variación genética se obtuvo dentro de las poblaciones con el 97 % y el 96 %, respectivamente. Mientras que entre las poblaciones sólo se observó un 3 % para IAM y 4 % para SMM. La diferenciación genética entre poblaciones dio valores de 0.038 para SMM y 0.033 para IAM, siendo sólo significativo para el modelo de alelos infinitos ( $\Phi_{ST}=0.033$ ,  $P=0.048$ ), estos mismos resultados se pueden observar en los análisis pareados de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  realizados con 10,000 permutaciones, donde sólo fueron significativos los valores de IAM estimados entre Jale 1 y Jale 2 como  $F_{ST}=0.024$ , Jale 1 y Quilamula  $F_{ST}=0.028$  y Jale 2 y Quilamula  $F_{ST}=0.021$  ( $P<0.05$ . Tabla 7). Sin embargo, los valores son muy bajos, lo que denota que no hay una estructura genética.

**Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) usando  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  para *Liomys irroratus*.** En esta tabla se muestra la fuente de variación, los grados de libertad (g.l.), la suma de cuadrados (S.C.), la estimación de los componentes de variación (Comp.Var), el porcentaje de contribución a la variación (%), índice de fijación ( $\Phi_{ST}$ ). \* = Diferencias significativas,  $P<0.05$ .

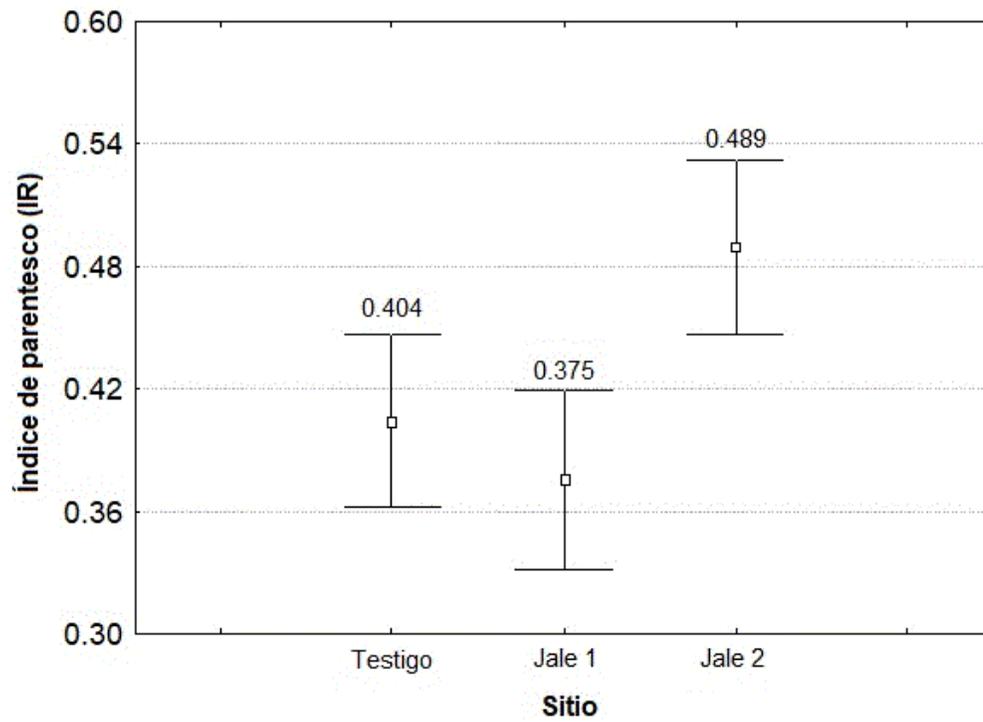
Fuente de variación	g.l.	S.C.	Comp. Var	%	$\Phi_{ST}$	$P$
<i>F<sub>ST</sub></i> (IAM)						
entre poblaciones	2	15.94	0.11	3.33		
dentro de poblaciones	140	431.62	3.07	96.67		
Total	142	447.55	3.18	100	0.033	0.048 *
<i>R<sub>ST</sub></i> (SMM)						
entre poblaciones	2	1031.30	7.24	3.80		
dentro de poblaciones	140	25856.12	183.01	96.20		
Total	142	26887.42	190.25	100	0.038	0.284

**Tabla 7. Análisis pareados de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ .** En esta tabla se muestran los valores de  $F_{ST}$  por debajo de la diagonal y los valores de  $R_{ST}$  por arriba de la diagonal, de cada uno de las poblaciones de *Liomys irroratus*. \* = Diferencias significativas,  $P < 0.05$  con 10,000 permutaciones.

		$R_{ST}$		
		Jal 1	Jal 2	Quilamula
$F_{ST}$	Jal 1		0.028	0.031
	Jal 2	0.024*		0.000
	Quilamula	0.028*	0.021*	

### Índice de parentesco de *Liomys irroratus*

Los análisis del índice de parentesco, mostraron que en todas las poblaciones de *L. irroratus* los individuos tienen una relación de parentesco (testigo=0.404, Jale 1=0.375 y Jale 2=0.489), estos resultados concuerdan con los datos obtenidos de la diversidad genética poblacional, donde se observó que la heterocigosis observada de cada población fue menor a la heterocigosis esperada, dando valores del índice de endogamia que indican un déficit de heterocigotos en la población de *L. irroratus*. A pesar de esto, entre los sitios expuestos y el sitio testigo no se observaron diferencias significativas en los valores de índice de parentesco ( $F_{2,72}=1.587$ ,  $P=0.211$ . Figura 9), es decir, que la relación que existe entre los individuos de una población es similar entre las tres poblaciones de *L. irroratus* analizadas en este estudio. Sin embargo, en la Figura 9, se puede observar una tendencia de mayor parentesco en los individuos colectados en uno de los sitios expuestos, el Jale 2, en comparación con el Jale 1 y el sitio testigo.



**Figura 9. Índice de parentesco de las poblaciones analizadas en los tres sitios de estudio.**  
Los datos se analizaron por ANOVA ( $F_{2,72}=1.587$ ,  $P<0.05$ ).

**Correlación entre el índice de parentesco y la acumulación de metales en hígado de individuos de *Liomys irroratus***

Con base a los niveles de endogamia obtenidos de las poblaciones de *L. irroratus*, se hizo una correlación entre los índices de parentesco, que indica la diversidad genética individual, con la acumulación de la mezcla de metales encontrados en el hígado de los individuos de *L. irroratus*. Los datos obtenidos de la correlación sugieren que de la mezcla de metales, los que tienen una mayor contribución sobre la relación de parentesco entre los individuos de una población son el aluminio y el níquel. En la Tabla 8, se observa que el aluminio contribuye con el 14.46% y el níquel con el 19.28% del *IR* total encontrado en los individuos de *L. irroratus*.

**Tabla 8. Efecto de la concentración de cada metal sobre el índice de parentesco de *Liomys irroratus*.** Modelo lineal generalizado. S.C = suma de cuadrados, g.l. = grados de libertad, *F* = valor de ANOVA, \* = diferencias significativas, *P*<0.05.

Metal	S.C.	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>	% variación
Al	0.073	1	8.149	0.036*	14.46
Cu	0.019	1	2.158	0.202	3.83
Fe	0.015	1	1.647	0.256	2.92
Ni	0.097	1	10.868	0.022*	19.28
Pb	0.032	1	3.648	0.114	6.47
Zn	0.017	1	1.945	0.222	3.45

**Correlación entre el índice de parentesco y el daño genético observado en los individuos de *Liomys irroratus***

Se observó una correlación positiva y significativa entre el índice de parentesco y el daño genético que presentaron los individuos de *L. irroratus* ( $r=0.49$ ,  $r^2=0.22$ ,  $F_{1,38}=12.20$ ,  $P=0.001$ ). Es decir, entre mayor daño genético presentado hay un mayor nivel de parentesco entre los individuos de las poblaciones de *L. irroratus* (Figura 10).

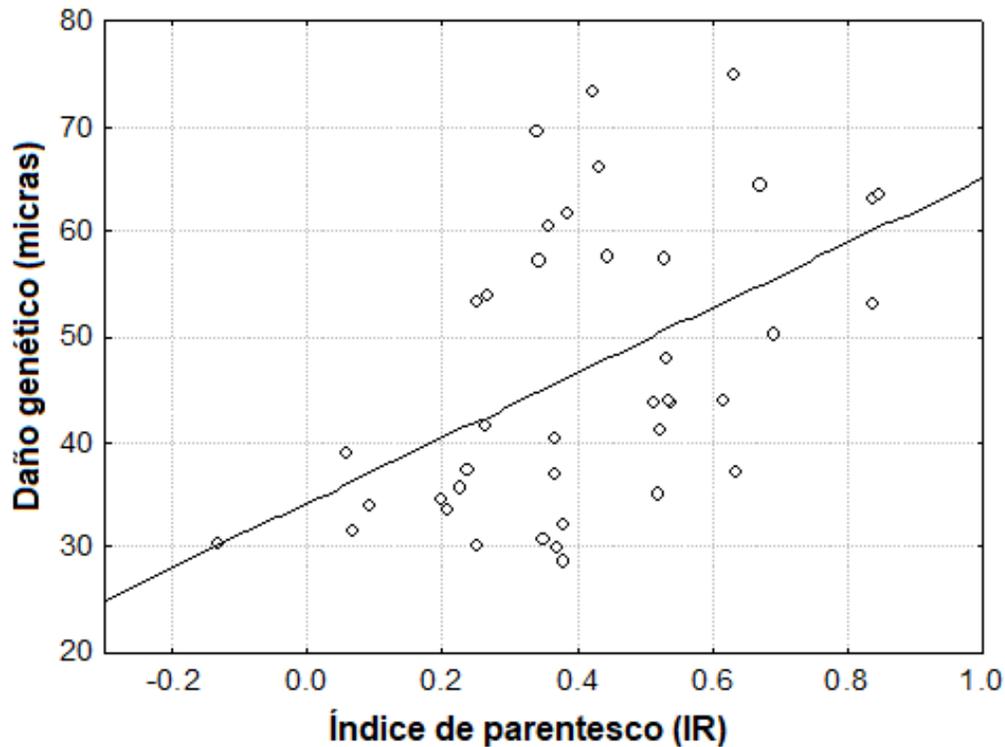


Figura 10. Relación entre el índice de parentesco y el daño genético presentado en los individuos de *Liomys irroratus*. Regresión lineal ( $r=0.49$ ,  $r^2=0.22$ ,  $F_{1,38}=12.20$ ,  $p=0.001$ ).

## DISCUSIÓN

### Bioacumulación de metales en hígado de *Liomys irroratus*

En la Sierra de Huautla se encuentran residuos mineros que contienen altas concentraciones de metales, debido a la actividad minera que hubo en la región. Solís-Miranda (2016) reportó que en los jales de Huautla existen concentraciones altas de metales mg/kg (Cd 48.6, Cu 214.8, Fe 28296.7, Mn 605.4, Pb 5265.9 y Zn 3778.3), de los cuales, Cd, Cu, Pb y Zn rebasan 48, 1, 26 y 25 veces, respectivamente, los límites máximos permisibles internacionales (EPA, 2007), pero sólo Cd y Pb rebasan 1 y 13 veces, los límites máximos permisibles nacionales (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004). Aunado a esto, Solís-Miranda (2016) reportó el siguiente patrón de biodisponibilidad: Cu>Pb>Mn>Zn>Cd>Fe, por ende la bioacumulación de metales en los organismos que habitan en las regiones aledañas de los jales de Huautla tiene una alta posibilidad de ocurrir.

En los resultados obtenidos de la concentración de metales en hígado de individuos de *L. irroratus*, se observó una bioacumulación de una mezcla compleja de metales (Al, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn). Los individuos que habitan en los jales de Huautla mostraron un enriquecimiento mayor de cada uno de los metales encontrados en la mezcla con respecto a los individuos colectados en el sitio testigo, lo que demuestra la biodisponibilidad de metales en los jales de Huautla. Resultados similares se han reportado para poblaciones de *Baiomys musculus* y *Peromyscus melanophrys*, roedores que habitan también los jales de Huautla (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013b). Asimismo, en otros mamíferos como *Clethrionomys glareolus* (Milton *et al.*, 2003), *Dasyopus novemcinctus* (Jarvis *et al.*, 2013), y *Lynx rufus* (Thomason *et al.*, 2016) también se ha reportado una mayor bioacumulación de metales en hígado de individuos que habitan en ambientes contaminados por actividades antropogénicas, en comparación con las especies colectadas en sitios considerados como testigo. *Liomys irroratus* es un roedor que se encuentra en contacto directo con el suelo, debido a que los individuos de esta especie forman sus madrigueras en el suelo, y se alimentan de semillas que se encuentran principalmente en el suelo, así como de plantas bioacumuladoras de metales encontradas en la zona, por lo que la

ingestión e inhalación de metales tiene altas posibilidades de ocurrir en los individuos que habitan los jales.

Las acumulación de metales en hígado está bien establecido en la literatura debido a que es un órgano que juega un rol central en el metabolismo y detoxificación de metales, así como en la acumulación de éstos (Aloupi *et al.*, 2017). Las metalotioneínas hepáticas parecen una pieza clave debido a la capacidad que presentan para unirse a cationes bivalentes (como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), lo que permite el almacenamiento, la transferencia y regulación de metales esenciales así como su detoxificación (Aloupi *et al.*, 2017). Por lo anterior, el hígado es considerado un buen indicador de exposición a metales en estudios de contaminación ambiental.

Se puede destacar que en la mezcla de metales (Al, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn) encontrados en el hígado de *L. irroratus*, se encuentran concentraciones de Al y Ni a pesar de que en reportes recientes no se encontraron concentraciones de estos metales en los jales de Huautla (Solís-Miranda, 2016). En relación a lo anterior, se sabe que el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre es el aluminio (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). En particular, en el estado de Morelos existen afloramientos de rocas sedimentarias e ígneas, de las cuales las últimas son las más abundantes (CONANP, 2005). Las rocas ígneas están compuestas fundamentalmente por silicatos ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) y por iones de aluminio, calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro (Velasco *et al.*, 2004). Además, con respecto al Ni estudios han reportado concentraciones de este metal en los jales de Huautla (Velasco *et al.*, 2004), así como concentraciones de Ni en hígado y hueso de roedores que habitan en el sitio (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). La variación en la presencia y concentración de los metales en el ambiente y su bioacumulación, es diferencial a través del tiempo, debido a cambios en la biosfera, litósfera, hidrósfera y atmósfera, particularmente debido a factores como el pH, la anoxia, la erosión, las precipitaciones, la salinidad, el contenido de materia orgánica y actividad microbiana, lo que permite la movilización de los metales a través del ecosistema y su acumulación en otros sitios, como en plantas y animales (Jaishankar *et al.*, 2014; Aloupi *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que la variación

temporal en los factores mencionados y en las condiciones climáticas entre los años de colecta de las muestras en los distintos estudios, es un factor importante que puede influir en la bioacumulación de metales.

Los hábitos alimenticios de las especies de estudio también son factores importantes con respecto a la bioacumulación de metales (Gall *et al.*, 2015). En general, se ha reportado que *L. irroratus* se alimenta de una gran variedad de semillas y de hojas de plantas silvestres, así como de artrópodos (Mason-Romo, 2005). Sin embargo, las plantas son un factor importante en la bioacumulación de metales, debido a que están directamente en contacto con el suelo y los metales tienden a acumularse en las capas más superficiales del mismo, lo que permite la absorción y acumulación de los metales, principalmente en la raíz y en tejido foliar, quedando disponibles para los organismos que consumen dicha planta, representando el primer paso para la incorporación de los metales a la red trófica (Teitelbaum, 2012). En particular para *L. irroratus*, estudios realizados en Sierra de Huautla han reportado que especies vegetales pertenecientes a la familia Fabaceae forman parte de la dieta de este roedor, por ejemplo, *Vachellia farnesiana*, conocida anteriormente como *Acacia farnesiana* (Cadena, 2003), así como *Lysiloma divaricatum*, *Aeschynomene americana*, *Mimosa* sp., *Senna* sp. y *Conzattia multiflora* (Mason-Romo, 2005). Asimismo, *Vachellia farnesiana* se ha reportado como una especie hiperacumuladora de metales como Cu, Zn y Pb (Santoyo-Martínez, 2016). De manera similar, especies como *Prosopis laevigata* y *Pithecellobium dulce* encontradas también en los jales de Huautla y pertenecientes a la misma familia han sido consideradas como especies hiperacumuladoras de metales como Cu, Zn y Pb (Hernández-Lorenzo, 2015; Santoyo-Martínez, 2016). En la REBIOSH a pesar de que existen 939 especies vegetales, se ha observado que en zonas alteradas se establecen asociaciones de vegetación secundaria formadas principalmente por arbustos espinosos mimosoideos (Fabaceae; CONANP, 2005). Considerando los estudios que reportan a estas especies de la familia Fabaceae como especies hiperacumuladoras de metales, se sugiere que la acumulación de Ni y Al en hígado de los individuos de *L. irroratus*, también podría deberse al consumo de algunas de estas especies vegetales.

Por otra parte, en la población testigo también se observó una acumulación de los mismos metales en hígado pero en menor cantidad. Lo anterior, podría deberse a que el suelo del municipio de Tlaquiltenango posee una riqueza natural de minerales azufrados, como la arsenopirita (FeAsS), la esfalerita (ZnS), la galena (PbS), la acantita (Ag<sub>2</sub>S), la calcocita (Cu<sub>2</sub>S), particularmente de plomo y plata, que se encuentran asociados normalmente con Cu, As, cinabrio, cobaltita y barita (Volke *et al.*, 2004, 2005; Velasco *et al.*, 2004).

### **Daño genético en *Liomys irroratus* y su relación con la concentración de metales en hígado de estos individuos**

El presente estudio evaluó la genotoxicidad de una mezcla de metales bioacumulados en hígado de *L. irroratus*, esto mediante el análisis de la cantidad de fragmentos rotos de cadena sencilla del ADN. En general, los datos obtenidos en este proyecto muestran un daño genético significativamente mayor en individuos expuestos a jales, en comparación con los individuos colectados en el sitio testigo. Estos datos son similares a lo reportado en otros estudios, donde observaron un daño genético mayor en roedores expuestos a metales que los individuos de los sitios testigo (Da Silva *et al.*, 2000; Nombela 2002; leardi *et al.*, 2003, Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).

En base a la correlación realizada entre el daño genético observado y la acumulación de metales en hígado de individuos de *L. irroratus*, mostró que estadísticamente el 41% del daño al ADN observado en estos roedores es atribuible al Pb, el 14% al Ni y el 13% al Al. Esto es interesante, ya que de la mezcla de metales acumulados en hígado de *L. irroratus* el Al, Ni y Pb son los metales que mostraron un mayor enriquecimiento en los individuos expuestos con 656, 111 y 6 veces más, respectivamente, en comparación con los individuos testigo. Además, el Al y el Pb son los únicos de la mezcla de metales encontrados en hígado de estos individuos, que no son requeridos para las funciones biológicas de los organismos y por ende generan rápidamente efectos tóxicos (Gall *et al.*, 2015). El resto de los metales encontrados en hígado de *L. irroratus* son metales esenciales, los cuales son requeridos en cantidades pequeñas para

las funciones biológicas de los organismos, sin embargo, en cantidades excesivas puede tener efectos tóxicos (Gall *et al.*, 2015) como es el caso del Ni.

De manera particular, el Ni puede llevar a alteraciones de la expresión de proteínas importantes en la reparación del ADN a través de la metilación del material genético (Jaishankar *et al.*, 2014; Hyun-Soo *et al.*, 2015; Scanlon *et al.*, 2017). Además, existen reportes donde mencionan que metales como el Ni y el Pb remplazan a otros cationes bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$  provocando alteraciones en procesos biológicos como señalización celular, unión de proteínas, transportación de iones regulación enzimática y liberación de neurotransmisores (Volke *et al.*, 2005; Jaishankar *et al.*, 2014; Scanlon *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de que los mecanismos moleculares de toxicidad del níquel no son claros, se ha sugerido que el principal mecanismo de su toxicidad es la inducción de estrés oxidativo a través de la reducción en la expresión de enzimas antioxidantes (Scanlon *et al.*, 2017). En el caso del Pb, además de que se sabe que puede formar iones órgano-metálicos liposolubles capaces de penetrar membranas y así acumularse en las células, también, se ha reportado que Pb genera estrés oxidativo debido a que actúa como catalizador de reacciones oxidantes llevando a una reducción de los antioxidantes (Ercal *et al.*, 2001). De modo que Al y Pb se encuentran involucrados en el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando, entre otros, daño al ADN como los rompimientos de cadena sencilla (Ercal *et al.*, 2001; Scanlon *et al.*, 2017). En adición a lo anterior, Ni y Pb en el año 1990 y 1987, respectivamente fueron catalogados en el grupo 2B de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2018). Además, 20 años después catalogaron los compuestos de Ni y Pb en el grupo 1 y 2A, respectivamente (IARC, 2018). De acuerdo a la clasificación de la IARC, los grupos representan a los agentes carcinógenos para humanos (1), al probable carcinógeno a humanos (2A) y al posible carcinógeno a humanos (2B), lo que, se relaciona con su nivel de genotoxicidad. En estos reportes se puede observar como la mezcla de metales puede generar distintas respuestas a la esperada por la acción de un solo contaminante, las cuales son derivadas de la interacción de sus componentes. Las

interacciones pueden ser sinérgicas, en la que el efecto de la mezcla de metales es mayor que la suma de su efecto individual; o antagónica, en donde la mezcla de metales reduce el impacto (Murillo-Herrera, 2015). Por lo anterior, la mayor contribución que presentaron el Ni y el Pb sobre el daño genético observado en los individuos de *L. irroratus* podría estar relacionado con el hecho de que estos dos metales se encuentran en una mezcla compleja de metales dentro del organismo, presentando un efecto sinérgico.

Por otro lado, está bien establecido que el Al es un elemento neurotóxico (Kawahara & Kato-Negishi, 2011), por lo que, es considerado tóxico para animales (Becaria *et al.*, 2002). Las características químicas del Al le permiten unirse a los grupos fosfato como los del ADN y ARN; lo que lleva a la inducción de cambios conformacionales en la cromatina y a la alteración de la expresión de varios genes (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). Además se ha reportado que el aluminio puede potenciar la producción de especies reactivas de oxígeno en conjunto con Fe y Cu. El Fe y el Cu, son metales que se encuentran presentes en los organismos (Volke *et al.*, 2005; Valavanidis & Vlachogianni, 2010) y son conocidos como metales pre-oxidantes y el Al potencia la capacidad de producir estrés oxidativo de estos metales (Becaria *et al.*, 2002). Además, en la mezcla de metales encontrados bioacumulados en el hígado de *L. irrotatus* también se encuentran en cantidades importantes Fe y Cu, por lo que, la contribución importante del aluminio al daño genético observado en los individuos colectados podría estar relacionado con la interacción del Al con el Fe y el Cu.

Es importante comentar que estos datos surgen tomando en cuenta sólo los factores de concentración e interacción de metales con el daño en el ADN. El daño genético total de estos roedores, no puede ser atribuible totalmente a la exposición a metales. Lo anterior, tiene una relación con el daño genético observado en los individuos colectados en el sitio testigo. Los estudios realizados en especies silvestres como en el presente trabajo se llevan en condiciones no controladas, debido a que las especies bajo estudio se encuentran en su hábitat natural donde pueden estar expuestas a diversos factores que, además de los metales, pueden

ocasionar roturas de cadena del ADN como la luz solar, enfermedades y estrés (Bickham *et al.*, 2000; Dhawan *et al.*, 2009).

Por otra parte, los individuos de los sitios expuestos no solo presentaron un mayor daño genético en comparación con los individuos testigo, sino que también presentaron diferencias significativas entre ellos, siendo mayor el daño genético en los individuos colectados en el jale 1 en relación con los colectados en el jale 2. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mussali- Galante y cols. (2013b) quienes reportaron que la bioacumulación de metales en riñón de *P. melanophrys* es diferencial entre los tres jales de Huautla analizados en ese estudio, sugiriendo una relación con el tamaño y el tiempo de abandono de cada uno de los jales. El jale 1, tiene menor tiempo de abandono en relación al jale 2, esto sugiere que el jale 2 que tiene un mayor tiempo de abandono también ha presentado una mayor cantidad de procesos que provocan la dispersión de los metales y por ende una disminución de estos en la zona, como la lixiviación y la erosión (Velasco *et al.*, 2004). Otro estudio realizado en los jales de Huautla, reportó un mayor daño genético en individuos de *B. musculus* dependiente de la distancia del jale a el sitio donde fueron capturados, debido a un gradiente de concentración de metales (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012), así como en otros estudios (Scheirs *et al.*, 2006; Pra *et al.*, 2008).

Las diferencias en el daño genético observado entre los individuos de las poblaciones de *L. irroratus* son explicadas debido a las características interindividuales. Las diferentes respuestas entre los individuos de una población, se han observado en otros estudios con roedores. Por ejemplo, en los individuos de una población de *B. musculus* expuesta a metales las hembras presentaron significativamente un mayor daño genético en comparación con los machos de la misma población, debido al resultado de una evolución diferencial en la isoforma del citocromo P450 y a un efecto hormonal (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). También, otros estudios reportan que en poblaciones de *Rattus norvegicus* y *Rattus optimus* se encontró una mayor concentración de metales en especímenes jóvenes que en adultos, mencionando que los resultados pueden ser explicados debido a que los

roedores juveniles presentan un mayor requerimiento de energía, lo cual los lleva al consumo de mayores cantidades de alimento (Zarrintab & Mirzaei, 2017).

### **Estructura y diversidad genética en población de *Liomys irroratus***

Los valores de diversidad genética de las tres poblaciones en este estudio indican que tanto los sitios expuestos como el testigo son muy diversos genéticamente ( $H_E=0.87$  para el Jale 1,  $H_E=0.85$  para el Jale 2 y  $H_E=0.88$  para Quilamula). Estos resultados son similares a otros estudios realizados en poblaciones de roedores, donde la diversidad genética esperada en sitios no contaminados es de  $H_E=0.86$  en *Rattus fuscipes* (Peakall & Lindenmayer, 2006) y  $H_E=0.88$  en *Microtus arvalis* (Gauffre *et al.*, 2008),  $H_E=0.81$  en *P. melanophrys* (Mussali-Galante *et al.*, 2013b),  $H_E=0.81$  en *L. pictus* (Vázquez-Domínguez & Garrido-Garduño, 2013) y  $H_E=0.79$  en *L. irroratus* (Hernandez-Sosa, 2015). Sin embargo, la heterocigosis esperada en las poblaciones de *L. irroratus* que habitan los jales difiere con lo reportado por Mussali-Galante y cols. (2013b), estudio realizado también en los jales de Huautla, ya que encontraron una disminución de la  $H_E$  en las poblaciones de *P. melanophrys*. La diferencia de la heterocigosis esperada entre estas dos especies de roedores, muestra que a diferencia de la población de *P. melanophrys*, *L. irroratus* no presenta alteraciones genéticas a nivel de población, sugiriendo cierta tolerancia o adaptación de la especie a ambientes perturbados.

Los valores obtenidos de la heterocigosis observada (jale 1  $H_O = 0.46$ , jale 2  $H_O = 0.54$ , y testigo  $H_O = 0.53$ ), fueron menores a los valores de la heterocigosis esperada en cada una de las poblaciones muestreadas de *L. irroratus*. Los valores menores de la heterocigosis observada en comparación con la esperada también se ha observado en poblaciones de *L. pictus* con valores de  $H_O=0.65$  y  $H_E=0.8$  (Vázquez-Domínguez & Garrido-Garduño, 2013), así como en poblaciones de la misma especie con valores de  $H_O=0.53$  y  $H_E=0.79$  (Hernández-Sosa, 2015). Los valores de la heterocigosis observada nos indican que hay un déficit de heterocigotos en las poblaciones de *L. irroratus*, lo que, también se puede observar en el índice de endogamia calculado para cada una de las poblaciones analizadas (Jale1  $F_{IS}=0.46$ , Jale2  $F_{IS}=0.36$ , y Testigo  $F_{IS}=0.39$ ), a pesar de que

esta especie es la segunda más abundante en Huautla (Cadena, 2003). Por lo tanto, se sugiere que los niveles de homocigotos observados en las poblaciones de *L. irroratus* se deben, en parte, a eventos propios de historia de vida de la especie como su baja vagilidad y un hábito territorial (Berckmoes *et al.*, 2005; Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012; Hernández-Sosa, 2015).

Así mismo, el análisis de varianza molecular mostró que la mayor variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones que entre poblaciones, es decir, no se observó una diferenciación genética entre las poblaciones de *L. irroratus* muestreadas con ninguno de los dos modelos de mutación utilizados (IAM y SMM). A pesar de que hubo una diferencia significativa con el modelo de alelos infinitos ( $\Phi_{ST}=0.033$ ,  $P<0.05$ ), los valores son muy bajos como para poder considerarse que existe una estructura genética. En especies de roedores, en poblaciones separadas en una escala local (5-10 km) puede considerarse una diferenciación genética con valores de  $F_{ST}>0.05$  (Peakall *et al.*, 2003). Nuestros resultados difieren con lo reportado para las poblaciones de *P. melanophrys* colectado en el mismo sitio de estudio, ya que en ellas si se encontró una estructuración genética entre las poblaciones expuestas y la población testigo, bajo ambos modelos de mutación  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  dando valores mayores a 0.05 (Mussali-Galante *et al.*, 2013b). Con respecto a otras poblaciones de roedores en otros sitios contaminados, también se encontró una estructuración genética entre poblaciones *Spermophilus mollis*, *Rattus norvegicus* y *P. melanophrys* (Antolin *et al.*, 2001; Gardner-Santana *et al.*, 2009).

En general, la pérdida de estructura y diversidad genética se puede atribuir a la selección de genotipos tolerantes y a la eliminación de aquellos intolerantes, a la reducción del tamaño de la población y a una disminución del flujo genético debido a la exposición a metales (Mussali-Galante *et al.*, 2013b). Los datos obtenidos en este estudio, sugieren que las fuerzas evolutivas aún no han actuado distintivamente entre las poblaciones de *L. irroratus*, a pesar de que los individuos colectados en los jales se encuentren expuestos a metales y presenten efecto a nivel individual (daño genético), por ende no han causado alteraciones en la estructuración genética entre las poblaciones de *L. irroratus*. Otra causa que

puede explicar la no estructuración genética entre poblaciones son los parámetros demográficos como una alta densidad poblacional (Bickham *et al.*, 2000), ya que *L. irroratus* ha sido reportada como la segunda especie más abundante de la Sierra de Huautla (Cadena, 2003). Además, el flujo génico juega un papel importante en la diferenciación genética entre las poblaciones de *L. irroratus* (Peakall *et al.*, 2003; Berckmoes *et al.*, 2005). El número de alelos privados es una medida de flujo genético, ya que al existir una reducción en el número de migrantes entre las poblaciones involucradas, las mutaciones incrementan diferencialmente en éstas, generando así alelos únicos en cada población (Mills & Allendorf, 1996). En este estudio se observó un número bajo de alelos privados y no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones, lo que sugiere que aún existe suficiente intercambio genético entre los sitios que contrarrestan la diferenciación genética entre las poblaciones de *L. irroratus*. Sin embargo, un estudio realizado en el roedor *Apodemus sylvaticus*, donde no se encontró una estructuración entre las poblaciones que habitan sitios contaminados por metales y las poblaciones que habitan sitios no contaminadas, sugiere que el flujo genético podría estar enmascarando los efectos negativos de la contaminación por metales en la estructura genética de la población (Berckmoes *et al.*, 2005).

Con respecto al índice de parentesco, el cual es una medida de diversidad genética individual, mostró que los individuos que conforman las poblaciones de *L. irroratus* presentan niveles altos de endogamia, esto concuerda con lo que se observó en el parámetro  $F_{IS}$  en este trabajo. En el análisis de regresión múltiple entre el  $IR$  y la bioacumulación de metales en hígado de *L. irroratus* mostró que de la mezcla de metales, el aluminio y el níquel también contribuyen al aumento del índice de parentesco en los individuos analizados. Además, al realizar los análisis de correlación entre el  $IR$  y el daño genético se observó que entre mayor daño genético en los individuos de *L. irroratus* también aumentan los valores de  $IR$ . Lo anterior es interesante, ya que los metales causan daño genético como aberraciones cromosómicas y un incremento en las especies reactivas de oxígeno que generan la fragmentación de macromoléculas como el ADN (Bickham *et al.*, 2000). Estos factores están relacionados con una menor longevidad,

enfermedades degenerativas, mayor envejecimiento, así como alteraciones en gametos en individuos expuestos a este tipo de contaminantes (Leonard *et al.*, 2004; Forgacs *et al.*, 2012). Lo anterior, puede generar cambios en la población a largo plazo, debido a procesos como la selección natural y cuellos de botella, por ejemplo la disminución de la eficacia biológica (Bickham *et al.*, 2000; Mussali-Galante *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, los niveles altos de endogamia podrían estar dados debido a eventos propios de historia de vida de la especie como una baja vagilidad y un hábito territorial (Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). En un estudio conductual realizado en individuos de *L. irroratus*, se encontró que los animales que habitan en la zona de los jales de la Sierra de Huautla presentaron conductas que indican mayor estrés que los animales colectados del sitio testigo, así como conductas menos arriesgadas y no explorativas (Hernández-Plata *et al.*, datos no publicados). La respuesta individual al estrés podría tener un impacto en los hábitos de la especie y por ende en la población. Por ejemplo, en un ambiente silvestre es fundamental una respuesta rápida y eficiente ante los depredadores, de lo contrario, podrían ser vulnerables a las situaciones de peligro conduciendo en última instancia a una disminución de la densidad poblacional. Asimismo, las conductas menos arriesgadas y no explorativas podrían llevar al incremento de la endogamia debido a que disminuyen su tasa de exploración, aumentando la probabilidad de reproducirse con individuos co-sanguíneos (Hernández-Plata *et al.*, datos no publicados). A pesar de los niveles altos del índice de parentesco entre los individuos de las poblaciones de *L. irroratus* y su relación que existe con los niveles de daño genético y la bioacumulación de Al y Ni en hígado de individuos de *L. irroratus*, a nivel de población no se observa que los índices de endogamia lleven a una diferenciación entre las poblaciones, sugiriendo que los niveles altos de variación genética y elevado flujo genético ( $Nm = 7$ ) hace que se comporten como una sola población, como se observa en los resultados del análisis de varianza molecular. Sin embargo, las conductas de estrés y no arriesgadas que se presentan en los individuos de *L. irroratus* colectados en los

jales, podría tener un impacto a largo plazo en los niveles de endogamia y por lo tanto, reducir su tamaño poblacional y flujo genético.

### ***Liomys irroratus* como especie centinela**

En el distrito minero de Huautla, los mamíferos son el grupo de animales más estudiado, de éstos 14 especies pertenecen a roedores, de las cuales, las más abundantes en la zona son *Baiomys musculus* (con el 47.76%), *Liomys irroratus* (con el 35.01%), *Peromyscus levipes* y *P. melanophrys* (en conjunto 15.21%) (Cadena, 2003). En el sitio, existen reportes donde proponen a *B. musculus* y a *P. melanophrys* como especies centinelas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013b). Sin embargo, no existe reporte en relación a *L. irroratus*.

Con respecto a la bioacumulación de metales, se obtuvo una mayor concentración en hígado de *L. irroratus* (1201.66 µg/g), las otras dos especies *B. musculus* (196.6 µg/g) y *P. melanophrys* (166.94 µg/g) presentaron estadísticamente una concentración similar de metales entre ellas (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012) pero menor concentración en comparación con *L. irroratus*. Con respecto a los niveles de daño genético, se observó un mayor daño en los individuos de *B. musculus* en ambos sitios de estudio (jales 176.07 micras y testigos 46.56 micras), en comparación con los niveles de daño genético observado en individuos de *P. melanophrys* (jales 159.60 micras, y testigos 36.08 micras. Tovar-Sánchez *et al.*, 2012), y en los individuos de *L. irroratus* (jales 57.67 micras, y testigos 28.5 micras). Es importante mencionar que el estudio realizado en las poblaciones de *B. musculus* y *P. melanophrys*, sólo analizan el efecto de metales a nivel de individuo (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). Por otra parte, Mussali-Galante y cols. (2013b) reportaron un efecto por exposición a metales a nivel de población, las poblaciones expuestas a metales de *P. melanophrys* presentaron una menor diversidad genética que las poblaciones testigo, en contraste con lo observado en las poblaciones de *L. irroratus*. Un punto importante de mencionar es que el incremento del número y el tipo de biomarcadores, provee una mejor información acerca de los efectos que se observan en sitios contaminados y

ayudan a establecer una relación entre los contaminantes ambientales y los efectos a nivel poblacional (Bickham *et al.*, 2000; Mussali-Galante *et al.*, 2014).

De acuerdo a que las especies centinelas proveen información esencial y temprana que advierte de efectos por contaminantes que se encuentran en el ambiente a lo largo del tiempo, como son la presencia de metales, proporcionando un rápido diagnóstico de riesgo potenciales a la salud humana y calidad del ecosistema (Burger *et al.*, 2004; Valavanidis & Vlachogianni, 2010), *L. irroratus* no mostró ser una especie centinela para estudios ecotoxicológicos con base a los resultados obtenidos en este estudio utilizando marcadores nucleares, ya que a pesar de mostrar un efecto a nivel individual aún no se observan alteraciones a nivel de población.

A pesar de que los mamíferos pequeños han sido excelentes candidatos para ser considerados como monitores de contaminantes (Beeny, 2001; Basu *et al.*, 2007; Levengood & Heske, 2008), no todos pueden ser especies centinelas debido a que cada especie responde de manera diferencial al estrés, dependiendo de la susceptibilidad de cada una (Mussali-Galante *et al.*, 2014), como se puede observar en las diferencias encontradas en la bioacumulación, daño genético y en la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de las tres diferentes especies de roedores que habitan en los jales de Huautla. Esto se debe a que la historia de vida, el comportamiento de forrajeo y la fisiología propias de cada especie son factores importantes en los efectos de los metales (Zarrintab & Mirzaei, 2017). Acorde a esto, a pesar de la poca información acerca de las especies utilizadas en estos estudios, se han reportado diferencias entre estas especies. *B. musculus* es un roedor de talla pequeña, de hábitos crepusculares que habita zonas con una vegetación densa, encontrado cercano a rocas y a lo largo de corrientes. Además construye nidos comunales, es un herbívoro generalista pero en su dieta incluye semillas e insectos en mayor porcentaje (Packard *et al.*, 1978; Reid & Vázquez, 2016). Por otra parte, *P. melanophrys* es de hábitos nocturnos y arborícolas, además construye nidos tejidos con hierbas (Vázquez & Álvarez-Castañeda, 2016) y con respecto a *L. irroratus* se sabe que es una especie territorial, tiene hábitos nocturnos y carácter oportunista (Mason-

Romo, 2005; Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). Poseen abazones en las mejillas cubiertas de pelaje, los cuales, le permiten la recolección eficiente y el transporte de alimento hasta su madriguera construida bajo troncos, rocas o arbustos (Dowler & Genoways, 1978; Linzey *et al.*, 2008; Santos-Moreno & Santiago-Marcial, 2012). Otros factores importantes en las diferencias encontradas es la capacidad de absorción de metales por el tracto digestivo; debido a que está influenciado por varios factores como la edad, el pH y el contenido del estómago de cada individuo (Kawahara & Kato-Negishi, 2011), así como el metabolismo; ya que la expresión de la enzima que cataliza la oxidación y reducción de una variedad de compuestos tanto endógenos como exógenos en mamíferos, citocromo P450, es diferencial dependiendo de la especie de quien se trate (Kedderis & Mugford, 1998).

## CONCLUSIONES

El presente estudio correlacionó los datos obtenidos de tres tipos de marcadores biológicos; de exposición, de efecto temprano y permanentes, de poblaciones de *Liomys irroratus*, roedores que habitan en los jales de Huautla, Morelos, para evaluar a esta especie como bioindicador en estudios ecotoxicológicos. Derivado de lo anterior, se concluye lo siguiente:

- Las poblaciones de *L. irroratus* que habitan los jales, están expuestas a una mezcla de metales, los cuales fueron bioacumulados en el hígado de estos individuos.
- Las poblaciones de *L. irroratus* expuestas a metales presentaron un mayor daño genético con respecto a la población testigo. Además, los niveles de daño genético se correlacionaron con la bioacumulación de Al, Ni y Pb en hígado de *L. irroratus*.
- Usando microsatélites, no se observó un efecto de la exposición a metales sobre la diversidad genética dentro y entre poblaciones de *L. irroratus*. Sin embargo, el índice de parentesco si mostró una correlación con el daño genético y la bioacumulación de metales, lo que indica un efecto a nivel individual aunque aún no se vea reflejado a nivel poblacional debido a la alta variabilidad genética de las poblaciones de *L. irroratus*.
- Con base a los resultados de este estudio *L. irroratus* no puede ser considerada como especie centinela para estudios ecotoxicológicos, debido a que aún no presenta cambios en la diversidad genética poblacional, por lo cual, no es una advertencia temprana de efectos por exposición a metales a nivel población.

## LITERATURA CITADA

- ALOUPI, M., A. Karagianni, S. Kazantzidis, y T. Akriotis. (2017). Heavy metals in liver and brain of waterfowl from the Evros Delta, Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72:215-234.
- ANTOLIN, M. F., B. Van Horne, M. D. Berger, A. K. Holloway, J. L. Roach, y R. D. Weeks. (2001). Effective population size and genetic structure of a Piute ground squirrel (*Spermophilus mollis*) population. *Canadian Journal of Zoology*, 79:26-34.
- ANTÓN, A., T. Serran, E. Angulo, G. Ferrero, y A. Rallo. (2000). The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. *Science of the Total Environment*, 247:239-251.
- ARIF, I., y H. Khan. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32:9-17.
- ARMIENTA, M., O. Villaseñor, y F. Romero. (2005). Propuesta de estrategia metodológica para la evaluación de la peligrosidad de jales mineros en México. *XXVI Convención Internacional de minería*. Veracruz, Ver. 374 pp.
- BASU, N., A. Scheuhammer, S. Bursian, J. Elliott, K. Rouvinen-Watt, y H. Man Chan. (2007). Mink as a sentinel species in environmental health. *Environmental Research*, 103:130-144.
- BECARIA, A., A. Campbell, y S. C. Bondy. (2002). Aluminum as a toxicant. *Toxicology and Industrial Health*, 18:309-320.
- BEEBY, A. (2001). What do sentinels stand for?. *Environmental Pollution*, 112:285-298.
- BERCKMOES, V., J. Scheirs, K. Jordaens, R. Blust, T. Backeljau, y R. Verhagen. (2005). Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus Sylvaticus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:2898-2907.
- BICKHAM, J., S. Sandhu, P. Hebert, L. Chikhi, y R. Athwal. (2000). Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations:

- implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, 463:33-51.
- BURGER, J. (1995). Heavy metal and selenium levels in feathers of herring gulls (*Larus argentatus*): differences due to year, gender, and age at Captree, Long Island. *Environmental Monitoring and Assessment*, 38:37-50.
- BURGER, J., y M. Gochfeld. (1996). Heavy metal and selenium levels in Franklin's gull (*Larus pipixcan*): parents and their eggs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30:487-491.
- BURGER, J., y M. Gochfeld. (2004). Marine birds as sentinels of environmental pollution. *Ecohealth*, 1:263-274.
- CADENA, M. (2003). Efecto de la perturbación y estacionalidad en la comunidad de roedores en una selva baja caducifolia en Morelos, México. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas de Puebla. Puebla, Puebla. 80 pp.
- CONANP. (2005). Programa de Conservación y Manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. México, D.F., 207pp.
- COOKE, J., S. Andrews, y M. Johnson. (1990). Lead, zinc, cadmium, and fluoride in small mammals from contaminated grassland established on fluorspar tailings. *Water Air and Soil Pollution*, 51:43-54.
- DA SILVA, J., T. De Freitas, J. Marinho, G. Speit, y B. Erditmann. (2000). An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23:241-245.
- DAUWE, T., E. Janssens, B. Kempnaers, y M. Eens. (2004). The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs. *Environmental Pollution*, 129:125-129.
- DHAWAN, A., M. Bajpayee, y D. Parmar. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25:5-32.
- DOWLER, R., y H. Genoways. (1978). Mammalian Species: *Liomys irroratus*. *The American Society of Mammalogists*, 82:1-6.

- ERCAL, N., H. Gurer-Orhan, y N. Aykin-Burns. (2001). Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1:529-539.
- EXCOFFIER, L., y H. Lischer. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10:564-567.
- FORGACS, Z., P. Massanyi, N. Lukac, y Z. Somosy. (2012). Reproductive toxicology of nickel-Review. *Journal of Environmental Science and Health*, 47:1249-1260.
- FRASIER, T. (2008). STORM: software for testing hypotheses of relatedness and mating patterns. *Molecular Ecology Resources*, 8:1263-1266.
- GALL, J. E., R. S. Boyd, y N. Rajakaruna. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187:201.
- GARDNER-SANTANA, L. C., D. E. Norris, C. M. Fornadel, E. R. Hinson, S. L. Klein, y G. E. Glass. (2009). Comensal ecology, urban landscapes and their influence on the genetic characteristics of city-dwelling Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Molecular Ecology*, 18:2766-2778.
- GAUFFRE, B., A. Estoup, V. Bretagnolle, y F. Cosson. (2008). Spatial correlation structure of a small rodent in heterogeneous landscape. *Molecular Ecology*, 17:4619-4629.
- HANDY, R., T. Galloway, y M. Depledge. (2003). A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12:331-343.
- HARTWIG, A. (2000). Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure and Applied Chemistry*, 72:1007-1014.
- HERNÁNDEZ, B. del C. (2000). Caracterización espacial y contenido de madrigueras de *Liomys pictus* en una selva baja de Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Iztacala. 40 pp.

- HERNÁNDEZ-LORENZO, B. (2015). Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis laevigata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 65 pp.
- HERNANDEZ-SOSA, S. (2015). Biomarcadores permanentes para evaluar la salud de ecosistemas contaminados por metales pesados: El caso de *Liomys irroratus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Jiutepec, Morelos. 58 pp.
- HOFFMANN, A., y P. Dabron. (2007). Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. *Ecology Letters*, 10:63-76.
- HYUN-SOO, K., K. Yeo-Jin, y S.Young-Rok. (2015). An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention. *Journal of Cancer Prevention*, 20:232-240.
- IARC. (2018). International Agency for Research on Cancer [En línea, disponible en: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php). Consulta el 30/01/2018].
- IERADI, L. A., J. Zima, F. Allegra, E. Kotlánová, L. Campanella, R. Grossi, y M. Cristaldi. (2003). Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zoologica*, 52:57-66.
- INEGI. (2009). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Información Geográfica del Estado de Morelos, México.
- INEGI. (2010). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Sistema para la consulta de la Síntesis Estadísticas Municipales. México.
- JAISHANKAR, M., T. Tseten, N. Anbalagan, B. Mathew, y K. Beeregowda. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*, 7:60-72.
- JAN, A., M. Azam, K. Siddiqui, A. Ali, I. Choi, y Q. Haq. (2015). Heavy metals and human health: mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:29592-29630.

- JARVIS, T. A., J. M. Lockhart, W. J. Loughry, y G. K. Bielmyer. (2013). Metal accumulation in wild nine-banded armadillos. *Ecotoxicology*, 22:1053-1062.
- KAWAHARA, M., y M. Kato-Negishi. (2011). Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011:1-18.
- KEARSE, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, *et al.* (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28:1647-1649.
- KEDDERIS, G. L., y C. A. Mugford. (1998). Metabolism of Xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews*, 30:441-498.
- KIM R-Y., J-K. Yoon, T-S. Kim, J. Yang, G. Owens, y K-R. Kim. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation- a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*. 37:1041-61.
- LAURINOLLI, M., y L. Bendell-Young. (1996). Copper, zinc, and cadmium concentrations in *Peromyscus maniculatus* sampled near an abandoned copper mine. *Environmental Contamination Toxicology*, 30:481-486.
- LEONARD, S., J. Bower, y X. Shi. (2004). Metal-induced toxicity, carcinogénesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255:3-10.
- LEVENGOOD J., y E. Heske. (2008). Heavy metal exposure, reproductive activity, and demographic patterns in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a contaminated wetland. *Science of Total Environment*, 389:320-328.
- LINZEY, A., R. TIMM, S. Álvarez-Castañeda, I. Castro-Arellano, y T. Lacher. (2008). *Liomys irroratus*. [En línea, disponible en <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T2465A22330412.en>. Consulta el 13/02/2018].

- LOWE, A., S. Harris, y P. Ashton. (2005). Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application. *Blackwell Publishing*, 326 pp.
- MARTÍNEZ-PACHECO, M. (2008). Evaluación de los efectos genotóxicos de metales presentes en el agua de bebida de la población de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. 89 pp.
- MASON-ROMO, E. D. (2005). Efectos de la perturbación del hábitat y la estacionalidad climática en la dieta del ratón espinoso mexicano *Limomys irroratus* (Gray, 1868) en una selva seca del sur del estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 137 pp.
- MCLEAN, J., y B. Bledsoe. (1996). Chapter 3: Behavior of metals in soils. En J. Russell (Ed.), EPA Environmental Assessment Sourcebook. Chelsea, Michigan: *Ann Arbor Press, Inc.* 19-56 pp.
- MEDINA, M., J. Correa, y C. Barata. (2007). Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67:2105-2114.
- MILLS, S. L., y F. W. Allendorf. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 10:1509-1518.
- MILTON, A., J. Cooke, y M. Johnson. (2003). Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44:405-411.
- MÜLLER, H., y B. Schweizer. (1994). Biochemical applications for UV/ vis spectroscopy DNA, protein and kinetic analysis. Perkin Elmer. Ueberlingen, Alemania. 931 pp.
- MURILLO-HERRERA, A. (2015). Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. 66 pp.

- MUSSALI-GALANTE, P., E. Tovar-Sánchez, M. Valverde, L. Valencia-Cuevas, y E. Rojas. (2013b). Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanophrys* chronically exposed to mine tailings in Morelos, Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 20:7666-7679.
- MUSSALI-GALANTE, P., E. Tovar-Sánchez, M. Valverde, y E. Rojas del Castillo. (2013a). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de contaminación Ambiental*, 29:117-140.
- MUSSALI-GALANTE, P., E. Tovar-Sánchez, M. Valverde, y E. Rojas. (2014). Genetic structure and diversity of animal populations exposed to metal pollution. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 227:79-106.
- NCR. (1987). Committee on biological markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74:3-9.
- NEDJOUND, G., B. Houria, R. Rachid, D. Amira, y D. Reda. (2009). Impact of pollution by industrial metallic dust on bio-accumulator organism *Helix aspersa*. *Global Veterinaria*, 3:276-280.
- NOMBELA, C. (2002). Efectos del derrame de metales tóxico pesados en el parque ecológico Doñana, España. *Science soil*, 5:153-161.
- PACKARD, R. L., y J. B. Montgomery. (1978). *Baiomys musculus*. *American Society of Mammalogists*, 102:1-3.
- PALANZA, P., F. Morellini, S. Parmigiani, y F. vomSaal. (2002). Ethological methods to study the effects of maternal exposure to estrogenic endocrine disrupters a study with methoxychlor. *Neurotoxicology and Teratology* 24:55-69.
- PEAKALL, R., M. Ruibal, y D. Lindmeyer. (2003). Spatial correlation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution*, 57:118-295.

- PEAKALL, R., y D. Lindenmayer. (2006). Genetic insights into population recovery following experimental perturbation in a fragmented landscape. *Biological Conservation*, 132:520-532.
- PEAKALL, R., y P. E. Smouse. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28:2537-2539.
- PELES, J., W. Towlery, y S. Guttman. (2003). Population genetic structure of earthworms (*Lumbricus rubelluz*) in soils contaminated by heavy metals. *Ecotoxicology*, 12:379-386.
- PÉREZ, A. (2014). 2012 Minerals Yearbook: The mineral industry of Mexico. *Science for a changing world*, 14 pp.
- PRA, D., S. I. Rech-Frenke, R. Giulian, M. L. Yoneama, J. Ferraz-Diaz, B. Erdtmann, y J. A. Pegas-Henriques. (2008). Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. *BioMetals*, 21:289-297.
- REID, F. y E. Vázquez. (2016). *Baiomys musculus* (errata version published in 2017). [En línea, disponible en <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T2465A22330412.en>. Consulta el 13/02/2018].
- RODRÍGUEZ-ESTIVAL, J., y J. Smits. (2016). Small mammals as sentinels of oil sands related contaminants and health effects in northeastern Alberta, Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124:285-295.
- ROJAS, E., M. López, y M. Valverde. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722:225-254.
- SÁNCHEZ, C. H., y M. A. Romero. (1992). Mastofauna silvestre del ejido el Limón, municipio de Tepalcingo, Morelos. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 2:87-95.
- SÁNCHEZ-CHARDI, A., M. J. López-Fuster, y J. Nadal. (2007). Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater White-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex- and age-dependent variation. *Environmental Pollution*, 145:7-14.
- SANTOS-MORENO, A., y A. Santiago-Marcial. (2012). Área de actividad y movimientos de *Liomys irroratus* (Rodentia: Heteromyidae) en una selva

- mediana de Tuxtepec, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83:496-502.
- SANTOYO-MARTÍNEZ, M. (2016). Bioacumulación, daño genotóxico y cambios en la morfología foliar de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 71 pp.
- SCANLON, S. E., C. D. Scanlon, D. C. Hegan, P. L. Sulkowski, y P. M. Glazer. (2017). Nickel induces transcriptional down-regulation of DNA repair pathways in tumorigenic and non-tumorigenic lung cells. *Carcinogenesis*, 38:627-637.
- SCHEIRS, J., A. Coan, A. Covaci, J. Beernaert, M. Kayawe, M. Caturla, H. Wolf, *et al.* (2006). Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure age, and gender related effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25:2154-2162.
- SE. (2014). Secretaría de Economía. Panorama Minero del Estado de Morelos. Servicio Geológico Mexicano.
- SE. (2017). Secretaría de Economía. Acciones y programas, Minería [En línea, disponible en: [www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria](http://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria). Consulta el 08/03/2017].
- SEMARNAT. (2004). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Dirección general del centro nacional de investigación y capacitación ambiental. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa I.
- SEMARNAT. (2005). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Dirección de investigación en residuos y sitios contaminados. Subdirección de investigación en sitios contaminados y sustancias toxicas. Informe anual de actividades. Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II.
- SOLÍS-MIRANDA, 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, Cuernavaca, Morelos. 147 pp.
- TEITELBAUM, D. (2012). Cap 56: introducción a la toxicología ocupacional y ambiental. *KMcGraw Hill*, 56:1001-1011.
- TÊTE, N., E. Afonso, G. Bouguerra, y R. Scheifler. (2015). Blood parameters as biomarkers of cadmium and lead exposure and effects in wild Wood mice (*Apodemus sylvaticus*) living along a pollution gradient. *Chemosphere*, 138:940-946.
- THOMASON, R. K., J. M. Lockhart, W. J. Loughry, y G. K. Bielmyer-Fraser. (2016). Metal accumulation in bobcats in the Southeastern USA. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188:565.
- TOVAR-SÁNCHEZ, E., L. Cervantes, C. Martínez, E. Rojas, M. Valverde, M. Ortiz-Hernández, y P. Mussali-Galante. (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19:1677-1686.
- TOVAR-SÁNCHEZ, E., P. Mussali-Galante, M. Martínez-Pacheco, M. L. Ortiz-Hernández, E. Sánchez-Salinas, y A. Olvera-Velona. (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 32:101-117.
- U.S. EPA. (2007). US Environmental Protection Agency. The environmental management (soil quality standards) regulations. (cap 121). 25 pp.
- VALAVANIDIS, A., y T. Vlachogianni. (2010). Metal pollution in ecosystems. ecotoxicology studies and risk assessment in the marine environment. *Science advances on Environment, Toxicology y Ecotoxicology issues*.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. Hutchinson, D. Wills, y P. Shipley. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Resources*, 4:535-538.
- VÁZQUEZ, E., y S. T. Álvarez-Castañeda. (2016). *Peromyscus melanophrys* (errata version published in 2017). [En línea, disponible en

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T16677A22363488.en>.

[Consulta el 13/02/2018].

- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., y T. Garrido-Garduño. (2013). Characterization of 14 polymorphic microsatellite loci from the spiny pocket mice, *Liomys pictus*. Citado como: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. *Molecular Ecology Resources*, 13: 966-968.
- VELASCO, J., D. De la Rosa, G. Solórzano, y T. Volke. (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. SEMARNAT-INE. México. 36 pp.
- VOLKE, T., J. Velasco, y D. De la Rosa. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. SEMARNAT. México.
- VOLKE, T., y J. Velasco. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México. 64 pp.
- WHO. (2007). World Health Organization. Health risks of heavy metals from long range transboundary air pollution. *European Committee*.
- WILSON, D., y D. Reeder. (2005). Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference (3era Ed). *Johns Hopkins University Press*, 2142 pp.
- WRIGHT, R., y A. Baccarelli. (2007). Metals and neurotoxicology. *The Journal of Nutrition*, 137:2809-2813.
- ZARRINTAB, M., y R. Mirzaei. (2017). Evaluation of some factors influencing on variability in bioaccumulation of heavy metals in rodents species: *Rombomys opimus* and *Rattus norvegicus* from central Iran. *Chemosphere*, 169:194-203.