



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los  
jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado  
por metales pesados**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Aída Isabel Murillo Herrera**



**DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

**2015**

**Ciudad Universitaria, D. F.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos de la alumna.  
Murillo  
Herrera  
Aída Isabel  
56701264  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307209904
  
2. Datos de la tutora.  
Dra.  
Sandra Luz  
Gómez  
Arroyo
  
3. Sinodal 1.  
Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García
  
4. Sinodal 2.  
Dr.  
Pedro Rafael  
Valencia  
Quintana
  
5. Sinodal 3.  
Dra.  
María Isabel  
Rodríguez  
Romero
  
6. Sinodal 4.  
Dr.  
Efraín  
Tovar  
Sánchez
  
7. Datos de la tesis.  
Detección de daño genotóxico en *Prosopis laevigata* de los jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados  
66 p.  
2015

*...aquel día precisamente supe [...] que el cerebro humano no puede pensar en dos o más cosas simultáneamente [...] si está impregnado por curiosidad científica...*

*Arthur Conan Doyle*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres Ana e Isaías por todo el apoyo y la confianza que me han brindado a lo largo de mi vida, por todas aquellas veces en las que me han impulsado a seguir adelante y superarme.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Ciencias por darme la oportunidad de pertenecer a la comunidad estudiantil, por las enseñanzas académicas y de vida.

A mi asesora, Dra. Sandra muchas gracias por creer en mi, por apoyarme en todo momento, y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

Al programa de apoyo a la investigación e innovación tecnológica (PAPIIT), proyecto IN-222112 por la beca para la terminación de estudios.

Al Dr. Efraín y la Dra. Patty por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, así como su grupo de trabajo, a sus alumnos Tatiana, Miguel, Javier, Betel, y al resto de las personas que estuvieron involucradas en el trabajo de campo.

A la Maestra Ana Rosa por el apoyo técnico para los ensayos y el análisis microscópico, pero sobre todo por su disposición en ayudarme y su amabilidad.

A todo el comité de sinodales, Dr. Luis Felipe, Dr. Valencia, Dra. Isabel y Dr. Efraín por sus observaciones e interés en mejorar y enriquecer este trabajo, así como su paciencia a lo largo de estos meses.

A mis compañeras de laboratorio Lyz y Yared, por todas aquellas ocasiones en las que me brindaron su apoyo y amistad, en esas tardes largas de experimentos.

A todas aquellas personas, amigos y compañeros con los que conviví todos estos años, y han aportado algo a mi vida.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1. Historia de la minería en México	7
1.1.1. Minería en Morelos	8
1.2. Efectos ambientales de la Minería	9
1.3. Metabolismo de metales	11
1.3.1. Algunos elementos potencialmente tóxicos (EPTs)	15
1.4. Efectos genotóxicos	23
1.4.1. Formación de aductos	24
1.4.2. Ruptura de cadena	25
1.4.3. Mutaciones y alteraciones cromosómicas	25
1.5. Ensayo Cometa	26
1.5.1. Parámetros del ensayo cometa	29
1.6. Especie de estudio	30
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>32</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	35
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>VI. MÉTODOS</b>	<b>36</b>
6.1. Sitios de muestreo	36
6.2. Muestreo de <i>Prosopis laevigata</i>	37
6.3. Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa	37
6.4. Análisis estadístico	38
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
8.1. Interacción toxicológica de mezclas complejas	51
8.1.1. Dinámica de Zn, Cu y Pb en el suelo, absorción y respuesta celular	52
8.2. Genotoxicidad	54
8.2.1. Especies reactivas de oxígeno.	55
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>60</b>

## RESUMEN

A lo largo de la historia la actividad minera en México ha tenido un papel importante en el desarrollo económico. Sin embargo, pocas veces es considerado el impacto ambiental que esta actividad produce. Por esta razón el objetivo del presente estudio fue determinar los efectos genotóxicos que los jales mineros de Huautla, Morelos inducen sobre las poblaciones de *Prosopis laevigata*, que se encuentran expuestas de manera crónica a metales pesados como Cu y Pb, presentes en dichos residuos.

Se tomaron muestras de foliolos de *Prosopis laevigata* presentes en dos sitios de Huautla, Morelos en los que se ubican jales mineros, compuestos por grandes cantidades de elementos potencialmente tóxicos (EPTs). Los individuos testigo fueron obtenidos de Ajuchitlán y Quilamula también ubicados en el municipio de Tlalquitenango, Morelos.

Se evaluó el daño al ADN como biomarcador de efecto genotóxico, evidenciado a través de la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa mediante los parámetros de momento y longitud de la cauda. El daño al ADN fue significativamente más alto en las poblaciones expuestas a jales mineros para los dos parámetros analizados, con respecto a los sitios testigo. Además del análisis a nivel poblacional, se estudió la respuesta de cada individuo de las poblaciones muestreadas, lo que evidenció variaciones en la magnitud del daño causado por los jales a diferencia de los sitios testigo en los que se observaron valores muy homogéneos.

Por otro lado, se realizó un análisis de regresión múltiple por modelos lineales generalizados para relacionar datos obtenidos a partir de un estudio previo realizado en los jales de Huautla, en el que se determinaron concentraciones en suelo y hoja de *Prosopis laevigata* de algunos metales como Cu, Pb y Zn con los valores de daño de la longitud y el momento de la cauda observados, encontrándose que el Cu tuvo el mayor efecto de los tres y en menor medida el Pb, a diferencia del Zn que no tuvo un efecto significativo en el daño.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Historia de la minería en México

La riqueza minera de México está constituida por yacimientos o depósitos minerales, los cuales tienen un origen en la historia geológica propia del País, definidos geográficamente por el basamento o columna vertebral del Precámbrico, el cinturón orogénico Huasteco y el denominado cinturón orogénico cordillerano (Coll-Hurtado et al., 2002). Lo anterior da lugar a que exista una gran riqueza minera conformada tanto por elementos metálicos (como plata, oro, plomo, cobre, zinc, cadmio, entre otros), no metálicos (como el azufre) y minerales tales como fluorita, grafito, barita, caliza, arcilla y carbón de piedra (Delgado de Cantú, 2003).

México se considera como uno de los países más importantes a nivel mundial en términos de riqueza minera, debido a la cantidad y calidad de especies minerales, así como por la diversidad de tipologías en cuanto a depósitos que se pueden encontrar (Canet et al., 2012). Por lo que la actividad minera tiene un papel económico importante. Sin embargo, los efectos ambientales y de salud causados por esta actividad han sido subestimados.

Existen vestigios que indican que las culturas prehispánicas como los nahuas, otomíes, coras, huicholes, yaquis, totonacas, entre otros hacían uso de oro, plata, cobre, estaño y mercurio (cinabrio) en estado nativo, que podían encontrarse en los ríos en forma de pepitas o en vetas. Posteriormente durante la conquista sus conocimientos sobre la naturaleza de los metales y piedras preciosas, así como su ubicación fueron mostrados a los españoles (Muñoz, 1986; Coll-Hurtado et al., 2002; Canet et al. 2012) formándose así grandes centros mineros en todo el país, como en Guanajuato, Taxco y Zumpango (Guerrero), Teotitlán (Oaxaca), Pachuca (Hidalgo), y Zacatecas, entre otros (Canet et al., 2012), donde posteriormente se desarrollaron campos agrícolas y estancias ganaderas hasta ese momento desconocidas en México, generando así cierto grado de urbanización y exploración de caminos hacia el norte del país (Coll-Hurtado et al., 2002), lo que la constituyó como una actividad intensa (Barbosa-Ramírez, 1981).

Con el paso del tiempo, se crearon grandes monopolios y consorcios extranjeros en México (Muñoz, 1986; Coll-Hurtado et al., 2002), caracterizados principalmente por la falta de técnicos capacitados y el empirismo de los trabajos, así como por las malas

condiciones de trabajo para los empleados, lo que hasta épocas recientes es una situación persistente no sólo en la industria minero-metalúrgica del país (Alvarado-García, 2009), esto último generó una serie de movimientos sociales tales como “la huelga de Cananea” en junio de 1906 (compañía estadounidense denominada The Cananean Consolidated Copper Company) en Sonora, la cual estuvo fuertemente relacionada con el estallido de la Revolución Mexicana en 1910 (Alvarado-García, 2009).

A pesar de la gran importancia de esta actividad, la extracción de estos recursos genera una cantidad variada de problemas ambientales, lo que llevó a la publicación de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) (Coll-Hurtado et al., 2002), donde se hace mención de los cuidados que debe haber con los residuos industriales y sobre la construcción de presas de jales con el propósito de almacenar o disponer de los mismos, ya sea en el lugar en el que se originan o a una distancia de 25 km de cuerpos receptores y por ningún motivo cerca de una población, para evitar afectaciones (LGEEPA, 2015). A pesar de esto las empresas mineras constantemente quebrantan las leyes al dejar al aire libre los subproductos de la extracción minera, contaminando agua, suelo y aire, por lo que a pesar de ser una actividad que impulsó el desarrollo de nuestro país, también es una actividad que provoca grandes cantidades de desperdicios tóxicos, destrucción de ecosistemas y contaminación, entre algunos de sus efectos ambientales (Gutiérrez y Moreno, 1995).

### 1.1.1. Minería en Morelos

Entre los estados mineros de la República Mexicana, Morelos es uno de los más importantes, al encontrarse en la parte centro-sur del país su fisiografía es característica al pertenecer a parte de la Sierra Madre del Sur y al Eje Neovolcánico, lo que origina rocas volcánicas y sedimentos continentales, como los depósitos yesíferos lacustres del Mioceno. Por lo anterior, así como por el sustrato geológico consistente en una plataforma de caliza marina del Mesozoico y otros procesos orogénicos, ígneos y metamórficos que datan del Oligoceno-Mioceno y por fluidos hidrotérmicos del Paleoceno, se formaron zonas mineras de importancia económica para la explotación de plata, plomo, cobre y oro (Dorado et al., 2005), además de minerales como caliza, cantera, tezontle, yeso, mármol, ónix, entre otros (Secretaría de Economía, 2011).

Aunque Morelos no tiene una tradición minera comparable con la de otros estados de la

República, hay un distrito minero que se encuentra en la zona de Huautla, en el Municipio de Tlaquiltenango, el cual fue explotado ampliamente durante los siglos XVIII y XIX de manera intermitente hasta 1976 y 1988 cuando la concesión de la explotación perteneció a la compañía Rosario de México S. A. que obtuvo principalmente sulfuros de plata y plomo. Actualmente las minas se encuentran abandonadas o inactivas dentro del polígono de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) decretada como tal en 1999, la cual se limita naturalmente al suroeste por el Río Amacuzac y algunos cerros entre los que se ubica la Sierra de Huautla.

En esta zona la vegetación predominante es la selva baja caducifolia, con clima cálido subhúmedo, temperatura media anual mayor a 22 °C, con lluvias en verano y originalmente suelos de tipo arcilloso como feozem (Dorado et al., 2005), aunque éstos se distribuyen ampliamente en el estado y se caracterizan por una baja permeabilidad debida a las capas arcillosas, es necesario mencionar que grandes extensiones de suelo se encuentran tapadas con jales mineros, por lo que las características fisicoquímicas de interés en este caso corresponden a las de éstos. Volke Sepúlveda et al. (2004) determinaron que estos residuos tienen un pH de 8.20 y una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 30.13 Cmol<sup>+</sup>/kg, valores equivalentes a los de un suelo arcilloso. De los datos revelados por el estudio, es necesario ahondar en la importancia de la capacidad de intercambio catiónico (CIC), ya que ésta se caracteriza por ser una medida de la magnitud que tiene un determinado suelo para retener o adsorber cationes electrostáticamente a un pH determinado, y dado que los metales suelen comportarse como cationes, entre más elevado sea la CIC, mayor cantidad de metales como Cd, Pb y Zn pueden ser atrapados. Lo anterior conlleva a señalar la cantidad de elementos tóxicos que pueden encontrarse inmovilizados en el suelo y los que pueden lixiviar y por lo tanto encontrarse biodisponibles, para lo cual, determinaron que el Pb fue el único elemento lixiviado, encontrando que había una relación inversamente proporcional entre el tamaño de partícula y la concentración de metales, de modo que As, Cd, Pb y V fueron los elementos más abundantes en las partículas menores de 45 µm y los elementos solubles fueron As, Cd, Pb y Hg.

## **1.2. Efectos ambientales de la Minería**

El proceso de explotación minero metalúrgico generalmente conlleva la generación de residuos derivados de la separación del material de interés y el que lo acompaña, los cuales suelen ser depositados en las inmediaciones de las minas, formando lo que se

conoce como jales mineros. Éstos comúnmente se encuentran a cielo abierto y repercuten en el ambiente al generar una fuerte contaminación que impacta desde el suelo hasta los mantos freáticos y los cuerpos de agua, provocando efectos negativos en la biota circundante (Dorado et al., 2005).

La extracción de metales como el Au, Cu, Pb, Zn y U, entre otros, involucra la disminución del tamaño y separación de sus minerales, ya que no están en estado puro, por lo que es necesario comenzar con la excavación de la mina, la remoción de minerales y el proceso de extracción del metal de interés que es lo que generalmente afecta en mayor grado el ambiente al generar elementos potencialmente tóxicos (EPT) tales como arsénico, selenio, plomo, cadmio y óxido de silicio, entre otros, además de las partículas que pueden ser transportadas por el viento (Volke Sepúlveda et al., 2004)

El proceso de separación del mineral de interés y la “ganga terrosa” o material que lo acompaña y que no tiene un beneficio económico definido se lleva a cabo mediante dos procesos denominados: pirometalúrgico e hidrometalúrgico (Volke Sepúlveda et al., 2004). El primero utiliza altas temperaturas para modificarlo químicamente y reducirlo a un metal libre, en este proceso se destacan la calcinación, la tostación, la fundición y la escoria, entre otros. El segundo emplea agua para extraer el metal mediante procesos como la lixiviación (Brown et al., 2004), la purificación, la concentración, la flotación, etc. (Volke Sepúlveda et al., 2004). Independientemente de las técnicas usadas para purificar el mineral, éstas generan residuos de algún tipo que a su vez se encuentran asociados a uno o varios problemas ambientales (Gutiérrez y Moreno, 1995) como:

- Destrucción de la capa de suelo y afectación de flora y fauna debido a la formación de jales (residuos de granulometría fina), aceites, disolventes, ruido, emisiones de gas y polvo.
- Oxidación de compuestos azufrados derivados del descapote, generando a su vez lluvia y drenaje ácidos.
- Alto consumo de agua, incluso en zonas en las que escasea, además de su contaminación.
- Lixiviados con iones metálicos y otros agentes altamente tóxicos.

La magnitud de los desechos que se pueden generar depende de la pureza inicial en la que se encuentra el elemento de interés, en algunos casos la relación del mineral o

metal y los desechos puede ser 1:1, sin embargo las proporciones suelen ser mucho más dispares, generando así toneladas de residuos sólidos, grandes cantidades de compuestos químicos disueltos en agua y muy poco material de interés (Cortinas de Nava, 1998).

En México la mayoría de los casos de contaminación de suelos está dado por procesos de hidrometalurgia como la flotación, la cual consiste en moler y separar el mineral de la ganga al reaccionar con diferentes reactivos que tienen como función aumentar la hidrofobicidad. Los reactivos usados comúnmente son: ácido sulfúrico, cal, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, sulfato de cobre, cianuro de sodio, sulfuro de zinc, sulfuro de sodio, aminas, aceites y diferentes alcoholes, entre otros. Dichos compuestos son los que suelen encontrarse en los antes mencionados jales, colas o relaves mineros (cabe mencionar que la palabra “*jal*” proviene del náhuatl y significa arena, es usada para denominar materiales en la naturaleza sin valor asociado, como los vestigios minerales, reactivos y subproductos de su oxidación) (Gutiérrez y Moreno, 1995) y son una fuente importante de EPTs como As, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, entre otros (Romero et al., 2008).

Además de la contaminación de suelo y aire, los jales también pueden alterar aguas superficiales y subterráneas mediante lo que se denomina drenaje ácido, por la oxidación de los sulfuros metálicos reactivos a partir de condiciones climáticas con cierta cantidad de humedad, aunque según Romero et al. (2008), la tendencia a generar drenaje ácido depende del balance entre los minerales productores de ácido (sulfuros metálicos) y los minerales con capacidad de neutralización (carbonatos, hidróxidos y aluminosilicatos), de modo que si la capacidad de neutralizar es mayor a la generación potencial del ácido, entonces la acidez generada será consumida, y así el drenaje del depósito de jales, tendrá un pH cercano al neutro.

### **1.3. Metabolismo de metales**

De todos los elementos que se pueden observar en la tabla periódica, alrededor de 90 se encuentran naturalmente en la tierra y 67 son metales, de éstos últimos todos a excepción del Hg se localizan en estado sólido (Nordberg y Nordberg, 2009). Muchos de ellos se encuentran involucrados en procesos celulares, así como en el funcionamiento de algunas moléculas biológicas como las enzimas.

Por lo anterior, varios elementos son considerados como micronutrientes o elementos esenciales para el metabolismo celular. Algunos de éstos son Fe, Mn, Cu, Zn, Cu, Bo, Mo, Cl, entre otros, que junto con elementos “traza” o no esenciales, llamados así por encontrarse en muy bajas cantidades (Wild, 1992; Gupta et al., 2013), son necesarios para una adecuada actividad metabólica en el individuo. Sin embargo, cuando estos elementos se encuentran fuera de las concentraciones requeridas u óptimas para un organismo en específico, entonces pueden generarse efectos adversos, tales como toxicidad (Wild, 1992) o en general alteraciones metabólicas y fisiológicas (Madhava Rao et al., 2006).

Tomando en cuenta lo antes mencionado, Chaney (1980) clasifica a los metales en cuatro grupos según los riesgos a la salud humana que suponen al entrar a las cadenas tróficas, a partir de lo cual desarrolla el concepto de “barrera planta-suelo”, la cual en principio protege a la cadena trófica de los elementos de los 3 primeros grupos (McLaughlin et al., 1999):

Grupo 1. Comprende aquellos elementos que no son absorbidos en mayor medida por las plantas, como Ag, Cr, Sn, Ti, Y y Zr. Suponen poco o bajo riesgo a la salud, sin embargo, su presencia en los alimentos es un indicador de contaminación directa por suelo o polvo.

Grupo 2. Incluye los que son altamente absorbidos por las raíces vegetales en suelos coloidales como el As, Hg y Pb. Sin embargo, no son fácilmente trasladados a tejidos comestibles y por lo tanto suponen un mínimo riesgo a la salud humana.

Grupo 3. Formado por elementos fácilmente absorbidos por las plantas como B, Cu, Mn, Mo, Ni y Zn. A ciertas concentraciones pueden ser fitotóxicos, aunque para la salud humana suponen bajo riesgo.

Grupo 4. Elementos que representan un alto riesgo a la salud humana o animal incluso a concentraciones no fitotóxicas. A este grupo pertenecen Cd, Co, Mo y Se.

Algunos de los elementos antes mencionados pueden considerarse “metales pesados”, término comúnmente usado para describir elementos que tienen ciertas propiedades tóxicas, por lo que suelen ser difíciles de definir, debido a que no existe un consenso

internacional en cuanto a cuáles son las características que deben presentar para ser considerados como metales pesados (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009). Generalmente se considera que dichos elementos presentan densidades superiores a  $5 \text{ g/cm}^3$ , (Wild, 1992; Volke Sepúlveda et al., 2005) además de las características físicas y químicas propias de un metal, tales como brillo, ductilidad, conductividad eléctrica y calórica, maleabilidad estructura cristalina; tendencia a perder electrones y formar cationes estables, así como un número atómico mayor a 20 (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009; Gupta et al., 2013). Sin embargo, elementos como As y Se, también considerados como metales pesados, en realidad son metaloides, que química y físicamente se comportan como no metales, aunque en cuanto a la conductividad eléctrica se parecen a los metales (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009).

La falta de un consenso en cuanto a la definición de un metal pesado ha llevado a algunos autores a proponer que los denominados metales pesados deban ser clasificados de manera más adecuada como elementos potencialmente tóxicos tomando en cuenta a su vez sus propiedades en solución acuosa, de modo que puedan ser comparables con un medio biológico (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009), esto debido a que el efecto fisiológico o tóxico que un ion de alguno de los elementos antes mencionados puede tener sobre un organismo, primero debe entrar a la célula (Volke Sepúlveda et al., 2005).

Lo anterior conlleva a considerar que la capacidad de algunos cationes metálicos que se asemejan estructuralmente a aquellos que se encuentran involucrados en la fisiología propia de la célula, como el  $\text{Ca}^{2+}$  que puede ser reemplazado por otros metales en las proteínas, por ejemplo por  $\text{Cd}^{2+}$  en la calmodulina, lo que conlleva a una inhibición de la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de ésta en el rábano (Hossain et al., 2012); el  $\text{Zn}^{2+}$  por  $\text{Ni}^{2+}$ , o el  $\text{Be}^{2+}$  por  $\text{Mg}^{2+}$  en ciertas enzimas, perdiendo así su función (Volke Sepúlveda et al., 2005), otro ejemplo significativo es el caso del desplazamiento del  $\text{Mg}^{2+}$  en la ribulosa-1,5 difosfato-carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) por  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  con lo cual la enzima queda inhibida o pierde su actividad por completo (Hossain et al., 2012).

Aunque también hay que considerar otros factores, tales como la vía de exposición, la dosis, su biodisponibilidad y por supuesto la especie, que se define como la forma en la

que se encuentra un elemento en términos de composición isotópica, electrónica, estado de oxidación y/o complejo o estructura molecular (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009).

Se sabe que algunos de estos elementos se localizan en la naturaleza propia de los suelos, en los ácidos se ha encontrado manganeso o aluminio; níquel, cobalto y cromo en los derivados de rocas ígneas o simplemente por actividades urbanas e industriales como el caso de la minería, o el uso de aguas residuales contaminadas (Foy et al., 1978; Wild, 1992). En cuanto a la contaminación generada por actividades relacionadas con la población humana, es necesario destacar que muchos de estos elementos cuando llegan a calentarse durante su empleo, suelen disolverse o pulverizarse de modo que se convierten en elementos ambientalmente lábiles y por lo tanto tienden a acumularse en algún lugar como el suelo (Wild, 1992), de ahí que muchos cultivos hortícolas pueden presentar cierta cantidad de elementos tóxicos y sea necesario monitorearlos cuando posteriormente esos alimentos serán destinados para consumo animal.

Por otro lado, para que dichos metales ya sea esenciales o no esenciales ingresen a las plantas, es necesario que éstos se encuentren disponibles o en caso contrario las especies vegetales deben tener mecanismos que les permitan disponer de ellos, controlar su ingesta y su acumulación (Madhava Rao et al., 2006). Algunos de estos mecanismos incluyen unión de los metales a la pared celular, reducción del transporte a través de la membrana, flujo activo de metales y compartimentalización (Madhava Rao et al., 2006). En el caso de los llamados metales pesados o EPTs (Volke Sepúlveda et al., 2005) algunas especies vegetales pueden presentar cierta tolerancia a los mismos, la cual depende de la eficiencia en cuanto a asimilación, traslocación y posterior secuestro de los EPT (Gupta et al., 2013).

En general, los efectos a nivel celular y molecular que pueden ser observados por la toxicidad de metales pesados incluyen: inactivación y desnaturalización de enzimas y proteínas, bloqueo de grupos funcionales de moléculas metabólicamente importantes, desplazamiento o sustitución de iones metálicos esenciales, modificaciones conformacionales y disrupciones de la integridad membranal. Todo esto se refleja directamente en actividades metabólicas como inhibición de la fotosíntesis, respiración celular y disturbios homeostáticos, al estimular la formación de radicales libres y

especies reactivas de oxígeno, tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Hossain et al., 2012). Estos últimos son considerados como una de las mayores consecuencias que pueden tener los metales pesados en las células (Gupta et al., 2013), ya que se ha observado que un compuesto citotóxico denominado metilglioxal se incrementa como respuesta a ciertos tipos de estrés y a su vez induce la formación de las mismas, intensificando el efecto de dichas especies reactivas como la suspensión de la actividad antioxidante, lo que da como resultado una gran exposición a estrés oxidante, lo que conlleva a lipoperoxidación, deterioro biológico de macromoléculas, desmantelamiento de membranas, fuga de iones, rupturas de la cadena de ADN (daño genotóxico) y finalmente la muerte del organismo (Hossain et al., 2012). Lo anterior provoca que las especies vegetales presenten estrategias de protección para evitar o disminuir la mayor cantidad de daño posible, en este caso se tienen registrados dos tipos de mecanismos, los cuales consisten ya sea en evitar, excluir o neutralizar los compuestos tóxicos o en tolerarlos (Hossain et al., 2012; Gupta et al., 2013).

### 1.3.1. Algunos elementos potencialmente tóxicos (EPTs)

#### *Arsénico (As).*

Su nombre proviene del griego *arsenikon*, y tiene como significado *potente* y en muchas ocasiones ha sido sinónimo de veneno. Es un metaloide que se encuentra en múltiples formas y estados, de las cuales la gaseosa denominada arsina es la más tóxica, siguiendo arsenato inorgánico o pentavalente y la arsenita. Este elemento ocurre naturalmente en la corteza terrestre, mantos acuíferos, áreas geotérmicas activas y volcanes (McLaughlin et al., 1999; Pigott y Liebelt, 2002), donde suele encontrarse como arsénico inorgánico, pero puede ser convertido por microorganismos a su forma orgánica, conocida como arsenobetaína (Pigott y Liebelt, 2002), cuando está en compuestos minerales o rocas sedimentarias junto con Cu, Pb, Zn, Ag y Au, éste puede obtenerse tras su procesamiento, ya que es usado en diferentes industrias como la electrónica y la química principalmente, en esta última se utiliza como conservador, plaguicida o como veneno en general (Volke Sepúlveda et al., 2005) tal como se le ha usado históricamente (Pigott y Liebelt, 2002). Sin embargo, su empleo en plaguicidas es considerado como una de las mayores razones por las que se pueden encontrar altas concentraciones de éste en los suelos, principalmente sales inorgánicas como arsenito (As III) y arsenato (As V), además de formas orgánicas que pueden ser degradadas por

microorganismos, pero a menudo el proceso es lento y llega a estar disponible para las especies vegetales, entrando así a las cadenas tróficas (McLaughlin et al., 1999).

#### *Cadmio (Cd).*

Su nombre proviene de las palabras latinas y griegas *cadmia* y *kadmeia*, respectivamente que hacen referencia al carbonato de zinc o calamina, denominado así por su similitud química con el zinc (Nordberg y Nordberg, 2009). Éste es un elemento perteneciente al grupo de los metales de transición, que puede encontrarse naturalmente como impureza del zinc, plomo, carbón y en el petróleo crudo, así como en compuestos sulfurados (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009), en rocas ígneas y metamórficas pero en mayores concentraciones en depósitos sedimentarios, de modo que su incidencia natural en el suelo está determinado por la roca madre y el grado de intemperismo de la misma (McLaughlin et al., 1999).

En general, los compuestos de Cd son considerados altamente tóxicos (Volke Sepúlveda et al., 2005), a pesar de lo anterior es utilizado en diferentes industrias en materiales anticorrosivos, baterías, pigmentos, plásticos (PVC), así como componente electrónico y en reactores nucleares (Nordberg y Nordberg, 2009), de modo que la principal contaminación ambiental está dada por fuentes antropogénicas tales como, fertilizantes, residuos mineros y procesamiento de compuestos minerales, así como por la combustión de carbón y petróleo, acumulándose y adhiriéndose a la materia orgánica del suelo, aunado a cierta disolución del mismo en el agua para posteriormente contaminar cuerpos de agua subterráneos (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009),

Éste es un elemento que también se encuentra presente en las hojas de tabaco al ser absorbido del suelo y el agua de irrigación por lo que es incorporado al humo de tabaco, en este sentido otra fuente de exposición al cadmio proviene de ciertos alimentos como los mariscos y carne de órganos, o en las papas, trigo, arroz y otros granos, lo anterior se debe a que las plantas en general absorben el cadmio del agua con la que son regadas, así como de los fertilizantes fosfatados empleados, en estos casos es importante tomar en cuenta el pH del suelo, ya que su asimilación es inversamente proporcional al pH del suelo (Baird, 2001).

### *Cobre (Cu).*

Elemento químico llamado así por la isla de Cyprus o *cuprum* en latín, descubierto desde tiempos inmemorables, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, en general en minerales azufrados, arénidos, cloruros y carbonatos (Volke Sepúlveda et al., 2005). Considerado como elemento traza necesario para el funcionamiento de catalasas, peroxidasas, citocromo oxidasa, peróxido dismutasa y otras cuproenzimas (Hall y Shannon, 2007; Nordberg y Nordberg, 2009). A pesar de ser necesario para el metabolismo celular, altas concentraciones de éste tienen un efecto tóxico, de modo que en general se considera al ion  $\text{Cu}^{2+}$  como el más tóxico, aunque compuestos como  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{CuOH}^+$  y  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  también lo son (Volke Sepúlveda et al., 2005), se sabe que cuando este metal es almacenado suele unirse a metalotioneinas y a su vez es capaz de producir especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante cuando interviene en reacciones de óxido-reducción (Hall y Shannon, 2007).

Además de la distribución del cobre en la naturaleza éste también es liberado al ambiente a causa de la actividad minera y su uso en diversas industrias, por lo que puede encontrarse en suelos, sedimentos, agua e incluso aire, esto debido a la colocación de residuos mineros en suelo, dispersión de lodos residuales de plantas de tratamiento de agua y por el polvo derivado de su aprovechamiento (Bellido y de Luis, 2006). De manera industrial el cobre es utilizado para diversos utensilios de uso diario, tales como ollas y sartenes, monedas, plomería, así como en electricidad y en electrónica (Volke Sepúlveda et al., 2005).

### *Cromo (Cr).*

Otro elemento que forma parte de los metales de transición, toma su nombre de la palabra griega para color, *chroma*. Éste es un elemento poco común y se localiza naturalmente como un mineral denominado cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) (Nordberg y Nordberg, 2009), no suele encontrarse en su forma elemental (Volke Sepúlveda et al., 2005). Las fuentes naturales de contaminación por cromo se deben a erupciones volcánicas, incendios forestales, restos vegetales y aerosoles marinos, mientras que las fuentes antropogénicas se deben a su uso como insumo primario en diferentes industrias, para producir pigmentos, fabricación de acero, cromados y como catalizador, entre otros, así como por la quema de combustibles fósiles, incineración de basura, refinado de cromita, elaboración de cemento, desgaste de neumáticos y revestimiento de frenos, entre otros. La contaminación acuática está fuertemente relacionada con el curtido de pieles, torres

de refrigeración, aceros y fundiciones no ferrosas, producción de asbestos y espejos, por el tratamiento de pulpa y papel, fertilizantes, así como por las industrias textil y petroquímica (Pazos Capeáns, 2007).

Entre de las especies químicas del Cr, la forma hexavalente (Cr VI) es considerada como la más tóxica y móvil, la cual se puede encontrar de manera natural como crocoita ( $\text{PbCrO}_4$ ). Cabe resaltar que dicha forma hexavalente puede ser reducida a Cr III con ayuda de la materia orgánica que se encuentra en el suelo, la cual no es tóxica al ser insoluble al pH en el que funcionan los sistemas biológicos. El Cromo VI puede encontrarse como otras especies, tales como cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) y dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009).

Además de los efectos toxicológicos que se tiene registrados en relación con el cromo, también es necesario resaltar que es un elemento de importancia biológica, debido a que es componente de algunas moléculas, por lo que es considerado como un elemento traza esencial al intervenir en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Anton y Marini, 1997).

#### *Níquel (Ni).*

El origen del nombre de este elemento proviene de la palabra alemana *Kupfernickel* que significa “el cobre del viejo Nick” (en donde Nick se refiere en términos generales a Satanás dentro de la cultura alemana) (Sparrow, 2005; Nordberg y Nordberg, 2009), nombre con que se le conoció entre los mineros alemanes cuando buscaban rocas con cobre y en su lugar encontraban este elemento, que en esa época se consideraba sin valor y no constituía un elemento químico sino hasta el siglo XVIII cuando se estudiaron sus propiedades metálicas y pudo ser clasificado como un nuevo elemento químico (Sparrow, 2005). El níquel forma parte de los metales de transición de la tabla periódica y se encuentra en la corteza terrestre en mayor concentración que otros metales como el cobre. Sin embargo, en la naturaleza se localiza a gran profundidad, por lo que no está al alcance sin técnicas especiales de extracción minera, aunque se puede observar en forma mineral como nicolita o niquelina compuesto de arseniuro de níquel ( $\text{NiAs}$ ) (Sparrow, 2005).

Por lo anterior, la mayor parte de la contaminación por níquel está dada por fuentes antropogénicas debido a la quema de aceites residuales y combustibles, la refinación de dicho metal, la incineración de residuos municipales, producción de acero y aleaciones,

así como por la combustión de carbono, pero también puede ser expulsado a la atmósfera mediante erupciones volcánicas (Sarkar, 2002) o por la producción de tetra carbonilo de níquel formado a partir de monóxido de carbono y níquel para liberar níquel puro al ser quemado o para purificar otros metales (Sparrow, 2005). Además el níquel es utilizado ampliamente en la industria del acero y la producción de aleaciones, en monedas, galvanizado y en materiales de uso cotidiano (Nordberg y Nordberg, 2009). Es considerado como un metal esencial para el crecimiento bacteriano y para el metabolismo de ratas, gallinas, cerdos, cabras y ovejas, además se han identificado 6 metaloenzimas que contienen níquel, de las cuales la mayoría se conocen en bacterias a excepción de la ureasa que también se ubica en plantas, encargada de hidrolizar urea a amonio y carbamato (Sarkar, 2002).

#### *Mercurio (Hg).*

Este elemento químico toma su nombre del planeta Mercurio y su símbolo se deriva de la palabra griega latinizada *hydrargyrum* que significa plata líquida. Éste se puede encontrar en su forma elemental ( $Hg^0$ ) y en compuestos orgánicos e inorgánicos, constituye parte de los elementos de transición y tiene como particularidad ser el único metal líquido a temperatura ambiente. En la naturaleza la principal fuente de Hg es el cinabrio o sulfuro de mercurio ( $HgS$ ) y otras formas como el vapor de mercurio, sales de mercurio, entre otros, todos con propiedades toxicológicas diferentes (McLaughlin et al., 1999; Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009).

Históricamente el Hg se ha usado en la industria minera por la propiedad que tiene de disolver ciertos metales para formar soluciones denominadas amalgamas como en el caso de la plata (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009), también las formas inorgánicas como las sales divalentes y monovalentes se han empleado en medicamentos de uso tópico y diuréticos siendo así importantes fuentes de envenenamiento, hoy en día prohibidos.

Por otro lado, el mercurio orgánico es utilizado actualmente de manera extensa en la agricultura como fungicida y recubrimiento de semillas, en este caso se encuentra de tres maneras principales, como acetato de fenilmercurio, etilmercurio y metilmercurio. Cabe resaltar que este elemento es usado también para la producción de sosa cáustica, baterías, y dispositivos de medición como termómetros y barómetros (Baum, 2007), tratamientos dentales, baterías, lámparas, vacunas, entre otros, por lo que su incidencia en la atmósfera está fuertemente relacionada con esto, así como por la quema de

combustibles fósiles de modo que cuando éste es liberado a la atmósfera tiende a depositarse en el suelo y a adherirse a la materia orgánica del mismo donde es reducido a su forma elemental y alquilado, lo que le confiere mayor toxicidad (Volke Sepúlveda et al., 2005; Nordberg y Nordberg, 2009) o puede ser transformado como en el caso de microorganismos acuáticos que cambian el mercurio inorgánico a metilmercurio, el cual a su vez se acumula en animales marinos generando la mayor fuente de exposición no ocupacional (Baum, 2007)

#### *Plomo (Pb).*

El símbolo químico de éste elemento se deriva de la palabra latina *plúmbea*. Dentro de la tabla periódica, es considerado como un metal, presenta una coloración gris azulada, encontrado en la corteza terrestre formando compuestos tales como la galena (PbS), la anglesita (PbSO<sub>4</sub>) y la curocita (PbCO<sub>3</sub>) (Volke Sepúlveda et al., 2005) o en general en minerales fosfatados o feldespatos como apatitas (McLaughlin et al., 1999). Históricamente este elemento ha sido considerado como un recurso importante para las industrias debido a las características físicas que presenta, tales como maleabilidad, durabilidad, bajo punto de fusión, entre otros, incluso su uso se remonta a los egipcios y al Imperio Romano, donde era empleado en la plomería, así como en utensilios de cocina o en el vino. Sin embargo, a lo largo del siglo pasado se descubrió su acción nociva y su efecto tóxico en los seres humanos (Shannon, 1980).

La principal fuente contaminante de los suelos proviene del depósito atmosférico de Pb derivado de la combustión de gasolinas adicionadas con éste, así como de emisiones de las fundiciones de metales no férricos (McLaughlin et al., 1999), otra fuente de contaminación se origina en diferentes industrias, en las que es utilizado para la fabricación de pigmentos, soldaduras, vidrios, cerámica, esmaltes, baterías y producción secundaria de metales (Shannon, 1980; Volke Sepúlveda et al., 2005).

Algunos de los materiales anteriores poco a poco han eliminado el plomo como aditivo, pero hoy en día todavía se pueden encontrar algunos de estos productos en el mercado. Cabe resaltar que es un elemento fuertemente retenido por los suelos (Shannon, 1980; McLaughlin et al., 1999; Volke Sepúlveda et al., 2005) y que puede ser alquilado por microorganismos del suelo formando así compuestos volátiles altamente tóxicos como el tetra metilo de plomo. También es posible localizarlo en forma elemental o de óxidos e hidróxidos o constituyendo complejos de oxianiones metálicos; el Pb tiene valencias +2 +4, de las cuales Pb(II) es la forma más común y reactiva

(Volke Sepúlveda et al., 2005). El depósito de Pb en cuerpos de agua también ha provocado su contaminación, por lo que la acidificación de éstos, debido a la lluvia ácida, aumenta su solubilidad en este medio, y por lo tanto sus efectos en el ambiente (Shannon, 1980).

#### *Selenio (Se).*

El nombre de este elemento se deriva de la palabra *Selene*, nombre griego para luna. Es considerado como un no metal y se encuentra naturalmente distribuido en la corteza terrestre como parte de rocas y suelos, en combinación con otros elementos como plomo, cobre, plata, níquel o azufre. Calificado como un elemento traza esencial, componente de algunas enzimas como la glutatión peroxidasa, tioredoxin reductasa, iodotirodina deiodinasa, selenoproteína P, entre otras (Nordberg y Nordberg, 2009). Es aceptado como un antioxidante al prevenir rupturas de cromosomas, defectos de nacimiento y cáncer, además es necesario para el buen funcionamiento de la vitamina E, por lo que una deficiencia de este elemento en los seres vivos puede tener graves repercusiones, de ahí que se pueda encontrar en carnes, mariscos y algunos cereales, sin embargo, en grandes concentraciones puede ser perjudicial.

Éste puede entrar en contacto con los seres vivos debido a su empleo en la industria, como componente electrónico, caucho, vidrio, pinturas, textiles, esmaltes, plásticos, medicamentos; es ingrediente de champús, pesticidas, fungicidas (Volke Sepúlveda et al., 2005), cerámicas, semiconductores, celdas fotoeléctricas, fertilizantes, producción de acero, entre otros, de modo que los compuestos usados para elaborar algunos de estos materiales son altamente tóxicos (Hall y Shannon, 2007). Debido a su amplia utilización, tal como sucede con otros elementos, la principal fuente de contaminación de suelos se debe a la liberación en la atmósfera de partículas generadas por la actividad humana o bien, por la erosión de rocas o mediante la combustión de carbón y aceite (Volke Sepúlveda et al., 2005).

Una de las razones por las que este elemento traza esencial es de importancia biológica, está relacionada con que la mayor parte de los compuestos inorgánicos de selenio son solubles en agua, además forma parte del aminoácido denominado selenocisteína que a su vez constituye a las selenoproteínas (Nordberg y Nordberg, 2009).

### *Titanio (Ti).*

Llamado así por los Titanes de la mitología griega, pertenece al primer grupo de metales de transición en la tabla periódica, el cual presenta propiedades similares al silicón y al zirconio (Nordberg y Nordberg, 2009). Es un elemento que se localiza en la corteza terrestre y constituye el cuarto elemento más abundante del planeta después del aluminio, hierro y magnesio. Generalmente se encuentra en forma mineral denominada ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ) y rutila ( $\text{TiO}_2$ ) (Lütjering y Williams, 2007), de hecho las partículas de color negro que se pueden observar en la arena son de este último.

Es usado ampliamente en la industria aeronáutica como componente estructural y en los motores, también ha sido utilizado para hacer pinturas más blancas (Woodford, 2002), o como pigmento en general y abrasivo en forma de dióxido de titanio (Espinosa, 2001). Otro de los empleos que se le ha dado a este metal es como implante médico, en la industria cosmética y farmacéutica, en este sentido no se tienen estudios adversos con respecto a su aplicación en estos campos. Sin embargo, en ciertas circunstancias se han llegado a observar reacciones inflamatorias y efectos sistémicos adversos, además se ha determinado que el tetraclorido de titanio es altamente irritante a las mucosas y a los ojos, además de que puede causar quemaduras, sin embargo no es considerado como carcinógeno a pesar de los efectos que el óxido de titanio tiene en roedores (Nordberg y Nordberg, 2009).

### *Vanadio (V).*

Este elemento pertenece al grupo de los metales de transición, y es llamado así por la diosa de la belleza *Vanadis* de la mitología Escandinava. Se puede encontrar como óxido de vanadio ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), en el petróleo crudo, como oxianión trivalente de vanadato el cual a su vez presenta similitudes estructurales con el fosfato, por lo que se ha identificado como inhibidor de ATPasas (Volke Sepúlveda et al., 2005). Su uso industrial es muy amplio, pero en general este es utilizado en forma de ácido vanádico, cloruro de vanadio, óxido de vanadio, pentóxido de vanadio y el metavanadato de amonio (estas últimas son las formas más tóxicas del vanadio). El pentóxido de vanadio es empleado para la oxidación del naftaleno, así como en la fabricación de ácido sulfúrico, ácido ftálico y maléico, en metalurgia y como revelador fotográfico. Por otro lado, el óxido de vanadio es ampliamente usado para la fabricación de colorantes, catalizadores, aleaciones con acero, cobre y con el hierro, lo que produce el ferrovandato.

Tal como sucede con la mayor parte de la contaminación por metales pesados, el vanadio es arrojado a la atmósfera como consecuencia de su uso en la industria, así como por la combustión de petróleo, en emisiones de centrales térmicas, de plantas de cementos e incineradores y por lo tanto es depositado en suelo y agua, contaminándolos. A pesar de esto, este elemento es considerado un micronutriente esencial y por lo tanto puede acumularse en organismos marinos y terrestres (Espinosa, 2001)

#### *Zinc (Zn).*

Elemento químico esencial para la vida, abundante en la corteza terrestre, generalmente en forma de compuesto mineral como la esfarelita [(ZnFe)S]. Empleado históricamente en aleaciones para la fabricación de latón y bronce, así como en baterías y anticorrosivo; específicamente el óxido de zinc es empleado en artículos de uso diario como plásticos, cosméticos, tintas, textiles, así como en la industria eléctrica y electrónica (Volke Sepúlveda et al., 2005).

A pesar de ser considerado como un micronutriente esencial, ya que forma parte de una gran variedad de metaloenzimas y a su vez está relacionado con el metabolismo del cobre, por lo que es aplicado en medicina para tratar las enfermedades asociadas a la acumulación del cobre (Hall y Shannon, 2007), el zinc también es capaz de provocar toxicidad en los seres vivos cuando se encuentra en exceso (Nordberg y Nordberg, 2009), lo cual está directamente relacionado con la contaminación ambiental derivada de las diversas industrias y a su vez con las características fisicoquímicas que presenta éste metal, el cual tiende a movilizarse o a formar compuestos insolubles en el suelo en función del pH al que se encuentre (Volke Sepúlveda et al., 2005).

A partir de lo anterior, es posible advertir que la contaminación atmosférica por elementos como los previamente mencionados, se debe en gran medida a la liberación de los mismos a partir de actividades antropogénicas, tales como la industria química, agrícola, petrolera, entre otras y no por su incidencia natural en la corteza terrestre, afectando así a los seres vivos en diferentes niveles biológicos.

### **1.4. Efectos genotóxicos**

La interacción de los metales y otros elementos o agentes químicos y las células puede tener consecuencias adversas en ellas, formándose así una cascada de efectos desde

un nivel bioquímico hasta poblaciones, comunidades y ecosistemas (Newman y Unger, 2002; Mussali-Galante et al., 2013a). Entre éstos se encuentran los genotóxicos, que se refieren al daño en el material genético (Van Leeuwen y Vermeire, 2007), los cuales pueden ser identificados a través de biomarcadores, ya sea cualitativos o cuantitativos tales como: intercambios de cromátidas hermanas, formación de aductos, recombinaciones mitóticas, aberraciones cromosómicas, rupturas de cadena sencilla o doble y micronúcleos, entre otros.

Tomando en cuenta lo anterior, es necesario destacar que uno de los aspectos más importantes para la sobrevivencia de un organismo es la integridad de su ADN, lo que generalmente se lleva a cabo mediante un complejo sistema de monitoreo y reparación en la célula que se encarga de reconocerlos y posteriormente llevar a cabo medidas para evitar que lleguen a tener efectos adversos, por ejemplo en la adecuación del organismo estimada en términos evolutivos, sin embargo algunas modificaciones estructurales al ADN pueden llevarse a cabo bajo condiciones celulares normales, así como posteriores a la exposición de algún agente químico o físico, de modo que es importante identificar la existencia de estos daños, su persistencia y si son biomacadores de exposición a alguna genotoxina o agente genotóxico (Fossi y Leonzio, 1993). En general son considerados como genotóxicos aquellos agentes físicos como temperatura, luz UV, radiaciones ionizantes, electromagnéticas, entre otras, o agentes químicos tales como los compuestos alquilantes, aminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros, que son capaces de alterar la información genética de una célula, ya sea de origen exógeno o tras su activación endógena (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2009).

Lo anterior conlleva a considerar los tres tipos más comunes de cambios estructurales que los agentes genotóxicos pueden llegar a causar:

#### 1.4.1. Formación de aductos

La gran mayoría de los agentes químicos considerados genotóxicos tienen este efecto después de haber sido metabolizados a una forma químicamente reactiva, la cual puede unirse covalentemente a macromoléculas como las proteínas o el ADN, constituyendo así productos adicionales o aductos (Fossi y Leonzio, 1993), lo que genera bases modificadas por mencionar algún ejemplo. Sin embargo, algunos aductos

tienen poca trascendencia biológica ya que fácilmente pueden ser eliminados por proteínas que se encargan de reparar el ADN, lo que en muchas ocasiones depende del lugar donde se forman o la especie química de la que se trate, por ejemplo en el caso de metilaciones de las bases nitrogenadas, el N7-metilguanina no es de carácter mutagénico, mientras que O6-metilguanina sí lo es e incluso es cancerígeno; o en el caso de algunos metales que dependiendo de su capacidad de solubilidad pueden entrar fácil o difícilmente a la célula y así provocar o no daño, un ejemplo de esto es el  $\text{Cr}^{3+}$  que es poco hidrosoluble y por lo tanto no puede entrar a la célula fácilmente, lo que conlleva a que sea de baja carcinogenicidad, a diferencia del  $\text{Cr}^{6+}$  que atraviesa fácilmente las membranas celulares para posteriormente ser reducido a  $\text{Cr}^{3+}$  en el interior, reaccionando directamente con los grupos fosfato del ADN (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2009) y todo lo que eso involucra.

#### 1.4.2. Ruptura de cadena

Las rupturas de la cadena de ADN no son poco comunes, de hecho tienen cierta incidencia de manera natural en la célula y consisten en la pérdida de una base nitrogenada, dejando un espacio o "gap" temporal en la molécula de ADN, pero suelen ser rápidamente reparadas. Sin embargo, este daño puede no repararse adecuadamente o haberse formado debido a agentes externos como la radiación ionizante o la luz UV, así como agentes genotóxicos que potencian la ocurrencia de dichas alteraciones (Fossi y Leonzio, 1993). Por lo anterior, la identificación de la causa de dichas rupturas en ocasiones puede dificultarse, lo que es posible distinguir mediante una buena selección de la población de referencia, de modo que un incremento significativo en la incidencia de rupturas sería un indicador de la genotoxicidad del agente de interés. Sin embargo, en algunas ocasiones ciertos agentes químicos pueden causar apoptosis, y no necesariamente genotoxicidad (Fossi y Leonzio, 1993).

#### 1.4.3. Mutaciones y alteraciones cromosómicas

Las mutaciones también suelen tener una tasa de incidencia espontánea en las células, incluso es uno de los mecanismos de cambio evolutivo. Sin embargo, en ocasiones algunos xenobióticos tienen la capacidad de producir dichos cambios mediante la incorporación de grupos químicos como cuando se forman aductos por grupos alquilo o mediante el enlace de compuestos electrofílicos a las bases nitrogenadas (Gutiérrez y Salsamendi, 2001). Estos cambios también se pueden llevar a cabo a nivel

cromosómico, ya sea en estructura o en número, distinguiéndose así rupturas, deleciones, inversiones, intercambios, huecos o gaps, entre otros, de las cuales algunas pueden llegar a ser letales para el organismo. Por otro lado, también hay agentes que producen cambios numéricos o que interfieren con la división celular al inhibir el huso acromático como la colchicina, entre otros (Gutiérrez y Salsamendi, 2001).

### **1.5. Ensayo Cometa**

Ostling y Johanson (1984) describieron por primera vez una metodología mediante la cual era posible identificar rupturas de ADN sin necesidad de utilizar células marcadas radioactivamente, para lo cual los autores sometieron células de linfoma provenientes de roedores a rayos gamma, seguido de esto las células fueron suspendidas en agarosa y colocadas en portaobjetos previamente tratados con una capa de agarosa para mejorar la adherencia y gelificados a 0 °C, posteriormente los portaobjetos fueron colocados en una solución de lisis a pH 9.5, (muy por debajo del límite para desenrollar el ADN), a continuación las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico ligero (5 V/cm) durante 5 minutos, a partir de lo anterior los autores observaron las figuras que conocemos hoy en día como cometas, identificando el centro de los núcleos y sus caudas. Cabe destacar que en este estudio se mencionan algunos factores que influyen en la formación de los cometas, por un lado, la concentración de agarosa puede obstruir la migración y dificultar la tinción, por otro lado, se observó que la fuerza del campo eléctrico utilizado es importante para la migración del ADN, mientras que el tiempo de electroforesis tiene un efecto menor.

Posteriormente, Singh et al. (1988) utilizaron la misma metodología pero tomando en cuenta los estudios previos realizados por Rydberg y Johanson (1978) al utilizar una solución de lisis alcalina mediante la cual en función del tiempo distinguieron un incremento en el tamaño de los núcleos o lo que se identifica como el desenrollamiento del ADN, a partir de esto se definieron los pasos que se usan actualmente, tales como obtención de núcleos y suspensión en agarosa de punto de fusión bajo disuelta en PBS, la cual después es colocada en portaobjetos previamente tratados con una capa de agarosa de punto de fusión normal, gelificadas en frío y lisadas con una solución formada por sales y detergentes como NaCl, EDTA, Tris y ajustada a pH 10. Seguido de esto, los portaobjetos son colocados en una cámara de electroforesis llena con amortiguador de electroforesis alcalino constituido por EDTA y NaOH a 0.25 cm por encima de las laminillas, las cuales al estar en contacto con un pH alcalino durante 20

minutos se promueve el desenrollamiento del ADN previo a la electroforesis, esto se lleva a cabo durante otros 20 minutos a 25 V y 300 mA. Finalmente la solución alcalina es neutralizada mediante una solución formada por Tris y ajustada a pH 7.5, seguido de esto las muestras pueden ser observadas en fresco o fijadas con etanol para ser analizadas posteriormente con bromuro de etidio a través de un microscopio de fluorescencia.

Mediante el uso de condiciones alcalinas es posible detectar rupturas de cadena doble y sencilla, a diferencia de condiciones ligeramente alcalinas mediante las cuales solo se pueden distinguir las de cadena doble, pero no sencilla, esta última es muy importante, ya que la gran parte de los agentes que inducen plegamientos tienden a formar mayor cantidad de rupturas de cadena simple que de cadena doble (Singh et al., 1988). Lo anterior da lugar a la metodología hoy en día conocida como electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa por la forma que adquieren los núcleos después de ser sometidos al campo eléctrico.

El fundamento de esta técnica usada para detectar daño genotóxico, se basa en la separación de fragmentos de ADN según su carga intrínseca del resto del núcleo aislado; dichos fragmentos son provocados por la ruptura de la cadena ya sea doble o sencilla, para lo cual hay que recordar que el ADN está formado por dos cadenas antiparalelas de nucleótidos que a su vez están constituidos por una pentosa, en este caso desoxirribosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Los nucleótidos unidos a través de un enlace fosfodiéster integran un esqueleto externo cargado negativamente, mientras que al centro las bases nitrogenadas se encuentran enlazadas por puentes de hidrógeno, en este caso las rupturas son expuestas al lisis de las membranas celulares, removiendo las histonas y así desbaratando los nucleosomas (Collins et al., 2008).

Posteriormente, el ADN libre de histonas es desenrollado en la fase de pre-electroforesis, para lo que se utiliza el amortiguador alcalino (pH  $\geq 13$ ) de electroforesis, el cual al encontrarse a un pH alcalino provoca que las bases nitrogenadas pierdan protones y se carguen negativamente repeliéndose entre sí (Lodish, 2005). Cabe destacar que en esta fase los geles de agarosa y el amortiguador a su vez se equilibran, minimizando así cualquier gradiente de conductividad que pudiera haber, para finalmente someterlo a la electroforesis. En éste último paso, la idea es formar un campo eléctrico a través de la solución alcalina (amortiguador de electroforesis)

mediante dos electrodos (uno positivo y otro negativo) conectados a una fuente de voltaje, mediante el cual las moléculas de ADN (embebidas en la agarosa) cargadas negativamente debido a los grupos fosfato de la cadena, se mueven hacia el electrodo positivo a la misma velocidad, irrespectivamente de la masa molecular (Clark y Pazdemik 2005) separando así el ADN fragmentado, de modo que la cantidad de fragmentos que migran está en función de la cantidad de daño (Ramírez y Mendoza, 2008), sin embargo, el factor que determina el que un segmento aparezca en la cauda o en la cabeza es la relajación del superenrollamiento (Collins et al., 2008).

Una vez terminado el tiempo de electroforesis, el pH alcalino es neutralizado (Ramírez y Mendoza, 2008) y las laminillas fijadas con alcohol al 70 %, esto último con el propósito de deshidratar, lo que genera una contracción nuclear, agudizando el detalle para una mejor observación al microscopio.

Con el tiempo el ensayo cometa ha sido aplicado en otros tipos celulares, como es el caso de las células vegetales, las cuales también en un principio fueron sometidas a condiciones neutras (Cotelle y Ferdinand, 1999). Posteriormente, Koppen y Vershaeve (1996) utilizaron condiciones alcalinas en raíces de haba (*Vicia faba*) previamente expuestas a agentes químicos. En el caso de las células vegetales existe un factor a tomar en cuenta, el cual corresponde a la pared celular, de ahí que en el estudio realizado por Koppen y Verschaeve (1996) emplearan las raíces primarias del germinado. En general, comenzaron a utilizarse especies vegetales a menudo usadas como modelo experimental en otras metodologías de ese entonces, tal es el caso de *Nicotiana tabacum* y *Allium cepa* (Cotelle y Ferdinand, 1999). Cabe resaltar que además de raíces recién germinadas, también se desarrollaron técnicas para aislar núcleos a partir de hojas (Cotelle y Ferdinand, 1999), esto mediante finos cortes realizados en el tejido de interés como los descritos por Gichner et al. (2009) dentro de PBS en cajas Petri y en frío para evitar y disminuir cualquier otro daño posible causado por la manipulación del material.

En plantas el empleo de esta técnica es de gran utilidad no sólo en estudios *in vitro*, sino *in situ*, esto debido a la gran cantidad de contaminantes ambientales a los que estos organismos están expuestos (Ventura et al., 2013). Al ser organismos sésiles, su exposición en ocasiones es en mayores cantidades que los seres humanos o cualquier otro animal, de manera que estos contaminantes pueden afectarles indirecta o

directamente a través de las interacciones con otros tipos de estrés ambiental tales como el hídrico, deficiencia de nutrientes, temperatura y plagas causadas por hongos o insectos (Sriussadaporn et al., 2003). Lo anterior conlleva a que las especies vegetales puedan ser utilizadas como monitores biológicos de los efectos que pueden tener algunos contaminantes ambientales en ellas y su respuesta a los mismos.

El ensayo cometa también ha sido usado en algas planctónicas como *Chlamydomonas*, celomocitos de anélidos, hemocitos y branquias de moluscos como *Mytilus edulis*, en eritrocitos, branquias y células de hígado, riñón e intestino de pez, así como en anfibios, todo lo anterior ha llegado a constituir una herramienta altamente sensible tanto para estudios de biomonitoreo como para pruebas toxicológicas en diferentes tipos de exposición, ya sea suelo, agua, aire o alimento (Cotelle y Ferdinand, 1999).

Por lo tanto, mediante el uso de dicha técnica es posible llevar a cabo un biomonitoreo, a través del cual se evalúe el estado de un ambiente contaminado, mediante el uso de aquellos organismos (incluyendo seres humanos) nativos del lugar en los que se puede medir una respuesta biológica, a través de varios niveles de organización, lo que provee mayor o menor sensibilidad entre sí a la exposición de agentes contaminantes o al estrés (Fossi y Leonzio, 1993), por lo que se usa el concepto de marcador biológico o biomarcador para referirse a todas aquellas respuestas biológicas a diversos compuestos o condiciones desde niveles moleculares y bioquímicos hasta poblaciones, comunidades e incluso ecosistemas (Mussali-Galante et al., 2013a) que suponen un riesgo a la salud del organismo.

#### 1.5.1. Parámetros del ensayo cometa

Otro aspecto de interés sobre el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina constituye la toma de parámetros, el más destacado por ser el más simple es el que se calcula a partir del porcentaje de núcleos dañados en relación a un total de núcleos observados, otros parámetros usados son: área celular, coeficiente de varianza del cometa, momento de la distribución del cometa, extensión del cometa, intensidad óptica del cometa, extensión de la cabeza, longitud y altura, momento de la cauda, coeficiente de varianza de la cauda, cauda de ADN, longitud de la cauda, extensión de la cauda, intensidad óptica de la cauda, entre otros (Kumaravel et al., 2009). La gran cantidad de parámetros antes mencionados son posibles debido a que en años recientes esta metodología se ha visto apoyada por sistemas de análisis de imagen mediante

programas de computadora, basados en intensidad fluorescente, a partir de lo cual ha aumentado el número y la complejidad de los parámetros que se pueden medir para analizar las muestras de interés, entre éstos se encuentra, el porcentaje de ADN en la cauda o de ADN que migró, con el cual en conjunto con la cantidad de ADN en la cauda se generó un índice de daño denominado “tail moment” o momento de la cauda, el cual se define como el producto del porcentaje de ADN en la cauda y la distancia entre las medias de la distribución de la cabeza y la cauda (Kumaravel et al., 2009).

Debido a dicha variedad de parámetros en ocasiones diversos autores utilizan un parámetro u otro, aunque en general uno de los más usados y aceptados es el momento de la cauda, sin embargo se han realizado estudios en los que este parámetro puede mostrar el mismo momento de la cauda para diferentes longitudes, números de fragmentos y cantidad de ADN que se observa (Cotelle y Ferdinand, 1999), por lo que puede ser difícil de interpretar, a diferencia del porcentaje de ADN en la cauda, ya que cuando se usan diversos tejidos o distintas especies la longitud de la cauda puede diferir entre sí y como este parámetro es usado para calcular el “tail moment”, la misma cantidad de daño puede tener diferentes valores de momento, por esta razón el porcentaje de ADN en la cauda es preferible, debido a que es insensible a este efecto, por lo que es altamente recomendable su uso (Collins et al., 2008). Lo anterior ha generado una gran variedad de estudios en los que se ha analizado este factor, o cual es el parámetro más informativo, de modo que a pesar de que se ha determinado que tanto en análisis *in vitro* como en análisis *in vivo*, el “tail moment” y el porcentaje de ADN en la cauda dan buenas correlaciones según curvas de dosis efecto causadas por agentes genotóxicos, algunos autores a través de análisis estadísticos han determinado que no existe mucha diferencia entre estos dos parámetros al analizar la extensión de daño al ADN, de modo que se recomienda que al usar parámetros derivados como el momento de la cauda también deban ser presentados parámetros primarios como la longitud de la cauda y el porcentaje de ADN en la cauda (Kumaravel et al., 2009).

## **1.6. Especie de estudio**

Las especies del género *Prosopis*, se distribuyen en África tropical, India y América, en donde se conocen alrededor de 42 especies que se localizan en las Antillas, Argentina, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, México, Perú, Venezuela, entre otros. En México, se encuentran varias especies como *P. palmeri*, *P. pubescens*, *P. glandulosa*, *P.*

*velutina*, *P. juliflora*, *P. laevigata*, etc., de las cuáles la última es considerada como el mezquite típico de la zona centro y sur del territorio mexicano (Altiplanicie, Depresión del Balsas y Planicie Costera Nororiental) (Gómez-Acevedo y Tapia-Pastrana, 2003), caracterizada por tener un amplio intervalo de distribución geográfica, desde regiones con clima semi-húmedo, altitudes de 2500 m, hasta matorrales xerófilos con menos de 300 mm de precipitación anual (Rzedowski, 1988).

*Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. Ex Willd) M.C. Johnst. (Fabaceae) se caracteriza por ser un árbol o arbusto que puede llegar a medir alrededor de 13 m de altura y diámetro de hasta 80 cm, con una corteza gruesa de color café negruzco, y copa más ancha que alta. Presenta espinas pareadas y hojas pecioladas con 1-3 pares de pinnas, cada una con 20 pares de folíolos sésiles, oblongos de 5-15 mm por 1-2 mm de ancho, ápice robusto, margen entero, base obtusa, glabros o ligeramente pubescentes. Flores sésiles o casi sésiles agregadas en espigas, blancas o amarillentas; fruto en vaina o legumbre linear de 7-20 cm de largo por 8-15 mm de ancho, comprimida, glabra, de color café amarillento o rojizo (Rodríguez Saucedo et al., 2014).

## II. ANTECEDENTES

*P. laevigata* tiene una gran importancia en regiones áridas y semiáridas del país, ya que en ocasiones llega a encontrarse como único elemento de la vegetación (Rzedowski, 1988), y por lo tanto suele ser empleada como alimento, medicamento, forraje, material para construcción, refugio, entre otros (Almanza y Moya, 1986), del mismo modo ha sido descrita su utilidad en regiones en las que ha habido algún grado de disturbio, al constituir un colonizador primario en dichas zonas puede influenciar la diversidad de la comunidad vegetal y el suelo, creando islas más ricas en recursos y condiciones, aumentando de esta manera la disponibilidad de nichos para el establecimiento de otras especies, lo que da como resultado un alto grado de colonización en ecosistemas semiáridos (García-Sánchez et al., 2012).

Lo anterior ha dado lugar a que *P. laevigata* pueda establecerse en regiones en las se encuentran jales mineros, caracterizados por contener grandes cantidades de elementos potencialmente tóxicos, lo cual ha sido investigado especialmente en estudios *in vitro* para evaluar las repuestas adaptativas de dicha planta al crecer con metales pesados como Cr (VI), Cd (II) (Buendía-González et al., 2010a), Pb, Ni (Buendía-González et al., 2010b) y As (Gupta et al., 2013) con lo que se ha evidenciado la capacidad de dicha especie para traslocar, bioacumular y biotransformar metales en las partes aéreas.

En el caso particular de los jales mineros de Huautla, Morelos, se ha identificado una variedad de metales como As, Cd, Cr, Ni, Pb, V, Ag, de los cuales As y Pb son los que registran mayores concentraciones totales, 139 mg/kg y 2298 mg/kg, respectivamente (Volke Sepúlveda et al., 2004), por esta razón los efectos genotóxicos de dicha contaminación han sido evaluados a través de una serie de estudios con las especies dominantes de la zona.

En cuanto a *P. laevigata* se ha estudiado la proporción de cambios anatómicos y morfológicos en los foliolos, reportando una reducción en las medidas y valores analizados comparados con sitios no contaminados. También se identificó bioacumulación y biomagnificación de metales como Cu y Pb en partes aéreas de 6 a 15 veces más de las reportadas en suelo (Hernández-Lorenzo, 2015). Asimismo, se ha registrado en general una disminución en la diversidad de la comunidad vegetal asociada a los jales (Martínez-Becerril, 2009).

Por otro lado, para las especies animales de la zona también se ha identificado una disminución de la diversidad y densidad poblacional como es el caso de la comunidad de artrópodos con énfasis en el orden Araneae de los jales, esto asociado a un gradiente de concentración de metales como Cu, Pb y As (González-Brito, 2015). En cuanto a mamíferos se ha evaluado el daño genético a través del ensayo cometa en los roedores *Baiomys musculus* y *Peromyscus melanophrys*, así como la concentración de metales como Zn, Ni, Fe y Mn en hueso e hígado (Tovar-Sánchez et al., 2012). Asimismo, Mussali-Galante et al. (2013b) detectó Al, Pb, Cu, As y Cd en los riñones de *Peromyscus melanophrys*, observando a su vez una menor densidad y diversidad genética en las poblaciones asociadas a los jales, así como un alto grado de diferenciación, entre otros efectos.

### III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran riqueza natural de México, algunos recursos no renovables como los obtenidos a partir de la actividad minera son ampliamente utilizados en diversos aspectos de la vida diaria, sin embargo los procesos para la obtención y purificación de algunos materiales, entre ellos metales, suele implicar efectos negativos o adversos en la biota circundante a los sitios de extracción, esto debido a la destrucción de la capa de suelo, así como a la producción de grandes cantidades de residuos tóxicos que suelen dejarse a cielo abierto provocando contaminación de suelo, agua y aire.

Algunos de estos residuos son los denominados jales mineros, formados de una variedad de elementos potencialmente tóxicos, tales como metales pesados, de los cuales es necesario identificar el efecto que éstos pueden tener, mediante el uso de monitores biológicos como *P. laevigata*, identificada como una especie tolerante a condiciones adversas, así como a metales y en el caso particular de los jales de Huautla, Morelos una de las especies dominantes, de modo que puede ser utilizada como bioensayo en pruebas como la electroforesis unicelular alcalina para identificar biomarcadores de efecto como el daño al ADN.

A su vez, el daño observado puede relacionarse con datos sobre bioacumulación de algunos metales presentes en los jales, tales como Cu, Pb y Zn medidos en suelo y hoja de *P. laevigata* de los jales de Huautla, Morelos (Hernández-Lorenzo, 2015) y con esto evaluar el daño genético asociado a las concentraciones de metales.

Lo anterior, conlleva a resaltar que aún no se tienen estudios previos sobre biomarcadores de efecto genotóxico en *P. laevigata* de los jales mineros de Huautla, Morelos, por lo que los resultados derivados del presente estudio pueden proveer un panorama general sobre su estado y a su vez relacionarlo con los trabajos realizados en el resto de la comunidad vegetal y la fauna del lugar.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar si existe daño genotóxico en individuos de *Prosopis laevigata* asociados a los jales de la Sierra de Huautla, Morelos provocado por metales pesados en comparación con los sitios testigo de Ajuchitlan y Quilamula, a través de la utilización de la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa.

### 4.2. Objetivos particulares

- Determinar si los metales pesados presentes en jales mineros tienen efecto genotóxico en *Prosopis laevigata* al ser comparados con sitios testigo
- Evaluar la relación entre las concentraciones de metales como Cu, Pb y Zn reportados en foliolos de *Prosopis laevigata* con el daño observado
- Contribuir a la validación del mezquite como modelo para el estudio de biomarcadores de efecto genotóxico

## V. HIPÓTESIS

Si el establecimiento de *Prosopis laevigata* sobre los jales mineros de Huautla, Morelos donde hay presencia de metales pesados provoca daño genotóxico, entonces éste podrá ser observado a partir de la electroforesis unicelular alcalina al ser comparados con sitios testigo.

## VI. MÉTODOS

### 6.1. Sitios de muestreo

Se seleccionaron dos sitios contaminados y dos testigos, los cuales se localizan en el municipio de Tlalquilténango en la región de la Sierra de Huautla en Morelos.

Los sitios contaminados corresponden a jales mineros localizados en el distrito minero del poblado de Huautla (actualmente inactivo), ambos dentro de la REBIOSH y separados por una distancia de 1.5 km entre sí y a 500 m del poblado de Huautla, el jal 1 es considerado como el más grande, midiendo alrededor de 180 x 80 m y el jal 2, 118 x 92 m, aproximadamente.

Los sitios testigo corresponden a Ajuchitlán y Quilamula, poblados que fueron establecidos debido a las similitudes geográficas, climáticas y de vegetación, así como por no haber reportes previos de contaminación por actividad minera o agrícola, la distancia entre ambos sitios es aproximadamente de 4 km (Fig. 1).

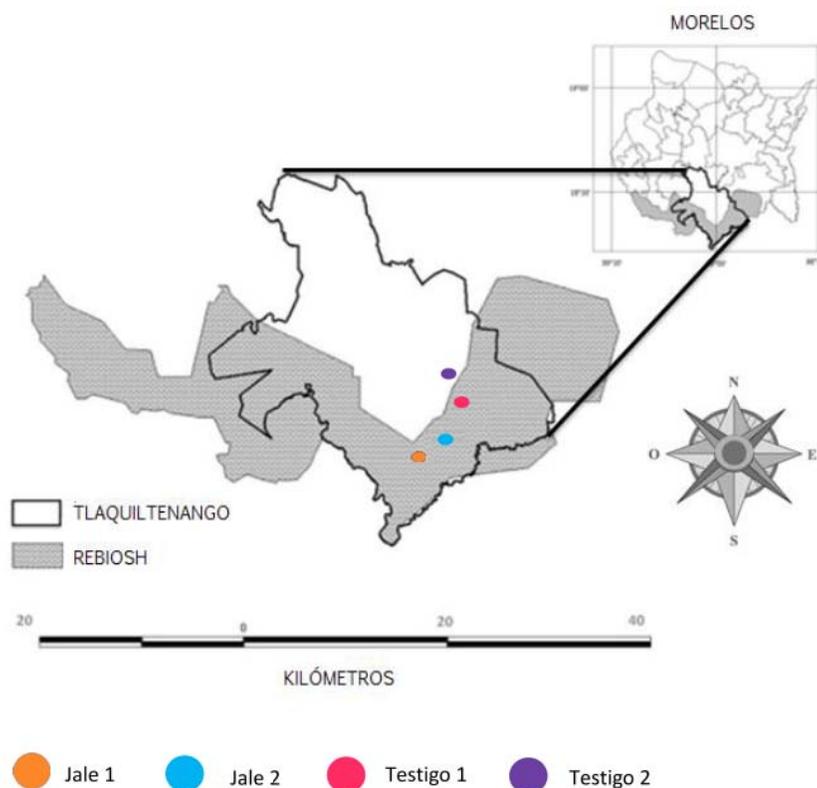


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de estudio. Fuente: Hernández-Lorenzo (2015).

## **6.2. Muestreo de *Prosopis laevigata***

La toma de muestras de *P. laevigata* se llevó a cabo durante la segunda mitad del año 2014 de junio a octubre, con un total de 6 muestreos. De los sitios testigo, se obtuvieron un total de 20 individuos muestreados, 10 de Ajuchitlán y 10 de Quilamula. Por otro lado, de los sitios de estudio ubicados en el distrito minero de Huautla, Morelos, correspondientes al jal 1 y jal 2 se analizaron un total de 14 individuos, 10 del Jal 1 y 4 del Jal 2.

El muestreo fue al azar, asegurando que la distancia entre individuos fuera de aproximadamente 20 metros entre sí para evitar tomar muestras de clones. Una vez seleccionado el individuo se procedió a cortar con tijeras de jardinero las ramas más exteriores a partir de las cuales se pudieran observar hojas de aspecto saludable, sin presencia de hongos o herbivoría en los folíolos. Una vez hecho el corte, las muestras se pusieron en hielo para ser transportadas al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y posteriormente al Laboratorio de Citogenética Vegetal del Centro de Ciencias de la Atmósfera (CCA) de la UNAM para su procesamiento.

## **6.3. Electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa**

Una vez en el laboratorio, se seleccionaron las pinnas con mejor aspecto en color, tamaño y forma de cada rama, a partir de las cuales se tomó una para remover con agua destilada los restos de tierra o basura que pudieran presentar y posteriormente fueron colocadas en toallas de papel absorbente para eliminar el exceso de agua.

Ya seleccionadas las muestras a utilizar, se realizaron cortes en los folíolos dentro de cajas de Petri de 5 cm inclinadas con 200  $\mu$ L de amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 (PBS); se mezclaron 150  $\mu$ L de solución de núcleos y 150  $\mu$ L de agarosa de punto de fusión bajo al 1 %, seguido de esto se colocaron alrededor de 60  $\mu$ L de la solución de núcleos y agarosa en laminillas previamente cubiertas con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 0.5 %, todo por triplicado. Las laminillas se gelificaron en una cámara con hielo, a continuación el cubreobjetos fue retirado y se colocaron las laminillas en una solución de lisis pH 10 (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10 % y Triton X-100 1 %) de 1 a 12 horas a 4 °C.

Trascurrido el tiempo de lisis, las laminillas fueron acomodadas en una cámara de electroforesis con amortiguador  $\text{pH} \geq 13$  (NaOH 10 N, EDTA 200 mM) durante 10 minutos para promover el desenrollamiento del ADN, posteriormente se llevó a cabo la electroforesis durante 15 minutos a 25 V/300 mA ó 0.8 V/cm. Por último, las laminillas fueron neutralizadas con una solución amortiguadora Tris pH 7.5 (Tris 0.4 M) con tres lavados de 5 minutos cada uno con agitación constante y fijadas con etanol al 70 % durante 20 minutos y secadas al aire. Cabe resaltar que todo el procedimiento se llevó a cabo en oscuridad y frío.

Finalmente, las laminillas fueron teñidas con 60  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio al 1 % y observadas en un microscopio de fluorescencia Axiostar plus (Carl Zeiss) con un filtro de excitación de 515-560 nm a un aumento de 400X, con lo cual se midieron parámetros de daño a partir del programa Comet Assay IV, analizando 50 núcleos por laminilla, con un total de 150 núcleos por muestra.

#### **6.4. Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos se analizaron dos parámetros por considerarse de los más informativos de ésta prueba, los cuales corresponden al momento y la longitud de la cauda con el fin de evaluar el efecto de la localidad (expuestos y testigos) sobre los niveles de daño genotóxico en dos poblaciones expuestas a metales pesados presentes en jales mineros y dos poblaciones no expuestas o testigos (análisis poblacional), también se realizó el mismo análisis por cada individuo muestreado de los sitios mencionados (análisis individual). Para ambos casos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples post hoc de Tukey.

Por último, se evaluó la relación existente entre la cantidad de daño observado con las concentraciones de los metales Cu, Pb y Zn determinados en los mismos individuos a partir de un estudio previo realizado por Hernández-Lorenzo (2015) (Tabla 1) en suelo y hoja de *P. laevigata* de los jales de Huautla, Morelos, esto mediante un análisis de regresión múltiple por modelos lineales generalizado, a partir del cual se obtuvo la proporción de la variación total (%) en la longitud y momento de la cauda asociada a las variables (Cu, Pb y Zn) mediante el cuadrado del coeficiente de correlación semiparcial (Salkind, 2010). Se utilizó el programa Statistica 8 (StatSoft, 2007) para realizar los análisis mencionados.

Tabla 1. Concentraciones de los metales Cu, Pb y Zn y bioacumulación determinados en muestras de suelo y tejido foliar de *Prosopis laevigata* de los jales de la Sierra de Huautla, Morelos (Hernández-Lorenzo 2015)

Metal	Suelo (g/kg)	Tejido foliar (g/kg)	Bioacumulación
Cu	0.203	3.079	15
Pb	0.535	3.456	6
Zn	2.454	2.307	0

La toma de muestras de suelo se llevó a cabo mediante los lineamientos de la NMX-AA-132-SCFI-2006 y NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 para la extracción de metales por digestión ácida. Para las concentraciones en tejido foliar, se tomó un total de 15 muestras al azar del follaje de individuos correspondientes a los jales y a los sitios testigo. Ambas determinaciones se llevaron a cabo mediante Espectrometría de Absorción Atómica en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

## VII. RESULTADOS

El daño promedio al ADN evidenciado mediante el ensayo cometa en las poblaciones expuestas a metales pesados de manera crónica y los sitios testigo se muestran en la tabla 2. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) de las cuatro poblaciones estudiadas evidenció un efecto significativo en la cantidad de daño genotóxico que presentan las poblaciones expuestas a metales en comparación con las no expuestas tanto para la longitud de la cauda ( $F_{3,4076}=4069$ ,  $p<0.001$ ) como para el momento de la cauda ( $F_{3,4076}=1718.57$ ,  $p<0.001$ ), siendo el jal 1 el que provocó una mayor cantidad de daño en ambos parámetros; la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p<0.05$ ) revela a su vez diferencias significativas entre ambos jales en comparación con los sitios testigo que no presentaron diferencias ente sí.

El ANOVA a nivel individual de las muestras de los cuatro sitios, revela un daño significativamente mayor en las poblaciones de los jales para ambos parámetros analizados, longitud de la cauda ( $F_{33,4046}=529.58$   $p<0.001$ ) y momento de la cauda ( $F_{33,4046}=195.662$ ,  $p<0.001$ ), lo que concuerda con el ANOVA poblacional. Con la prueba de Tukey ( $p<0.05$ ) se evidenciaron diferencias significativas entre los jales y los sitios testigos (Figs. 4 y 5) como en el análisis poblacional, además de distintos grados de daño en los individuos de ambos jales (Fig. 3), a diferencia de los individuos de los sitios testigo, que mostraron valores muy homogéneos para ambos parámetros (Fig. 2).

En cuanto al análisis de regresión múltiple por modelos lineales generalizados, empleado para identificar el nivel de significancia existente entre las concentraciones de los metales Cu, Pb y Zn bioacumulados en el tejido foliar de *P. laevigata* de los jales mineros de Huautla, Morelos (Hernández-Lorenzo, 2015) con la cantidad de daño observado, se encontró que el porcentaje de daño asociado al efecto de dichos metales en la planta se ve influenciado en mayor medida por el Cu ( $p<0.001$ ), tanto para la longitud de la cauda (11.4 %) como para el momento (13.9 %), a diferencia del Pb ( $p<0.001$ ) al que se le asocia una menor cantidad de daño al presentar valores de 2.3 % y 4.5 % para la longitud y el momento de la cauda, respectivamente; por otro lado, en contraste con el Cu y Pb, el Zn ( $p\leq 0.5$ ) no mostró una relación significativa entre la concentración y la cantidad de daño en los folíolos al presentar valores de 0.2 % para la longitud de la cauda y 0.1% para el momento de la cauda (Fig. 2).

Tabla 2. Parámetros de ensayo cometa para evaluar daño al ADN en *Prosopis laevigata* de poblaciones testigos y expuestas a metales pesados presentes en los jales mineros de Huautla, Morelos

	N	Longitud de la cauda (μm) $\bar{x} \pm e.e.$	Momento de la cauda $\bar{x} \pm e.e.$
Testigo 1	10	4.38±0.48 <sup>a</sup>	0.04±0.21 <sup>a</sup>
Testigo 2	10	3.98±0.48 <sup>a</sup>	0.2±0.21 <sup>a</sup>
Jal 1	10	64.70±0.48 <sup>b</sup>	17.33±0.21 <sup>b</sup>
Jal 2	4	56.97±0.76 <sup>c</sup>	14.73±0.33 <sup>c</sup>

Daño al ADN medido en 150 núcleos, observados al azar por cada individuo muestreado (50 núcleos por laminilla, por triplicado).

<sup>a, b, c</sup> Los sitios que no comparten una letra presentan diferencias significativas (Tukey, p<0.05)

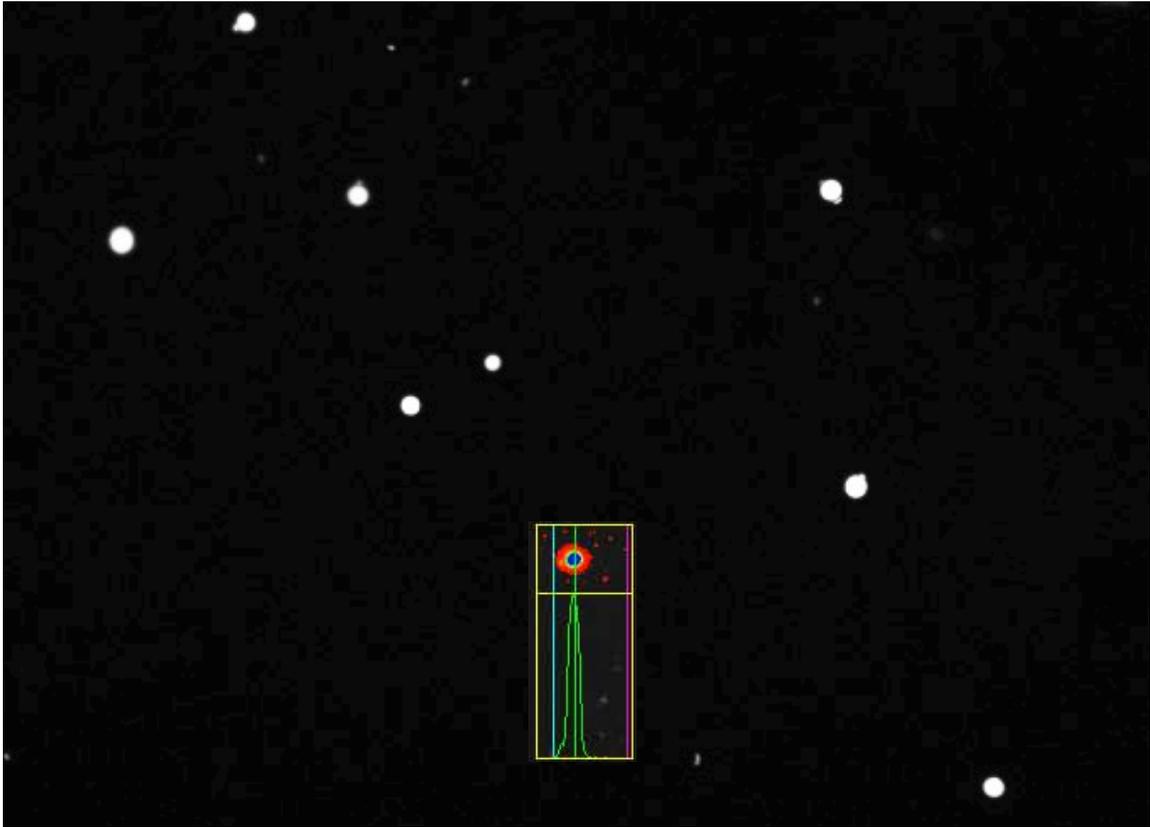


Figura 2. Núcleos correspondientes a individuos de *Prosopis laevigata* de los sitios testigo de Ajuchitlán y Quilamula, se observan sin daño genotóxico en aumento de 400X

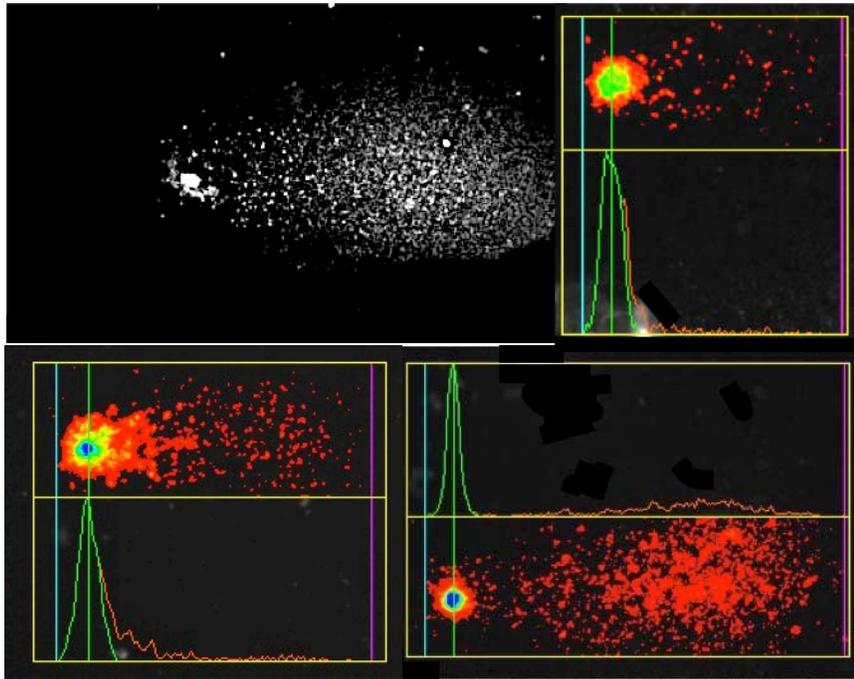


Figura 3. Diferentes grados de daño genotóxico observado en individuos de *Prosopis laevigata* procedentes de los jales de Huautla, Morelos

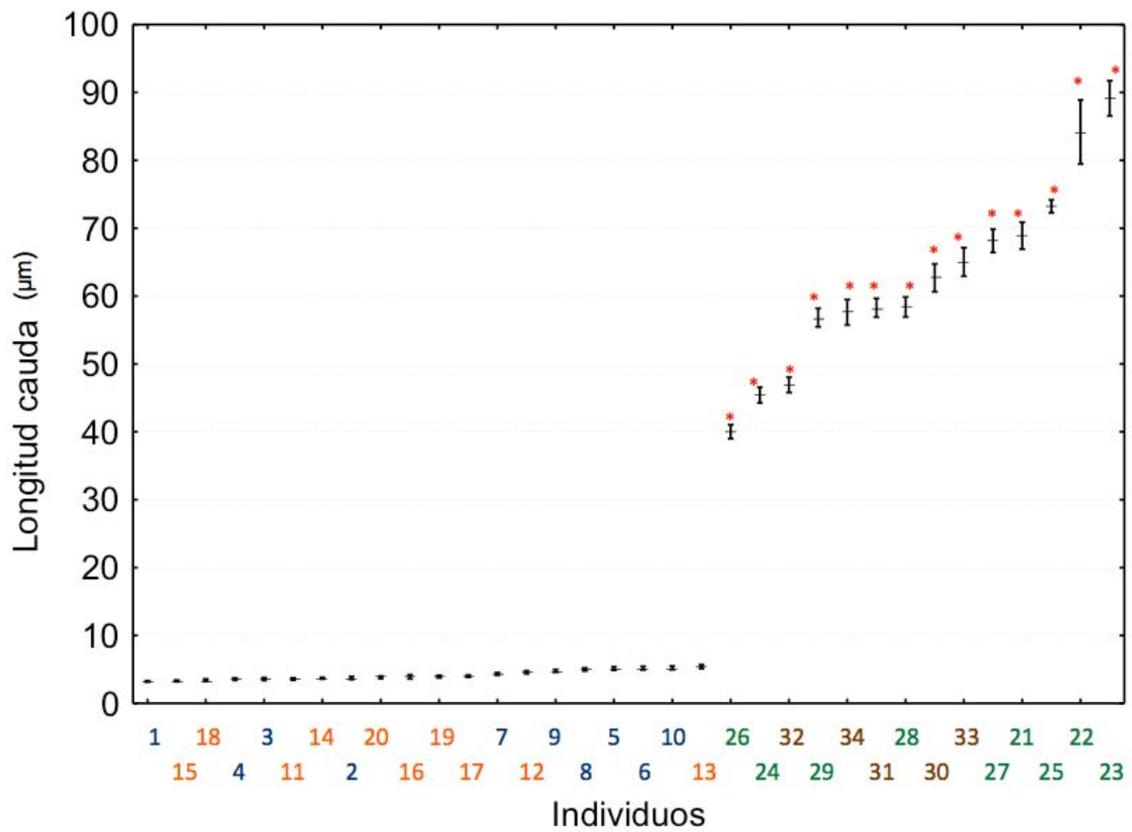


Figura 4. Longitud de la cauda ( $\bar{x} \pm D.E.$ ) de cada individuo de *Prosopis laevigata*, muestreado, se aprecian diferencias significativas y cantidad de daño genotóxico presentado entre individuos pertenecientes a los sitios de estudio. El patrón de colores de los individuos corresponde a las cuatro poblaciones estudiadas, donde el azul representa al testigo 1, el naranja al testigo 2, verde al Jal 1 y café al Jal 2.

\* Diferencias estadísticamente significativas con los testigos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

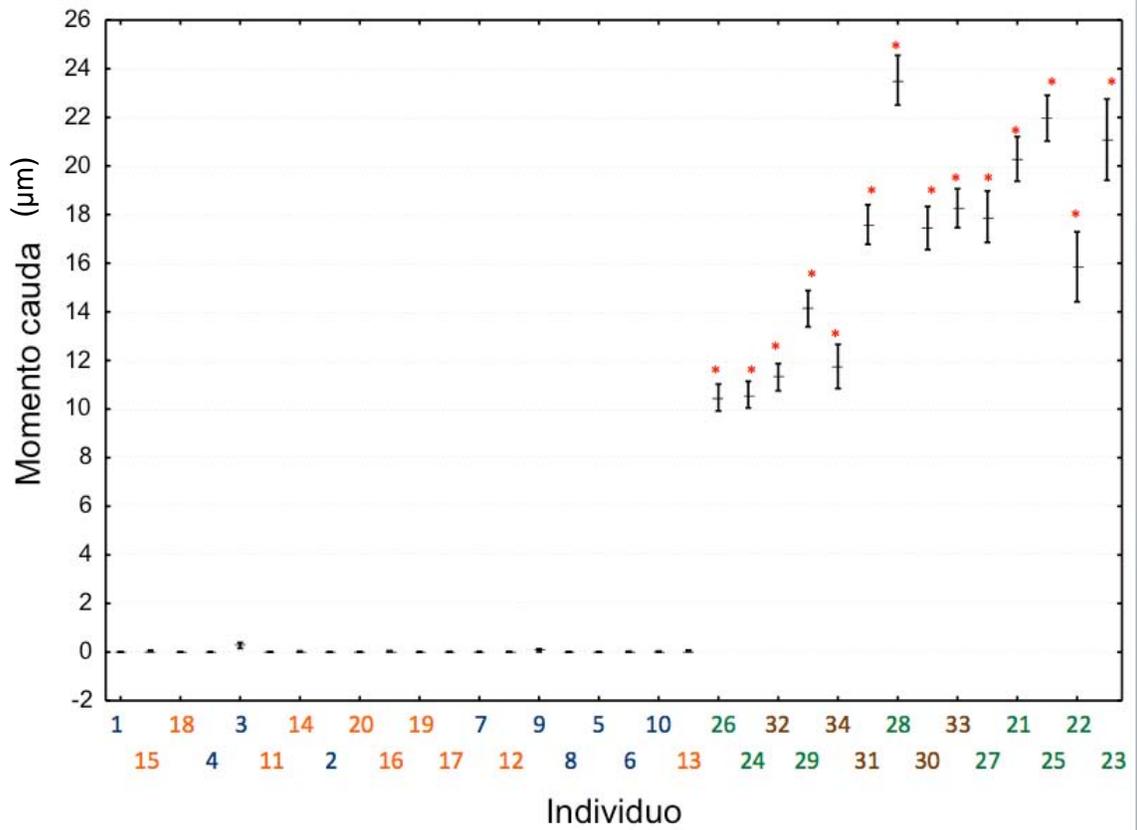


Figura 5. Momento de la cauda ( $\bar{x} \pm D.E.$ ) de cada individuo de *Prosopis laevigata* muestreado, se aprecian diferencias significativas en la cantidad de daño genotóxico presentado entre individuos pertenecientes a los sitios de estudio. El patrón de colores de los individuos corresponde a las cuatro poblaciones estudiadas, donde el azul representa al testigo 1, el naranja al testigo 2, verde al Jal 1 y café al Jal 2.

\* Diferencias estadísticamente significativas con los testigos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Tabla 2. Análisis de regresión múltiple por modelos lineales generalizados y porcentaje de daño genético asociado a las concentraciones de Cu, Pb y Zn bioacumulados en el tejido foliar de *Prosopis laevigata* de los jales de Huautla, Morelos

Variable	Tejido foliar (g/kg)	Longitud de la cauda					Momento de la cauda				
		<i>g.l.*</i>	<i>SC**</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Variación total (%)</i>	<i>g.l.*</i>	<i>SC**</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Variación total (%)</i>
Cu	3.079	1	2080.680	55.390	0.000008	11.4	1	207.745	82.967	0.000001	13.9
Pb	3.456	1	423.774	11.281	0.005687	2.3	1	67.672	27.026	0.000222	4.5
Zn	2.307	1	32.311	0.860	0.371971	0.2	1	0.937	0.374	0.552105	0.1

\* grados de libertad  
 \*\* suma de cuadrados

## VIII. DISCUSIÓN

A partir de los resultados anteriores, es posible afirmar que el daño genotóxico observado en *P. laevigata* está directamente relacionado con la alta concentración de metales que se encuentra en los jales, derivados de la actividad minera previa en la zona, ya que en los sitios testigo a pesar de también presentar cierta incidencia de metales de origen natural como componentes de minerales como arsenopirita, galena, acantita y calcacita (Mussali-Galante et al., 2013b), los individuos no exhibieron un daño semejante al observado en los sitios expuestos (Tabla 2), en este sentido el análisis individual tanto de la longitud como del momento de la cauda mostró que entre individuos de un mismo jal, hubo variaciones entre sí y a su vez el daño observado al comparar las poblaciones de ambos jales también evidenció niveles de daño genotóxico distinto (Figs. 2 y 3), a diferencia de los resultados homogéneos encontrados en los testigos, resultados que coinciden para ambos parámetros analizados. Con respecto a la relación causal entre las concentraciones de los metales Cu, Pb y Zn previamente determinados por Hernández-Lorenzo (2015) (Tabla 1) y el daño al ADN (Tabla 1, Figs. 1 y 2), se determinó que el Cu fue el que tuvo el mayor efecto de los tres y en menor medida el Pb, a diferencia del Zn que no tuvo un efecto significativo en el daño (Tabla 3).

En estudios previos en los jales evaluados, se determinó que existe una mezcla de metales, formada por As, Cd, Cr, Ni, Pb, V, Ag y Hg (Volke Sepúlveda et al., 2004), además se ha demostrado la presencia de Cu, Pb, Zn, Fe, Mn y Al (Tovar-Sánchez et al., 2012; Mussali-Galante et al., 2013; González-Brito, 2015) los cuales se encuentran distribuidos de manera heterogénea, lo que puede estar relacionado a su vez con las variaciones observadas en la cantidad de daño causado en individuos adultos de *P. laevigata* pertenecientes a un mismo jal (Figs. 3 y 4). Asimismo, de acuerdo con Agrawal y Agrawal (1999), es necesario tomar en cuenta la variabilidad genética dentro de la población, ya que ésta puede ser responsable de diferencias en la respuesta a la exposición a contaminantes ambientales, esto debido a la susceptibilidad a presentar cambios en la regulación de la expresión génica o la producción acelerada de metabolitos secundarios como uno de los efectos provocados por exposición a tóxicos, los cuales pueden ocasionar que la respuesta a estrés por contaminación, difiera en menor o mayor medida en individuos pertenecientes a una misma población, o en poblaciones distintas expuestas a un mismo contaminante. Lo cual podría estar

relacionado con las variaciones en el daño observado en los individuos pertenecientes a los jales de Huautla, Morelos.

En general, los resultados obtenidos, concuerdan con estudios en los que se ha analizado la genotoxicidad de algunos metales pesados en especies vegetales, por ejemplo Rodríguez et al. (2011) observaron que la exposición de *Pisum sativum* a Cr (VI) provoca daño al ADN dependiente de la concentración, evidenciado a través del ensayo cometa; Murali Archary y Panda (2010) evaluaron el daño al ADN mediante ensayo cometa e índice mitótico y la respuesta adaptativa inducida por Al en raíces de *Allium cepa*, a partir de lo cual los autores determinaron que a grandes concentraciones el Al produce genotoxicidad y muerte celular, mientras que a bajas, se genera una respuesta adaptativa. Por otro lado, Vajpayee et al. (2006) describieron el efecto genotóxico provocado por Cd en *Bacopa monnieri* tanto en raíces como en hojas, observando en el “olive tail moment” un incremento en el daño dependiendo del tiempo y la concentración usada, además se notó una mayor alteración en las células radiculares. Por su parte, İşeri et al. (2011) estudiaron los efectos tóxicos que tiene el Cu en altas concentraciones mediante daño oxidante y genotoxicidad, así como la respuesta antioxidante de germinados de *Lycopersicum esculentum* y *Cucumis sativus*, con lo que se identificaron niveles significativamente altos de peróxido de hidrógeno, catalasas, momento de la cauda y frecuencia de micronúcleos; Gichner et al. (2006) observaron los efectos del suelo de una región de la República Checa contaminado con metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) en comparación con un sitio no contaminado en cultivos de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum*, a través de lo cual identificaron una disminución significativa del área foliar y altura de las plantas, asociado a apoptosis y necrosis, así como un incremento en el daño medido por el momento de la cauda en núcleos foliares, comparado con los sitios testigo; en otra investigación realizada por Gichner et al. (2008) identificaron un aumento significativo en los niveles de daño genotóxico a través del momento de la cauda provocado por Pb en raíces y hojas de *Nicotiana tabacum*, así como una disminución en el crecimiento, hojas distorsionadas y raíces con pigmentación café.

Ahora bien, en cuanto a *P. laevigata* no se tienen reportes previos de su utilización *in situ* para determinar daño genotóxico, sin embargo existen diversos estudios en los que se ha determinado que esta planta es capaz de tolerar una gran variedad de metales pesados como en el estudio realizado por Buendía-González et al. (2010a) en el que se

identificó que al germinar semillas de *P. laevigata* en un medio enriquecido con Cd(II) y Cr (VI) un 38 % y 52 % es traslocado a la parte aérea, respectivamente, dicho patrón de bioacumulación y traslocación también fue observado para Ni y Pb (Buendía-González et al., 2010b). Por otro lado, Gupta et al. (2013) determinaron que las especies de *P. laevigata* pueden traslocar y biotransformar As (V) en As (III), de modo que con estos estudios los autores coinciden en que *P. laevigata* es capaz de tolerar altas concentraciones de metales pesados, biotransformarlos e incluso bioacumularlos, tal como se ha evidenciado en las poblaciones de *P. laevigata* de los jales de Huautla, Morelos expuestas a una variedad de metales, de los cuales particularmente se ha determinado traslocación y bioacumulación de Cu, Pb y Zn en el tejido foliar de 15 a 6 veces más que las cantidades de Cu y Pb encontradas en suelo, respectivamente; por su parte el Zn no mostró un aumento en la concentración foliar en relación al suelo (Tabla 1), además se ha analizado la proporción de cambios anatómicos y morfológicos, tales como longitud y ancho de la lámina foliar, del peciolo, pinna intermedia, biomasa e índice estomático, entre otros, a partir de los cuales se han detectado diferencias significativas en comparación con los individuos establecidos en sitios testigo, encontrándose en general que el 81 % de los caracteres presentaron una disminución en las medidas evaluadas (Hernández-Lorenzo, 2015).

Los datos revelados por Hernández-Lorenzo (2015) sobre la baja bioacumulación de Zn, pueden ser una posible explicación del porqué no se encontró una relación significativa con el daño observado mediante el ensayo cometa, siendo de 0.2 % para la longitud y 0.4 % para el momento de la cauda (Tabla 3). Dichos datos a su vez concuerdan con el porcentaje de daño asociado al Cu y Pb observado en los dos parámetros analizados del ensayo cometa y la cantidad bioacumulada de los mismos (Tabla 3). Ahora bien, cabe destacar que a simple vista la planta no muestra daño aparente por crecer en el jal, tal como lo reportan Puga et al. (2006) en poblaciones expuestas de *Prosopis juliflora*, *Acacia farnesiana*, *Juniperus deppeana*, *Baccharis glutinosa* y *Cynodon dactylon* de jales mineros en Chihuahua. Incluso en el caso de Huautla, *P. laevigata* es la especie arbórea dominante junto con *Acacia farnesiana* en el estrato arbustivo del sitio, respectivamente (Martínez-Becerril, 2009). Sin embargo, al evaluar las poblaciones expuestas a nivel anatómico, morfológico (Hernández-Lorenzo, 2015) y molecular, se demuestra el efecto que tienen los metales pesados sobre las poblaciones expuestas.

Los datos de genotoxicidad reportados en este estudio se relacionan con el realizado por Santoyo et al. (2015), quien evaluó las concentraciones de metales pesados (Pb, Cu y Cd) en suelo y tejido foliar de *Acacia farnesiana* de los jales de Huautla, Morelos, así como daño genotóxico provocado por los mismos, con lo que se determinó que la especie dominante en el estrato arbustivo de los jales, presenta un patrón de bioacumulación distinto al observado en *P. laevigata*, siendo de 3 veces más en el tejido foliar para Cu, 0.4 veces para el Pb y 0 para el Zn, además de cometas con longitudes de cauda con promedios de  $107.86 \pm 1.35 \mu\text{m}$  para el jal 1 y  $113.69 \pm 1.52$  para el jal 2, notándose un mayor efecto del jal 2 sobre el jal 1, lo que difiere del presente estudio, al mostrar valores por encima de los obtenidos en *P. laevigata* tanto para el jal 1 ( $64.70 \pm 0.48 \mu\text{m}$ ) como para el jal 2 ( $56.97 \pm 0.76 \mu\text{m}$ ) siendo el mismo parámetro estudiado por Santoyo (datos no publicados); a su vez Castañeda et al. (2015) determinó bioacumulación, genotoxicidad con ensayo cometa y efectos morfológicos en individuos de *Pithecellobium dulce* de los jales de Huautla, quien identificó un patrón similar al observado en *P. laevigata* y *Acacia farnesiana*, con lo anterior es posible afirmar que la comunidad vegetal de los jales de Huautla a pesar de los efectos genotóxicos y cambios a nivel anatómico y morfológico debido a su crecimiento en el jal, pueden proliferar en él debido a que la exposición crónica a metales pesados ha tenido un efecto subletal en dichas poblaciones y ha sido un factor que ha promovido cambios evolutivos rápidos, manifestándose como tolerancia a los metales. Los datos anteriores revelan que los patrones de bioacumulación de las especies presentes en los jales y el daño que esto les causa varía de especie a especie, pero en general la respuesta adaptativa al crecimiento sobre los jales se mantiene para las especies dominantes e incluso puede estar involucrada en la retención EPTs en los sitios contaminados, manteniendo a los jales en un equilibrio.

Es importante resaltar que los resultados del presente estudio son difícilmente comparables con otros trabajos, debido a que la utilización de ensayo cometa o en general las técnicas de daño genotóxico son escasas *in situ* y con mayor énfasis en especies vegetales completamente desarrolladas y con exposición crónica a contaminantes en combinación con otros tipos de estrés ambiental (Sriussadaporn et al., 2003), de modo que su uso como biomonitores ambientales no ha sido muy explotado a pesar de su potencial, esto debido a que las plantas en general son altamente sensibles, principalmente por ser organismos sésiles que suelen estar expuestos a mezclas de contaminantes a concentraciones incluso mayores a las que

pueden estar sometidos otros seres vivos (Sriussadaporn et al., 2003; Ventura et al., 2013).

Tomando en cuenta lo anterior, es necesario hacer notar que las especies vegetales constituyen el primer eslabón de la cadena alimenticia, de modo que si en este caso, hay acumulación y biomagnificación de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) en las partes aéreas, entonces la probabilidad de que las especies de los niveles tróficos siguientes se encuentren expuestos a su vez es muy alta, y por lo tanto presenten efectos adversos como los mencionados en este estudio, dicha respuesta ha sido observada en otras especies distribuidas en los jales de Huautla, tales como la comunidad de artrópodos (González-Brito, 2015), los cuales muestran una menor diversidad y riqueza de especies, así como los roedores dominantes como *Peromyscus melanophrys* y *Baiomis musculus* los cuales también han presentado daño genotóxico asociado a los metales (Tovar-Sánchez et al., 2012) y bioacumulación de los mismos, así como una menor diversidad genética (Mussali-Galante et al., 2013b), por lo que uno de los factores altamente relacionados con estos aspectos es la biomagnificación a través de las cadenas tróficas.

### **8.1. Interacción toxicológica de mezclas complejas**

El estudio de los efectos genotóxicos asociados a contaminantes atmosféricos como los metales pesados, suele dejar de lado la interacción existente o la combinación de los mismos, al ser objeto de estudio los contaminantes por separado o en cantidades no relacionadas con las observadas en un sitio contaminado particular, esto debido a las dificultades existentes para explicar los resultados de una exposición a una mezcla compleja, ya sea por las interacciones que puedan afectar la biodisponibilidad de cada componente, su activación metabólica, desintoxicación o la unión al ADN, así como su influencia en la reparación del daño pueden influir en la genotoxicidad de una mezcla (Hernández et al., 2014), por lo que al evaluar la toxicidad de mezclas una de las fuentes de incertidumbre es la interacción entre contaminantes, tales como metales, (Mumtaz et al., 2011).

En este caso, con el análisis de regresión múltiple por modelos lineales generalizados, se tuvo en cuenta la interacción entre los metales Cu, Pb y Zn determinados y su nivel de significancia en los parámetros analizados, observándose que el daño asociado a dichos metales y su interacción con la planta, explica en total menos del 20 % del daño

observado, lo cual está relacionado con el hecho de que la exposición a una mezcla compleja de contaminantes, resulta en una interacción toxicológica, la cual hace referencia a la diferencia en la respuesta derivada de la exposición a más de dos contaminantes, ya sea cualitativa o cuantitativa en comparación con la esperada por la acción de un solo contaminante. Dicha interacción puede ser sinérgica, en la que el efecto de dos contaminantes es mayor que la suma de su efecto individual, o puede ser antagónica, en la que la interferencia entre dos contaminantes reduce su impacto; de igual manera este tipo interacciones pueden observarse en relación a parámetros ambientales como en este caso el pH o la capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Connell et al., 2009).

En el caso de la mezcla de metales en los jales de Huautla, Morelos, es probable que exista una variedad de efectos, de modo que es factible afirmar que la interacción de los metales presentes, posiblemente tenga un efecto sinérgico, evidenciado por la gran cantidad de daño observado y la relación encontrada entre los metales Cu y Pb bioacumulados, mientras que las interacciones con el Zn probablemente tienen un efecto antagónico, al no haber mostrado una influencia significativa en el daño y poca bioacumulación en el tejido foliar. Asimismo, parámetros como pH y CIC de los jales de Huautla, sugieren una baja movilización de iones metálicos debido al pH alcalino y por lo tanto baja solubilidad y biodisponibilidad de los mismos, sin embargo, puede existir una mayor competencia entre éstos.

#### 8.1.1. Dinámica de Zn, Cu y Pb en el suelo, absorción y respuesta celular

Como se mencionó anteriormente, para determinar el modo en el que los metales pueden interactuar con el suelo y así estar biodisponibles o no para las especies vegetales, es necesario tomar en cuenta parámetros como pH, materia orgánica y el contenido de arcillas y óxidos e hidruros medidos por la CIC. En los jales de Huautla, el pH del suelo es de 8.2 (Volke Sepúlveda et al., 2004), lo que los hace ligeramente alcalinos, por lo que al relacionar esto con las concentraciones de Zn que fue el que tuvo un efecto en menor proporción, se encuentra una relación directa, ya que la biodisponibilidad de éste disminuye cuando el pH es alcalino por lo que su solubilidad se disminuye (Reichman, 2002), lo que explica parcialmente la razón por la que este metal no fue encontrado en mayor concentración en los tejidos de *P. laevigata* y por lo tanto no es causa de daño genotóxico significativo. Ahora bien en el caso del Cu no se tienen reportes de una influencia directa entre el pH y su biodisponibilidad, sin embargo

se sabe que puede afectar la manera en la que puede encontrarse, además la forma más usual es  $\text{Cu}^{2+}$  considerado como la más tóxica (Volke Sepúlveda et al., 2005).

En relación a la CIC, los valores de referencia van de  $3\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$  a  $>30\text{Cmol}^{(+)}/\text{Kg}$ , correspondiente a suelos arenosos bajos en materia orgánica y suelos ricos en arcillas y/o ricos en materia orgánica, respectivamente; en el caso de los jales de Huautla se tienen valores de 20 a  $50\text{Cmol}^{(+)}/\text{kg}$  (Volke Sepúlveda et al., 2004), correspondientes a suelos ricos en materia orgánica y arcillas, de modo que elementos como el Cu que tienen una gran afinidad por la materia orgánica del suelo, forman complejos orgánicos que a su vez compiten con el Zn en el establecimiento de los mismos (Reichman, 2002), lo cual podría estar relacionado con las concentraciones bioacumuladas de Cu y la razón por la que el Zn no fue bioacumulado como los otros metales. En el caso del Pb se sabe que es un metal persistente, por lo que una vez en la matriz del suelo, difícilmente se puede extraer, esto debido a que conforme aumenta el pH así como la CIC, el Pb es más adsorbido por el suelo, factores que como se mencionan anteriormente coinciden en los jales de Huautla, por lo que es posible relacionarlo con las concentraciones de Pb determinadas en *P. laevigata* y el porcentaje en el efecto observado.

Las plantas a su vez son capaces de influenciar la solubilidad y especiación de éstos metales al segregar queladores y modificando el pH (Reichman, 2002), además las células radiculares presentan una gran concentración de grupos carboxílicos debido al ácido péptico, lo que les confiere una carga negativa, provocando que la rizodermis interactúe con los cationes metálicos en el suelo, con lo que los metales pueden ser absorbidos por el sistema radicular para ser transportados por la vía apoplástica y en parte simplástica hasta el xilema (Navarro-Aviñó et al., 2007). El Pb es unido a los grupos carboxílicos de los ácidos urónicos que componen el mucílago o directamente a los polisacáridos de las células radiculares, desde donde es transportado por el apoplasto (Pourrout et al., 2013). Mientras que el Cu cuando se encuentra en altas concentraciones en el suelo, induce una síntesis selectiva de aminoácidos como histidina, asparagina y glicina, a los cuales se une para ser transportado a través del xilema (Liao, 2000).

Debido a la exposición y entrada de metales o EPTs a los sistemas vegetales, las plantas han desarrollado mecanismos de protección, tales como la exclusión, la cual

consiste en restringir el ingreso de los metales al citosol mediante precipitación extracelular, biosorción de la pared celular, reducción del ingreso o aumento del flujo; el otro mecanismo consiste en tolerar los EPTs al ser quelados intracelularmente a través de la síntesis de aminoácidos, ácidos orgánicos, glutatión o ligandos de unión a metales pesados tales como metalotioneinas, fitoquelatinas, compartimentalización en tejidos especializados ya sea tricomas u organelos celulares como vacuolas (Patra et al., 2004; Hossain et al., 2012), éstas últimas tienen un papel importante, al ser donde la mayor cantidad de metales son almacenados, lo cual es evidenciado por complejos de fitoquelatina-metal bombeados hacia el interior de las vacuolas (Gupta et al., 2013), También se regula la defensa antioxidante y desintoxicante a través del sistema glioxalasa para contrarrestar efectos deletéreos causados por las especies reactivas de oxígeno y el metilglioxal (Hossain et al., 2012).

En este caso, debido a las características observadas en las poblaciones de *P. laevigata* en los jales de Huautla, así como los metales detectados en este estudio y su interacción con el suelo y la planta, sugiere que los metales ingresan a la célula y tienen cierta interacción con diversas moléculas y organelos, entre los cuales se ha observado que el Pb es capaz de provocar reducción en la división celular, además induce aberraciones cromosómicas debido a que se une a los componentes de la pared celular o a las membranas, mineralizando así la pared, cambiando sus propiedades fisicoquímicas y desorganizando los microtúbulos, también produce rupturas de cadena doble y sencilla, y es capaz de reemplazar al Zn en enzimas de reparación y replicación con iones de zinc, provocando de esta manera el daño genotóxico observado, así como por estrés oxidante (Pourrout et al., 2013). Mientras que el Cu, una vez dentro de la planta puede inducir inhibición de crecimiento, daño oxidante y respuesta antioxidante (İşeri et al., 2011), algunos de estos resultados concuerdan con lo observado en el estudio de Hernández Lorenzo (2015).

## **8.2. Genotoxicidad**

El estrés oxidante es considerado como causante de la mayor parte del daño genotóxico observado en poblaciones expuestas a metales pesados (Ercal et al., 2001; Patra et al., 2004; Murali Achary y Panda, 2010; İşeri et al., 2011) como en el presente estudio, ya que se sabe que los radicales hidroxilo generados por dicho estrés reaccionan con los ácidos nucleicos al añadir un doble enlace a las bases nitrogenadas y por la sustracción de hidrogeniones de cada enlace C-H de la desoxirribosa, así como

del grupo metilo de la timina (Demidchik, 2014)

El estrés oxidante en general es un término usado para hacer referencia al estado fisiológico o a las condiciones en las que existe una pérdida de electrones (oxidación) que excede la ganancia de los mismos (reducción), dichas condiciones pueden ser apreciadas comúnmente en la cadena de transporte de electrones que justamente se caracteriza por estar constituida por reacciones de óxido reducción o redox tanto en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Hossain et al., 2012). Sin embargo, en este caso dichas reacciones conllevan a un daño en los componentes celulares debido a un desbalance provocado por una falta de electrones, en este aspecto cabe destacar que el estrés oxidante es otro factor junto con la salinidad y la sequía que provoca daño celular ocasionando una cascada de señalización y reacciones de protección como la síntesis de algunas enzimas como superóxido dismutasa, catalasas, ascorbato peroxidasa, entre otras (Tuteja et al., 2009).

En este caso, los metales Cu y Pb determinados por Hernández-Lorenzo (2015) con los que se relacionó el daño genético observado a través del ensayo cometa, pertenecen a dos grupos de metales, los activos en reacciones redox como Fe, Cu, Cr y Co (Hossain et al., 2012), los cuales pasan por un ciclado en reacciones de óxido-reducción; y los metales inactivos como el Pb, que actúan como catalizadores de reacciones oxidantes reduciendo los antioxidantes, de modo que ambos metales están involucrados en un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando daño oxidante y lesiones en lípidos, proteínas y ADN (Ercal et al., 2001).

### 8.2.1. Especies reactivas de oxígeno.

La formación de las especies reactivas de oxígeno o ERO tienen su origen en el oxígeno molecular ( $O_2$ ) presente en la atmósfera, el cual suele caracterizarse por poseer baja reactividad pero alta capacidad oxidante, esto debido a los dos electrones no apareados que provocan una restricción del spin disminuyendo dicha reactividad, de modo que para que esto cambie es necesario una fuente de energía externa como fuga de los electrones producidos en la cadena de transporte de electrones en cloroplastos y mitocondrias (Demidchik, 2014), además algunos metales como el Fe y el Cu que tienen electrones no apareados pueden fungir como catalizadores en la reducción del oxígeno (Briat y Lebrun, 1999) a partir de lo anterior se origina la formación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) el cual a su vez es generado en condiciones normales en la célula

pero se incrementa cuando existe cierto grado de estrés, produciéndose en concentraciones más altas que los antioxidantes, subsecuentemente dicha molécula al no ser favorable termodinámicamente entra en una serie de reacciones que generan otras moléculas que a su vez tienen la capacidad de reducir otros radicales y especies reactivas como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que subsecuentemente se descompone en radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), éste último puede oxidar moléculas y a su vez añadir o remover átomos de hidrógeno a las bases nitrogenadas o al esqueleto de ADN, respectivamente (Briat y Lebrun, 1999).

El ataque al esqueleto de ADN mencionado, así como reparaciones por escisión incompletas de bases dañadas por ERO (Roldán-Arjona y Ariza, 2009) y sitios alcalilabiles (lugares en los que el tratamiento alcalino del ensayo rebelan sitios absisicos o bases dañadas) (Joseph y Mannervik, 2006) provocan las típicas rupturas de cadena sencilla y doble identificadas mediante la migración de ADN durante la electroforesis unicelular alcalina (Cotelle y Ferdinand, 1999; Koppen et al., 1999; Kumaravel et al., 2009), además es posible identificar entrecruzamientos intramoleculares en el ADN (Rojas et al., 1999), esto principalmente cuando están ausentes otros tipos de lesiones en el ADN, reconocidos por una menor cantidad de migración en comparación con los testigos (Tuteja et al., 2009), de modo que en el presente estudio se observaron de manera indirecta dichas lesiones en la molécula de ADN en un grado significativo en comparación con los sitios testigo, a partir de esto podríamos inferir que por la gran migración de ADN observada los entrecruzamientos intramoléculars tuvieron una baja incidencia en comparación con las rupturas de cadena sencilla y doble (Fig. 2).

Los efectos antes descritos provocados por ERO derivados de la exposición a metales pesados han sido evidenciados por Pourrut et al. (2011), quienes expusieron raíces de *Vicia faba* a Pb en ausencia y presencia de antioxidantes como Vitamina E y el inhibidor de NADPH-oxidasa, dephenylene iodonium (DPI) para determinar si la genotoxicidad observada está relacionada directamente con la interacción entre Pb y el ADN o si es causada por estrés oxidante, lo que demostró que el carácter genotóxico de este metal no está asociado a la interacción directa entre éste y el ADN, tal como se infiere en el presente estudio, sino al estrés oxidante (Kaur et al. 2014; Santos et al., 2015), asimismo, estos resultados a su vez concuerdan con lo observado por İşeri et al. (2011) para el Cu, quienes observaron un aumento en los niveles de daño genotóxico asociado al estrés oxidante causado por exposición a Cu en *Lycopersicum esculentum* y

*Cucumis sativus*, lo cual fue a su vez evidenciado por el aumento de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa y catalasas. Por lo tanto, para ambos metales analizados en el presente estudio (Pb y Cu) se puede inferir que esto es lo que sucede con *P. laevigata* de los jales de Huautla.

Por último, el uso del ensayo cometa para detectar rupturas de ADN, es una herramienta que ayuda a identificar y entender los efectos adversos que la exposición a contaminantes ambientales pueden tener (Mussali-Galante et al., 2013a), tal como se ha demostrado en este caso en las poblaciones de *P. laevigata* de los jales de Huautla, expuestas de manera crónica a metales como el Cu y Pb, es posible hacer inferencias respecto a los mecanismos mediante los cuales esta especie es capaz de sobrevivir a una variedad de condiciones ambientales, consideradas como estresantes sin mostrar daños a simple vista, de modo que los resultados aquí mostrados pueden ser extrapolados a otras especies distribuidas en las mismas zonas, tal como ha sido evidenciado por la detección de daño genotóxico en los roedores de la zona (Tovar-Sánchez et al., 2012).

Si bien se han establecido cambios anatómicos y morfológicos en *P. laevigata* (Hernández-Lorenzo, 2015), así como daños en la cadena de ADN, también se puede afirmar que la población afectada mantiene un equilibrio ecológico e incluso forma islas ricas en recursos (García-Sánchez et al., 2012), de modo que esta integridad observada puede ser utilizada para equilibrar y estabilizar sitios contaminados como los jales y a su vez ser utilizada para fitoremediarlos, tal como mencionan Haque et al. (2009) que la propagación de semillas de especies tolerantes provenientes de plantas madre desarrolladas en sitios contaminados representan una mejor opción para estos proyectos.

Finalmente, la información derivada de este estudio, representa una de las primeras de su clase, al hacer uso de técnicas de genotoxicología como el ensayo cometa en una población natural asociada a jales mineros formados por una mezcla compleja de metales, utilizando a su vez muestras derivadas de individuos adultos con una historia de vida caracterizada por establecerse en una región contaminada con grandes concentraciones de metales generados por la actividad minera de la zona.

## IX. CONCLUSIONES

- ❖ Se demostró que la exposición crónica a metales pesados presentes en los jales mineros de Huautla, Morelos son causantes de genotoxicidad significativa en comparación con los sitios testigos de Ajuchitlán y Quilamula, evidenciado por los resultados obtenidos de la electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa
- ❖ El daño genotóxico observado en los individuos pertenecientes a cada jal, presenta diferentes grados de daño, lo cual es atribuible a la variación genética dentro de las poblaciones y su respuesta a la exposición a metales, a pesar de esto la magnitud del daño observado fue significativamente mayor al encontrado en los testigos.
- ❖ Metales como Cu y Pb encontrados en los jales, están asociados a una parte de los cambios en la integridad de la molécula de ADN observada entre sitios expuestos y testigos, sin embargo su efecto causal
- ❖ La complejidad de interacciones en la mezcla de metales presente en los jales, genera una variedad de efectos antagónicos y sinérgicos entre sí, siendo la suma de estos y su relación con parámetros del suelo como el pH y CIC en la biodisponibilidad y la competencia entre ellos, los que influyen en gran medida en el daño genético encontrado.
- ❖ La evaluación de los efectos de los contaminantes por separado, puede diferir de los efectos mostrados al examinar una mezcla, lo que constituye una fuente de incertidumbre para predecir y explicar la respuesta a una variedad de elementos como es el caso de los jales de Huautla, Morelos.
- ❖ La posibilidad de que el daño observado en *Prosopis laevigata* esté provocado por estrés oxidante concuerda con lo descrito en la literatura sobre el efecto indirecto de algunos metales pesados sobre la molécula de ADN a través de la formación de especies reactivas de oxígeno y su interacción, al ser capaces de provocar rupturas sencillas y dobles, así como sitios álcali lábiles en la cadena de ADN

- ❖ *Prosopis laevigata* demostró ser un buen biomonitor de los efectos genotóxicos que están asociados a poblaciones expuestas a metales pesados en sitios contaminados como los jales mineros de Huautla.
- ❖ La tolerancia a metales pesados que se ha descrito en las especies de mezquite puede ser utilizada en proyectos de fito-remediación de suelos contaminados como los derivados por actividad minera.
- ❖ La utilización del ensayo cometa en poblaciones naturales o *in situ* de especies vegetales expuestas a una mezcla de contaminantes como lo son los jales mineros suele ser poco común, y en el caso de *Prosopis laevigata* aún no se tienen reportes previos de su empleo para estudiar biomarcadores de efecto genotóxico asociado a metales, por lo que el presente estudio representa la primer investigación de su clase.

## X. REFERENCIAS

- Agrawal, M. y Agrawal, S. B. (1999) Effects of air pollution on plant diversity. En: *Environmental pollution and plant responses*. Estados Unidos: CRC Press, pp. 137–141.
- Almanza, S. G. y Moya, E. G. (1986). The uses of mesquite (*Prosopis* spp.) in the highlands of San Luis Potosí, Mexico. *Forest Ecology Management* 16, 49–56.
- Alvarado-García, A. M. (2009). La minería canadiense en México. Caso: Minera San Xavier en Cerro de San Pedro. En *Replanteando la industria extractiva: regulación, despojo y reclamos emergentes*. Toronto, Canadá: Universidad de York, p. 25
- Anton, R. I. y Marini, H. J. (1997). Determinación espectrométrica de cromo en orina con 2-(5-cloro-2-piridilazo)-5-dimetilaminofenol. *Información Tecnológica*, 8, 107-110
- Baird, C. (2001). *Química ambiental*. 1ª. Ed. Barcelona, España: Editorial Reverté.
- Baum, C. R. (2007). *Mercury: Heavy Metals and Inorganic Agents*. En Shannon, M. W., Borron, S. W. y Burns, M. J (editores), *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. Estados Unidos: Editorial Sanders, pp. 1111–1117.
- Barbosa-Ramírez, A. R. (1981). *La estructura económica de la Nueva España, 1519-1810* 7ª. Ed. México, D.F.: Editorial Siglo XXI, p. 259.
- Bellido, D. y de Luis, D. A. (2006). *Manual de nutrición y metabolismo*. España: Ediciones Díaz de Santos, p. 625.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Díaz, C. E. y Vernon-Carter, E. J. (2010a). *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101, 5862–5867.
- Buendía-González, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zuñiga, M. E., Barrera-Díaz, C. E., Vernon-Carter, E. J. y Cruz-Sosa, F. (2010b). *In vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. *Revista Mexicana de Ingeniería*, 9, 1–9.
- Briat, J.-F., y Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Series III - Sciences de La Vie*, 322, 43–54.
- Brown, T. L., LeMay, H. E., Jr., Bursten, B. E. y Burdge, J. R. (2004). *Química*. Pearson Educación, p. 1152.
- Canet, M., Cano, C. y Camprubí, A. (2012). *Yacimientos minerales: Los tesoros de la tierra*. México, D. F.: Fondo de Cultura Económica, p. 232.
- Castañeda, B. J., González, B. W., Mussali, G. P., Ortíz, H. L., Sánchez, S. E. y Tovar, S. E. (2015). Bioacumulación de metales en *Pithecellobium dulce* Beth. (Fabaceae): Efectos morfológicos y genéticos. En *Memorias del V Congreso Mexicano de Ecología. Fronteras de la ecología en un mundo globalizado*. SLP, México, pp. 311.
- Chaney, R. L. (1980). *Health risks associated with toxic metals in municipal sludge*. En Bitton, G., Damro, B. y Davidson, J. (Eds.), *Sludge.health risks of land application*. Ann Arbor Science Publishers, pp. 58-83.

- Clark, D. y Pazdemik, N. (2005). *Molecular biology*. Elsevier Academic Press. Southern Illinois University, EUA, p. 928.
- Coll-Hurtado, A., Sánchez-Salazar, M. T. y Morales, J. (2002). *La minería en México*. UNAM. p. 126
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., S, Smith, C. C. y Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143–151.
- Connell, D., Lam, P., Richardson, B. y Wu, R. (2009). *Introduction to ecotoxicology*. Wiley-Blackwell, p. 184.
- Cortinas de Nava, C. (1998). Manejo ambiental de los relaves o jales mineros. *Gaceta ecológica INE-SEMARNAP*, 49, 41-64.
- Cotelle, S. y Ferdinand, J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- Delgado de Cantú, G. M. (2003). *México, estructuras política, económica y social*. Pearson Educación p. 394.
- Demidchik, V. (2014). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212–228.
- Dorado, O., Maldonado, B., y Arias, D. M. (2005). Programa de conservación y manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla 1ª. Ed. México: INECC.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in Metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 529–539
- Espinosa, A. J. F. (2001). *Especiación química y física de metales en la materia particulada atmosférica: aplicación al estudio de la contaminación ambiental de la ciudad de Sevilla*. Universidad de Sevilla. p. 562
- Fossi, C. y Leonzio, C. (1993). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Estados Unidos: CRC Press, p. 368
- Foy, C., Chaney, R. y White, M. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Review of Plant Physiology*, 29, 511–66.
- García-Sánchez, R., Camargo-Ricalde, S. L., García-Moya, E., Luna-Cavazos, M., Romero-Manzanares, A. y Montaña, N. M. (2012). *Prosopis laevigata* and *Mimosa biuncifera* (Leguminosae), jointly influence plant diversity and soil fertility of a Mexican semiarid ecosystem. *Revista de Biología Tropical*, 60, 87–103.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J. y Demnerová, K. (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 420–6.
- Gichner, T., Znidar, I. y Száková, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 652, 186–190.

- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E. y Plewa, M. (2009). *The use of higher plants in the comet assay*. En A. Dhawan y D. Anderson (Eds.), *The Comet Assay in Toxicology*. Royal Society of Chemistry. p. 461
- Gómez-Acevedo, S. y Tapia-Pastrana, F. (2013) Estudio genecológico en *Prosopis laevigata*, *Acacia farnesiana* y *Acacia schaffneri* (leguminosae). *Darwiniana*, 2003, 47-54.
- González-Brito, W. A. (2015). Efecto de un gradiente de contaminación por jales mineros osbre las comunidades de artrópodos asociados a la vegetación y con énfasis en el orden Araneae en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Morelos.
- Gupta, D. K., Corpas, F. J. y Palma, J. M. (Eds.). (2013). *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer p. 462.
- Gutiérrez, R. M. y Moreno, T. M. (1995). Los residuos de la minería mexicana. En Garfias y Ayala, J. y Barojas Weber, L. (Eds.), *Residuos peligrosos en México* 1ª. Ed. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F., pp. 41-44.
- Gutiérrez, J. B. y Salsamendi, A. L. de C. (2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Ediciones Díaz de Santos. p. 349
- Haque, N., Peralta-Videa, J. R., Duarte-Gardea, M. y Gardea-Torresdey, J. L. (2009). Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial seeds. *Bioresource Technology*, 100, 6177–6182.
- Hall, A. H. y Shannon, M. W. (2007). *Other heavy metals*. En *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose* 4ª. Ed. Elsevier Inc. pp. 1157–1170
- Hernández, A., Gil, F. y Tsatsakis, A. (2014). *Biomarkers of chemical mixture toxicity*. En Gupta, R. (editor), *Biomarkers in toxicology*. San Diego, California: Academic Press, pp. 655
- 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 por etapas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, p.62.
- Hossain, M. A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J. A. y Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012, 1–37.
- İşeri, Ö. D., Körpe, D. A., Yurtcu, E., Sahin, F. I. y Haberal, M. (2011). Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicum esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Reports*, 30, 1713–21.
- Josephy, P. y Mannervik, B. (2006). *Molecular toxicology*. 2ª. Ed. Oxford University Press. Nueva York. 589 p
- Kaur, G., Singh, H. P., Batish, D. R. y Kohli, R. K. (2014). Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involved DNA damage and disruption of oxidative metabolism. *Ecotoxicology* 23, 1292–1304.

- Koppen G, Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research*, 360:193–200.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. y Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology Toxicology*, 25, 53–64.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. (2015). Diario Oficial de la Nación. México.
- Liao, M. (2000). *Mechanisms of copper uptake and transport in plants*. Tesis de Doctorado. Universidad de Massey. Nueva Zelanda, p. 209.
- Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. 5ª. Ed., 1ª. Reimp. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, p. 1054.
- Lütjering, G. y Williams, J. C. (2007). *Titanium*. Springer Science and Business Media, p. 442.
- Madhava Rao, K. V., Raghavendra, A. S. y Janardhan Redy, K. (Eds.). (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer. p. 345.
- Martínez-Becerril, C. (2009). Efecto de los metales pesados en jales mineros sobre la comunidad vegetal de la microcuenca Huautla y el daño genotóxico en su herbívoro dominante *Peromyscus levipes* (Rodentia: Muridae). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro, p. 96.
- McLaughlin, M., Parker, D. y Clarke, J. (1999). Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research*, 60, 143–163.
- Mumtaz, M., Hansen, H. Y Pohl, H. (2011). Mixtures and their risks assessment in toxicology. *Metal Ions in Life Sciences*, 8, 61-80.
- Muñoz, J. (1986). La minería en México. Bosquejo histórico. *Quinto Centenario*, 11, 145-156.
- Murali Archary, V. M. y Panda, B. B. (2010). Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis*, 25, 201–209.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., y Rojas del Castillo, E. (2013a). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: From molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 117–140.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Valencia-Cuevas, L y Rojas, E. (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.
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar-Alonso, I. y López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16, 10–25.
- Newman, M.C. y Unger, M. A. (2002). *Fundamentals of Ecotoxicology*, 2ª. Ed. Florida: Lewis Publishers. p. 480
- Nordberg, M. y Nordberg, G. (2009). Toxicology and biological monitoring of metals. En *General Applied and Systems Toxicology*, Wiley Online Library, p. 45.

- Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291-298
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B. y Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 199-223.
- Pazos Capeáns, P. (2007). *Biodisponibilidad de cromo en sedimentos marinos de la ría de Arousa*. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, p. 410.
- Pigott, D. C. y Liebelt, E. L. (2002). *Arsenic and arsine*. En *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose* 4ª. Ed. Elsevier Inc. pp. 1147–1156
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., y Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213, 113–136
- Puga, S., Sosa, M., de la Mora, A., Pinedo, C. y Jiménez, J. (2006). Concentraciones de As y Zn en vegetación nativa cercana a una presa de jales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22, 75–82.
- Ramírez, R. P. y Mendoza A.C. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. 1ª. Ed. México, D. F.: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Reichman, S. M. (2002). *The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc*. Australian Minerals and Energy Environmental Foundation. Australia, Melbourne.
- Repetto Jiménez, M. y Repetto Kuhn, G. (2009). *Toxicología fundamental* Vol. 6. Ediciones Díaz de Santos. p. 620
- Rodríguez, E., Azevedo, R., Fernandes, P. y Santos, C. (2011). Cr(VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 1040–7.
- Rodríguez Saucedo, E. N., Rojo Martínez, G. E., Ramírez Valverde, B., Martínez Ruiz, R., Cong Hermida, M. de la C., Medina Torres, S. M. y Piña Ruiz, H. H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. y Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10, 173-193.
- Rojas, E., Lopez, M. y Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722, 225–254.
- Roldán-Arjona, T. y Ariza, R. R. (2009). Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681, 169–179.
- Romero, F. M., Armienta, M. A., Gutiérrez, M. E. y Villaseñor, G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 24, 43–54.

- Rydberg, B. y Johanson, K. J. (1978). *Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells*. En P. Hanawalt, E. Friedberg y F. Fox (Eds.), *DNA repair mechanisms*. Londres, Inglaterra: Academic Press. pp. 465–468
- Rzedowski, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana*, 3, 7–19.
- Salkind, N. (2010). *Encyclopedia of research design vol. 1*. California, Estados Unidos: SAGE Publications, pp. 1336-1337
- Santos, C., Pourrut, B. y Ferreria de Oliveira, J. (2015). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in genetics*, 6, 1-18.
- Santoyo, M. M., Mussali, G. P., Tovar, S. E. y Ortiz, H. L. (2015). Bioacumulación y daño genotóxico de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. En *Memorias del V Congreso Mexicano de Ecología. Fronteras de la ecología en un mundo globalizado*. SLP, México, pp. 514.
- Sarkar, B. (2002). *Heavy metals in the environment*. CRC Press. p. 712
- Secretaría de Economía. (2011). Panorama Minero del estado de Morelos: Servicio Geológico Mexicano, México, p. 41.
- Shannon, M. W. (1980). *Lead*. En *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose 4ª*. Ed. Saunders. pp. 1129–1146
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). Technique for quantitation damage in individual of low levels of DNA cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Sparrow, G. (2005). *Nickel*. Tarrytown, Nueva York: Benchmark Books Marshall Cavendish, p. 32.
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K. y Simazaki, D. (2003). Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 541, 31–44.
- StatSoft. (2007). *Statistica*, versión 9 para Windows.
- Tovar-Sánchez, E., Cervantes, L. T, Martínez, C., Rojas, E., Valverde, M., Ortiz-Hernández, M. L. y Mussali-Galante, P. (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1677-1686.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B. B. y Tuteja, R. (2009). Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research*. 681, 134-149.
- Vajpayee, P., Dhawan, A. y Shanker, R. (2006). Evaluation of the alkaline comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 483–489.
- Van Leeuwen, C. J., y Vermeire, T. G. (2007). *Risk assessment of chemicals: an introduction 2ª*. Ed. Springer. p. 688

- Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A., Buttafava, A. y Balestrazzi, A. (2013). Single cell gel electrophoresis (comet) assay with plants : Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92, 1-9.
- Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J. A., De la Rosa Pérez, D. A., y Solórzano Ochoa, G. (2004). *Primer Informe de Proyecto: Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, p. 44.
- Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J. A., y de la Rosa Pérez, D. A. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación 1ª*. Ed. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología, p. 141.
- Wild, A. (1992). *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. México: Mundi-Prensa Libros. p. 1045
- Woodford, C. (2002). *Titanium*. Nueva York: Marshall Cavendish, p. 32.