



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Doctorado en Ciencias Ambientales

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE DOS  
POBLACIONES DE *Crotalus aquilus* (KLAUBER, 1952)  
EXPUESTAS A METALES DE INTERÉS TOXICOLÓGICO  
(MIT) EN LA COMARCA MINERA, HIDALGO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**D O C T O R**

**PRESENTA:**

Biol. Arnold Ibarra Bautista

**DIRECTOR:**

Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun





Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 24 de octubre de 2025

Número de control: ICBI-D/1868/2025  
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado al **Biol. Arnold Ibarra Bautista**, alumno del Doctorado en Ciencias Ambientales (Directo) con número de cuenta **230624**, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado **"Evaluación ecotoxicológica de dos poblaciones de *Crotalus aquilus* (klauber, 1952) expuestas a metales de interés toxicológico (MIT) en la Comarca Minera, Hidalgo"**, en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor.

PRESIDENTE	Dr. Griselda Pulido Flores	
SECRETARIO	Dra. Claudia Romo Gómez	
1er VOCAL	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún	
2do VOCAL	Dra. Maritza López Herrera	
3er VOCAL	Dra. Gabriela Marisol Vázquez Cuevas	
1er SUPLENTE	Dr. José Belisario Leyva Morales	<u>JOSE B. LEYVA M.</u>
2do SUPLENTE	Dr. César Camacho López	

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

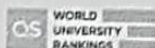
Atentamente  
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director de ICBI

CRG/APDV

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

## Participación en eventos académicos:



La Asociación Mesoamericana de  
Ecotoxicología y Química Ambiental  
otorga la presente



# Constancia

a:




Ibarra-Bautista A., Gaytán-Oyarzún J. C., Pulido-Flores G., Romo-Gómez C.,  
Vázquez-Cuevas G. M., López-Herrera M.



Por su participación en la modalidad Oral con el trabajo **Potencial de riesgo a la salud en serpientes expuestas a metales pesados en el IX Congreso Virtual AMEQA del 7 al 11 de noviembre de 2022.**



  
Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván  
Presidente de AMEQA



### El Comité Directivo del 6 Congreso Nacional y 2 Internacional de Ciencias Ambientales

**"Sostenibilidad y Regeneración"  
emite el presente certificado a:**

Arnold Ibarra Bautista

Por haber desarrollado la ponencia:

El cascabel de las serpientes (*Crotalus* sp) como  
un novedoso marcador de bioacumulación de  
metales de interés toxicológico

Bogotá D.C. 01, 02, 03 de Noviembre de 2023, Plataforma Teams

  
Germán Anzola Montero  
Rector

Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales  
U.D.C.A.



  
José A. Lozano  
Presidente

Red Colombiana de Formación Ambiental  
R.C.F.A.



FACULTAD MAYA DE ESTUDIOS  
AGROPECUARIOS

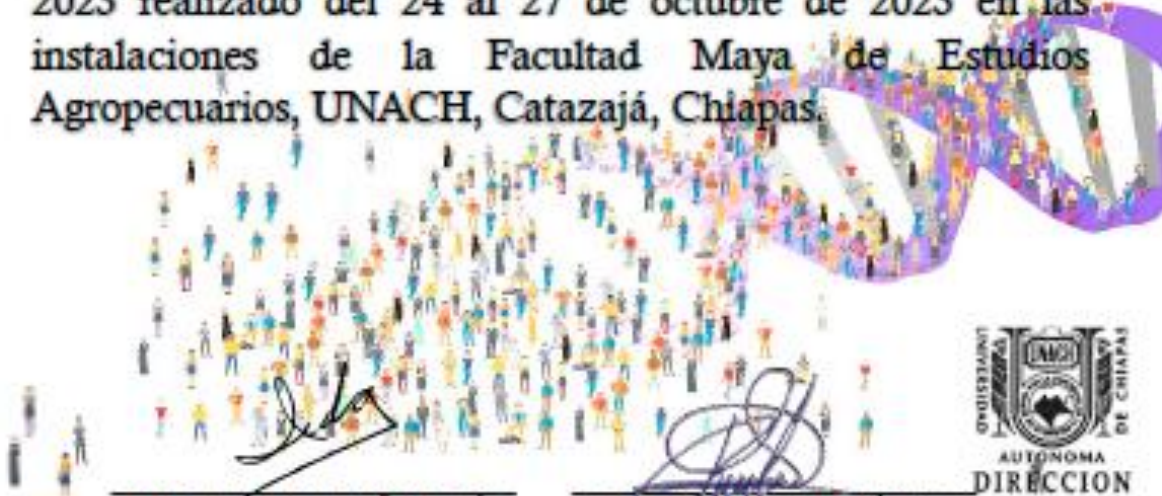


La Sociedad Mexicana de Genética A. C., la  
Universidad Autónoma de Chiapas y la Facultad Maya  
de Estudios Agropecuarios

### OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA A:

*Ibarra-Bautista A., Gaytán-Oyarzun J.C., Pulido-Flores G.,  
López-Herrera M., Fernández-Badillo L., Vázquez-Cuevas  
G.M. y Romo-Gómez C.*

Por su participación con la ponencia "**Micronúcleos  
como índice de genotoxicidad en serpientes  
expuestas a metales de interés toxicológico  
en la Comarca Minera, Hidalgo: Propuesta  
metodológica**" en el Congreso Nacional de Genética  
2023 realizado del 24 al 27 de octubre de 2023 en las  
instalaciones de la Facultad Maya de Estudios  
Agropecuarios, UNACH, Catazajá, Chiapas.



M EN C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA  
PRESIDENTE DE LA SMG AC 2022-2023

DR. RUBÉN MONROY HERNÁNDEZ  
DIRECTOR DE LA FMEA  
COMITÉ ORGANIZADOR CNG 2023



DIRECCION  
FACULTAD MAYA  
DE ESTUDIOS AGROPECUARIOS

# ESTIMACIÓN DE RIESGOS APLICADA A UNA POBLACIÓN DE SERPIENTES DE CASCABEL (*CROTALUS AQUILUS*) EXPUESTA A METALES DE INTERÉS TOXICOLÓGICO EN LA COMARCA MINERA, HIDALGO, MÉXICO

RISK ESTIMATION APPLIED TO A POPULATION OF RATTLESNAKES (*CROTALUS AQUILUS*) EXPOSED TO METALS OF TOXICOLOGICAL INTEREST IN THE MINING REGION, HIDALGO, MEXICO

Arnold Ibarra-Bautista<sup>1</sup>, Juan Carlos Gaytán-Oyarzún<sup>2\*</sup>, Leonardo Fernández-Badillo<sup>1</sup>, Griselda Pulido-Flores<sup>1</sup>, Maritza López-Herrera<sup>1</sup> & Gabriela Marisol Vázquez-Cuevas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Cariboneras, 42184 Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

\*Correspondencia: [jcgaytan@uaeh.edu.mx](mailto:jcgaytan@uaeh.edu.mx)

Received: 2023-08-25. Accepted: 2024-03-21. Published: 2024-05-22.

Editor: Itzcóatl Maldonado Reséndiz, México.

**Abstract.**— Snakes, in general, are organisms that are especially vulnerable to contamination by Metals of Toxicological Interest (MTI), since they have a series of their own characteristics that make them prone to bioaccumulation and biomagnification of contaminants. However, their inclusion in toxicological studies is still scarce. On the other hand, the soils of the Mining Region, Hidalgo, may present MTI contamination due to its long history of mineral extraction, a situation that may compromise the health of the area's ecosystems along with its biota. Given the previous knowledge of a population of *Crotalus aquilus* distributed within the Pachuca-Actopan mining region, the present evaluation characterized the area of interest and the presence of the species. The hazard was characterized by determining the presence of MTI associated with mining processes in the area (Cd, Pb and Hg). Subsequently, the magnitude of the ecological risk was determined using the environmental hazard quotient (CF), the ecological risk index (ER) and the cumulative ecological risk index (RI). Similarly, the risk of effective exposure of the *C. aquilus* population was estimated using the indirect dietary exposure index (IED), the chronic intake index (CDI) and the health risk index (HQ).

**Keywords.**— Ecotoxicology, heavy metals, snakes, Viperidae.

### **Agradecimientos:**

- Al Ser: Gracias por todas las circunstancias y los caminos por los que me has llevado, gracias por darme la oportunidad de vivir y experimentar este arduo trayecto. Porque en él pude conocer mucho más, reconocer mis errores y aprender de ellos, valorar mis capacidades y madurar mi pensamiento. Gracias por llevar siempre mi vida en tus manos.
- A mi amada compañera de vida, Dra. Sharon Alethia de Lucio Flores: Gracias mi amor por siempre estar a mi lado, incondicional, atenta, alentadora, sensata, realista, pero, sobre todo, amorosa. Gracias por acompañarme en cada uno de los muestreos, en las desveladas, en las ponencias, en cada hora que pasamos en el laboratorio, en los momentos donde compartimos el estrés, en cada caída y en cada celebración, gracias por no dejarme solo corazón, no lo hubiera logrado sin ti. Lo logramos Dra.
- A mi director, maestro, gran amigo y colega, Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzun: Gracias por creer en mi Doc., gracias por su paciencia, por su amistad, su gran apoyo y su invaluable guía. Gracias también por haber tomado este proyecto bajo su dirección aun cuando representaba grandes desafíos metodológicos y logísticos, pues al final, ningún desafío es demasiado grande cuando se hacen las cosas con pasión. Siempre atesorare esta gran amistad, sus consejos, sus llamados de atención y seguiré insistiendo en que acepte más trabajos que tengan que ver con esta área tan interesante y poco explorada.
- A los miembros del comité: Gracias por sus aportes, su paciencia y su crítica, sin ello, este proyecto, así como yo, no hubiéramos madurado, así mismo, gracias a su apoyo pudimos incursionar en un área novedosa y concluir un trabajo de investigación que espero sea el parteaguas de muchos proyectos más.
- A mi asesor externo, Dr. Leonardo Fernández Badillo: Gracias Leo por tu apoyo incondicional, gracias por enseñarme desde el principio de los tiempos (mi licenciatura) a como trabajar con estos increíbles organismos, cada aporte tuyo fue de mucho valor.
- Al implacable equipo de búsqueda, Pao, Felipe: Gracias por encontrar una serpiente cada uno durante todo el periodo de muestreo... Mis queridos amigos, jamás olvidare su ayuda y la dicha que fue salir a campo con ustedes. Fueron quienes hicieron de la experiencia de muestreo una de las mejores experiencias de mi vida. ¡Por la experiencia!

## **Dedicatorias:**

**A la memoria de mi madre: Ana María Bautista Islas:** Cada paso que he dado en mi camino, siempre ha sido acompañado por uno tuyo, así ha sido desde el principio de mi existencia y sé que así será hasta el momento de nuestro reencuentro. Por ello, este y cada triunfo en mi vida lo dedico a tu memoria, a tu esfuerzo, a todo cuanto diste por verme donde estoy. Gracias.

**A la memoria de mi padre: Arnold Ibarra Zenteno:** “Al recorrer su vida y observar los momentos más duros, el discípulo reprochó a su maestro con más rencor que nunca –¡Ahí! Ahí no veo ninguna huella detrás de la mía, ¡ahí! Ahí me abandonaste –El maestro miro al discípulo y le dijo –No... no ves ninguna huella más porque ahí, justo ahí... yo te llevaba en brazos” Ahora entiendo el poema y te agradezco tanto.

**A la memoria de mis abuelos: Sarah Islas Santos y Ricardo Bautista Cuevas:** Como siempre he dicho, yo no sería quien soy si no fuera por ustedes. Este trabajo es suyo, por formarme desde pequeño como biólogo y amante de la naturaleza.

**Para mi hermanita:** Piensa bien de donde vienes, lo que ha pasado y hasta donde has llegado con tu esfuerzo. Estoy orgulloso de ti y espero que este trabajo te inspire a seguir como vas. Nada es imposible, en tanto de verdad quieras hacerlo. Tengo la mejor de las hermanas.

**Para mis primos:** No me cabe duda de las grandes capacidades que tienen cada uno de ustedes y que el destino les tiene grandes desafíos que, sin duda, sabrán afrontar y vencer. Son, por demás, extraordinariamente talentosos y estoy orgulloso de cada uno. Espero que este trabajo los inspire a superarse cada día más y a construir un mejor futuro, no solo para ustedes, sino para el resto de la sociedad.

**Para mis tíos Obed, Ricardo y Sarahí:** Son los pilares de mi vida y cada uno aporta una luz irremplazable en ella. Este trabajo es un referente a cada uno de sus consejos y palabras de aliento que me han aportado, pues mi camino se vuelve más sencillo si están en él.

**A las futuras generaciones:** Este trabajo es el resultado del esfuerzo conjunto de investigadores, amigos, colegas y un servidor y representa las bases de un campo de investigación poco explorado en México y el mundo que es la ecotoxicología de serpientes. Así mismo, espero que sirva de guía y parte agua para futuras investigaciones, ya sean de la misma área o afines.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ACRONIMOS Y ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	12
<b>1. Problemática ambiental por la presencia de MIT en la Comarca Minera, Hgo.</b> .....	12
1.1 Descripción de metales pesados, metaloides y MIT.....	12
1.2 Principales MIT asociados a la minería.....	14
1.3 Presencia de MIT en la Comarca Minera, Hidalgo .....	15
<b>2. Caracterización toxicológica del cadmio, mercurio y plomo</b> .....	16
2.1 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del cadmio (Cd).....	16
2.2 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del mercurio (Hg).....	16
2.3 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del plomo (Pb).....	17
<b>3. Uso de bioindicadores en la evaluación del impacto ambiental por MIT</b> .....	19
3.1 Definición y tipos de bioindicadores .....	19
<b>4. Ecotoxicología de serpientes</b> .....	20
4.1 Panorama general de la ecotoxicología de serpientes.....	20
4.2 Métodos de estudio.....	24
<b>5. Inclusión del género <i>Crotalus</i> como herramienta toxicológica</b> .....	28
5.1 Diversidad e importancia del género <i>Crotalus</i> en México.....	28
5.2 Biomarcadores no letales propuestos para el género <i>Crotalus</i> .....	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVOS .....	31
<b>1. Objetivo general</b> .....	31
<b>2. Objetivos específicos</b> .....	31
<b>CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO AMBIENTAL Y EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO</b> .....	32
<b>1. Introducción</b> .....	32
<b>2. Material y métodos</b> .....	36
2.1 Caracterización de la zona de estudio.....	36

2.2 Recolecta de suelo.....	41
2.3 Determinación de los MIT en el suelo.....	42
2.4 Análisis fisicoquímico del suelo .....	43
2.5 Evaluación del riesgo ecológico.....	43
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>50</b>
4.1 Evaluación del riesgo ecológico.....	50
<b>5. Conclusiones del capítulo .....</b>	<b>54</b>
<b>CAPITULO II: EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD, LA EXPOSICIÓN Y EL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO DE <i>Crotalus aquilus</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>55</b>
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>56</b>
2.1 Obtención de datos ecológicos y morfológicos de <i>C. aquilus</i> .....	56
2.3 Evaluación de la vulnerabilidad y del riesgo de exposición .....	56
2.2 Evaluación del riesgo ecotoxicológico .....	59
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>63</b>
3.1 Obtención de datos ecológicos y morfológicos de <i>C. aquilus</i> . ....	63
3.2 Evaluación de la vulnerabilidad, el riesgo de exposición y el riesgo ecotoxicológico de <i>C. aquilus</i> .....	66
<b>4. Conclusiones del capítulo .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPITULO III: EVALUACIÓN DE LA BIOACUMULACIÓN DE MIT EN DIFERENTES BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN DE <i>Crotalus aquilus</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>74</b>
<b>2. Material y método .....</b>	<b>77</b>
2.1 Descripción del taxón de estudio.....	77
2.2 Trabajo de campo para la toma de muestras biológicas .....	79
2.3 Procesamiento de las muestras.....	84
2.4 Determinación de MIT en muestras biológicas.....	88
2.5 Análisis estadístico.....	89
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>91</b>
3.1 Trabajo de campo del periodo febrero - agosto de 2022 .....	91
3.2 Trabajo de campo del periodo febrero-agosto de 2023 .....	96
3.3 Determinación y evaluación de las concentraciones de MIT en las muestras biológicas.....	98
<b>4. Conclusiones del capítulo .....</b>	<b>110</b>
<b>CAPITULO IV: EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN <i>Crotalus aquilus</i> .....</b>	<b>112</b>

<b>1. Introducción .....</b>	<b>112</b>
<b>2. Material y método .....</b>	<b>115</b>
2.1 Recolecta de las muestras sanguíneas.....	115
2.3 Preparación de la muestra.....	116
2.4 Observación al microscopio.....	118
2.5 Análisis estadístico.....	118
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>119</b>
3.1 Obtención de muestras y observación al microscopio.....	119
3.3 Evaluación de la genotoxicidad.....	121
<b>4. Conclusiones del capítulo.....</b>	<b>124</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>130</b>
<b>1. Curvas de calibración para las muestras de bosque .....</b>	<b>130</b>
<b>2. Curvas de calibración para las muestras de matorral .....</b>	<b>133</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>136</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones geoculturales del estado de Hidalgo. Tomado de Gobierno del Estado de Hidalgo, (2024). .....	37
Figura 2. Regiones mineras del estado de Hidalgo. Tomado de Servicio Geológico Mexicano (2018). .....	38
Figura 3. Sierra de las navajas en el estado de Hidalgo, México. Tomado de Olvera-Olvera et al. (2021). .....	39
Figura 4. Sitio de muestreo de la zona de bosque, en el ejido El Guajolote, en la Sierra de las Navajas, Hidalgo (Google Earth, 2022). .....	40
Figura 5. Sitio de muestreo de la zona de matorral xerófilo, en el municipio de Xochihuacán, Hidalgo (Google Earth, 2022). .....	41
Figura 6 Clases texturales (USDA, 2022). .....	49
Figura 7 Ejemplares de <i>C. aquilus</i> A) hembra B) macho. Fotografías tomadas por Felipe Cerón Mejorada. ....	77
Figura 8 Escutelación de <i>Crotalus aquilus</i> . A) vista dorsal de la cabeza B) vista lateral de la cabeza C) vista ventral del cascabel D) vista lateral del cascabel. Elaborado por Pablo Jesús Salvador Morales. ....	78
Figura 9 Sujeción de serpiente venenosa mediante entubación (Villegas, 2005). .....	80
Figura 10 Sexado de serpiente por medio de sonda (Varela, 2002). .....	81
Figura 11 Segmentos de cascabeles numerados. Se señala el lugar en donde se separa para tomar la muestra. Modificado de Varela, (2002). .....	82
Figura 12 Extracción de veneno mediante ordeña manual. Fotografía tomada por Felipe Cerón Mejorada. ....	83
Figura 13 Muestras de cascabeles y restos de una serpiente. ....	84
Figura 14 Muestras en vasos para digestión. ....	86
Figura 15 Digestión de muestras en horno MARX. ....	87
Figura 16 Filtrado de muestras digeridas. ....	87
Figura 17 Muestras digeridas y filtradas listas para su lectura. ....	88
Figura 18 Analizador multielemental ICP Perkin Elmer, Mod. Optima 8300 USA. ....	89
Figura 19 Ejemplar No. PECA 001. ....	92
Figura 20 Ejemplar No. PECA 002. ....	92
Figura 21 Ejemplar No. PECA 003. ....	92
Figura 22 Ejemplar No. PECA 004. ....	92
Figura 23 Ejemplar No. PECA 007. ....	92

Figura 24 Ejemplar No. PECA 008.....	92
Figura 25 Ejemplar No. PECA 009.....	93
Figura 26 Superficie abarcada durante el muestreo en la zona de bosque. ....	93
Figura 27 Puntos de geoposición de cada ejemplar de <i>C. aquilus</i> encontrado. ....	94
Figura 28 Puntos de captura y recaptura de un ejemplar de <i>C. aquilus</i> . ....	95
Figura 29 Fotografías de identificación del ejemplar de recaptura, se señalan las marcas que caracterizaron al ejemplar (A) primer avistamiento (B) segundo avistamiento. ....	95
Figura 30 Ejemplar No. PECA 010.....	97
Figura 31 Ejemplar No. PECA 011.....	97
Figura 32 Ejemplar No. PECA 012.....	97
Figura 33 Ejemplar No. PECA 013.....	97
Figura 34 Ejemplar No. PECA 014.....	97
Figura 35 Ejemplar No. PECA 015.....	97
Figura 36 Superficie abarcada durante el muestreo de la zona de matorral. ....	98
Figura 37 Esquema para la obtención de sangre periférica de serpientes (Varela, 2002). ....	115
Figura 38 Muestra de sangre periférica de <i>C. aquilus</i> en frotis sobre portaobjetos. ....	116
Figura 39 Muestra de sangre periférica de <i>C. aquilus</i> en tinción con colorante Giemsa. ....	117
Figura 40 Preparaciones de sangre periférica de <i>C. aquilus</i> . ....	117
Figura 41 a) Inmovilización para la toma de muestra. b) Toma de muestra de sangre periférica mediante la vena caudal. ....	119
Figura 42 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar PECA 009 (zona de bosque), observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos. ....	120
Figura 43 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar PECA 013 (zona de matorral), observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos. ....	120
Figura 44 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar control, observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos. ....	121
Figura 45 Curva de calibración para Cd. ....	130
Figura 46 Curva de calibración para Hg.....	131
Figura 47 Curva de calibración para Pb. ....	132
Figura 48 Curva de calibración para Cd. ....	133
Figura 49 Curva de calibración para Cd. ....	134
Figura 50 Curva de calibración para Pb. ....	135

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Número de estudios toxicológicos con serpientes. Modificado de (Campbell y Campbell, 2002).....	23
Tabla 2 Biomarcadores utilizados en diferentes especies de serpientes.....	25
Tabla 3 Clasificación de pH del suelo. Modificado de (Pereira y Maycotte, 2011; Rivera et al., 2018).....	47
Tabla 4 Interpretación de porcentajes de materia orgánica (MO). Modificado de Molina y Meléndez, (2002).....	48
Tabla 5 Evaluación de los indicadores de riesgo ecológico. La concentración de referencia (CREF) y la concentración de exposición (CEXP) se reportan en mg/Kg. ....	50
Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas evaluadas en el suelo de las zonas de estudio. ....	52
Tabla 7 Parámetros ecológicos de <i>C. aquilus</i> estimados con base en la bibliografía disponible. .	63
Tabla 8 Pesos promedio de presas (g) y tasa de ingesta (TI) estimada para <i>C. aquilus</i> (g/día).....	64
Tabla 9 Evaluación de los indicadores de vulnerabilidad, exposición y riesgo ecotoxicológico de <i>C. aquilus</i> por exposición a metales de interés toxicológico (MIT) en dos zonas de la Comarca Minera, Hgo. ....	66
Tabla 10 Datos morfométricos y muestras obtenidas de <i>C. aquilus</i> (zona de bosque). ....	91
Tabla 11 Datos morfométricos y muestras obtenidas de <i>C. aquilus</i> (zona de matorral).....	96
Tabla 12 Concentraciones de MIT (mg/kg) en diferentes biomarcadores de <i>C. aquilus</i> (zona de bosque).....	99
Tabla 13 Factores de bioacumulación absoluto (BAFA) del Cd en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). ....	100
Tabla 14 Factores de bioacumulación (BAFA) de Hg en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). ....	102
Tabla 15 Factores de bioacumulación (BAFA) de Pb en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). ....	103
Tabla 16 Concentraciones de MIT (mg/kg) en diferentes biomarcadores de <i>C. aquilus</i> (zona de matorral).....	104
Tabla 17 Factores de bioacumulación (BAFA) de Cd en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). ....	105

Tabla 18 Factores de bioacumulación (BAFA) de Hg en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). .....	106
Tabla 19 Factores de bioacumulación (BAFA) de Pb en los diferentes tejidos de <i>C. aquilus</i> respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ). .....	107
Tabla 20 Frecuencia de micronúcleos (fMN) en <i>C. aquilus</i> , en ambas zonas de estudio (bosque y matorral) de la Comarca minera, Hidalgo y el control negativo. ....	122
Tabla 21 Curva de calibración para Cd con cinco puntos a partir de una concentración de 1.5 mg/L .....	130
Tabla 22 Curva de calibración para Hg con cinco puntos a partir de una concentración de 1.5 mg/L .....	131
Tabla 23 Curva de calibración para Pb con cinco puntos a partir de una concentración de 1.00 mg/L.....	132
Tabla 24 Curva de calibración para Cd con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L. ....	133
Tabla 25 Curva de calibración para Hg con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L. ....	134
Tabla 26 Curva de calibración para Pb con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L. ....	135

## ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

AQP	Agentes Químicos Peligrosos
As	Arsénico
ATSDR	Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades
Au	Oro
BAFA	Factor de Bioacumulación Absoluto
B	Boro
CAmb	Cinética Ambiental Basada en Factores Fisicoquímicos del Suelo
Cd	Cadmio
CEPIS/OPS	Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente / Organización Panamericana de la Salud
CDI	Ingesta Diaria Crónica
CL	Concentración Leída
Co	Cobalto
$C_{EXP}$	Concentración de Exposición
$C_{REF}$	Concentración de Referencia
ERI	Índice de riesgo ecológico acumulativo
PEC	Concentración predictiva de exposición
PNEC	Concentración predictiva sin efecto
CR	Concentración Real
CP	Cociente de Peligro Ambiental
Cr	Cromo
Cu	Cobre
EAA	Espectroscopía de Absorción Atómica
EID	Exposición Indirecta Mediante la Dieta
EM	Espectrometría de Masas
EP	Estatus de protección
fMN	Frecuencia de Micronúcleos
FI	Factor de incertidumbre
UFh	Factor de incertidumbre utilizado para la extrapolación de datos de animales a humanos
Hg	Mercurio
HI	Índice acumulativo de riesgo ecotoxicológico

HPLC	Cromatografía de Alta Resolución
HQ	Hazard Quotient (Cociente de Peligro)
IARC	International Agency for Research of Cáncer (Agencia internacional de investigación sobre cáncer)
ICP	Espectroscopía de Emisión de Plasma Acoplado Inductivamente
IdV	Índice de Vulnerabilidad
LogKow	Coeficiente de Partición Octanol/Agua
MIT	Metales de Interés Toxicológico
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
MO	Materia Orgánica
NC	Número de Células contabilizadas
Ni	Níquel
NMN	Número de Micronúcleos
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
Pb	Plomo
PCo	Peso Corporal promedio de los organismos expuestos
PECA	Proyecto Ecotoxicológico de <i>Crotalus aquilus</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso de la muestra
Po	Polonio
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
Rexp	Riesgo de Exposición
RfD	Dosis de Referencia
Rpm	Revoluciones por minuto
Se	Selenio
Si	Silicio
TdE	Tiempo de Exposición
TI	Tasa de Ingesta del organismo (mg/día)
TMS	Tiempo de Vida Media en el Suelo

URF.....Unidad de Rescate, Rehabilitación y Reubicación de Fauna Silvestre,  
Endémica y Exótica

USDA.....Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

Vaf.....Volumen de Aforo

VES.....Método de Búsqueda Directa (Visual Encounter Surveys)

VR.....Vagilidad Relativa

Zn.....Zinc

## RESUMEN

La contaminación por metales de interés toxicológico (MIT) constituye una problemática ambiental de escala global, atribuible no solo a la actividad minera, sino también a prácticas agrícolas, urbanas e industriales. Las serpientes, debido a su papel como depredadores, su baja tasa metabólica y dieta especializada, son particularmente susceptibles a la bioacumulación de estos compuestos. No obstante, su inclusión en estudios ecotoxicológicos ha sido limitada, principalmente por retos metodológicos asociados a su manejo, comportamiento críptico y estatus de conservación. Esto subraya la necesidad de emplear métodos no letales y mínimamente invasivos para evaluar su exposición a contaminantes.

Este estudio se llevó a cabo en dos poblaciones silvestres de *Crotalus aquilus* (Klauber, 1952), una especie de víbora de cascabel endémica de México con amplia distribución en el estado de Hidalgo. La región de estudio, la Comarca Minera, presenta antecedentes de actividad minera y evidencia documentada de contaminación por MIT. El objetivo fue evaluar el potencial de *C. aquilus* como bioindicador ambiental en ecosistemas de bosque y matorral, mediante el uso de biomarcadores no letales que permitieran detectar la presencia, bioacumulación y efectos de los MIT.

Se aplicó una modificación a la metodología propuesta por la OPS/OMS y la ATSDR para la evaluación de riesgos químicos, con el fin de caracterizar el peligro de la zona, evaluar el riesgo ecológico, así como la vulnerabilidad, el riesgo de exposición y el riesgo a la salud en las poblaciones de *C. aquilus*.

Asimismo, se determinaron las concentraciones internas de los animales mediante el análisis de biomarcadores de acumulación previamente establecidos para serpientes. De igual forma, se validó el uso del cascabel y del veneno como nuevos biomarcadores no letales y mínimamente invasivos, lo que facilitaría la inclusión de esta especie en estudios ecotoxicológicos.

Finalmente, se evaluó el daño genotóxico que los MIT pueden inducir en condiciones de exposición, a través del análisis de micronúcleos en sangre periférica. Los resultados demostraron, por un lado, la eficacia de esta técnica como un método no letal y poco invasivo para la detección de daño genético, y por otro, la probabilidad de que los MIT, en las concentraciones observadas, promuevan efectos negativos en las poblaciones silvestres.

## ABSTRACT

Pollution by toxicologically relevant metals (MIT) represents a global environmental issue, driven not only by mining activity but also by agricultural, urban, and industrial practices. Snakes, due to their role as predators, low metabolic rates, and specialized diets, are particularly vulnerable to the bioaccumulation of these compounds. Nevertheless, their inclusion in ecotoxicological research has been limited, mainly because of methodological challenges related to handling, cryptic behavior, and conservation status. This underscores the need for non-lethal and minimally invasive approaches to evaluate their exposure to contaminants.

This study focused on two wild populations of *Crotalus aquilus* (Klauber, 1952), a rattlesnake species endemic to Mexico and widely distributed in the state of Hidalgo. The study area, known as the Comarca Minera, has a long history of mining activity and documented evidence of MIT contamination. The objective was to assess the potential of *C. aquilus* as an environmental bioindicator in forest and scrubland ecosystems, using non-lethal biomarkers to detect the presence, bioaccumulation, and effects of MIT.

A modified version of the methodology proposed by PAHO/WHO and ATSDR for chemical risk assessment was applied to characterize local hazards, evaluate ecological risk, and assess vulnerability, exposure risk, and health risk in *C. aquilus* populations.

Internal concentrations were determined through established snake bioaccumulation biomarkers, and the use of the rattle and venom was validated as novel, non-lethal, and minimally invasive biomarkers, facilitating the integration of this species into ecotoxicological studies.

Finally, genotoxic damage potentially induced by MIT was evaluated using the micronucleus assay in peripheral blood. The findings demonstrated the effectiveness of this approach as a non-lethal and minimally invasive tool for detecting genetic damage, while also indicating that MIT, at the observed concentrations, are likely to exert negative effects on wild populations.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la salud de los ecosistemas supone un tema de interés mundial, pues diversas actividades humanas, promueven la liberación de contaminantes al ambiente, comprometiendo no solo la salud del mismo, sino también la salud pública (Terzi y Kalkan, 2024).

Los Metales de Interés Toxicológico, también conocidos como MIT, son considerados contaminantes ambientales de gran importancia, debido a diversas características toxicológicas dentro de las que destacan su elevada persistencia ambiental, su capacidad de bioacumularse en los organismos vivos y su alta toxicidad. En todo caso, estos elementos existen de manera natural en la Tierra, formando parte de la corteza terrestre en pequeñas cantidades, por lo que el riesgo de intoxicación estará determinado por la concentración y disponibilidad de los mismos, dos factores que se ven directamente influenciados por acciones antropogénicas de tipo industrial, como la minería (Horne y Dunson, 1995; Morales, 2013; Londoño-Franco, et al., 2016).

Particularmente en México, la minería ha sido una actividad económica de gran importancia, misma que se ha desarrollado por casi cinco siglos, generando una gran acumulación de residuos y como consecuencia, la paulatina contaminación de los ecosistemas por la presencia de MIT, dentro de los que destacan: As, Cd, Cr, Hg y Pb, como los MIT de mayor interés toxicológico dada su toxicidad y abundancia (Covarrubias y Peña-Cabriales, 2017).

Uno de los métodos que la toxicología provee para evaluar el impacto que los MIT puedan tener en un determinado ecosistema, es mediante la utilización de organismos sensibles, que puedan proveer de información ambiental a los evaluadores. A estos organismos se les conoce como bioindicadores de la calidad del ambiente y se les puede definir como organismos que se pueden utilizar para evaluar una situación ambiental determinada, así como los diferentes cambios que esta pueda tener a través del tiempo (Stankovic et al., 2013).

Si bien, a lo largo la historia, el catálogo de organismos bioindicadores ha aumentado, aún existen varios grupos de animales, sobre todo vertebrados, que permanecen sin ser estudiados a profundidad, como son los sauropsidos no aves o reptiles y en particular, las serpientes (Ibarra-Bautista et al., 2021).

Las serpientes conforman uno de los grupos de vertebrados mayormente diversos en el mundo, además, poseen características como su poca vagilidad (capacidad de desplazamiento geográfico), hábitos mayormente sedentarios, dietas diversas y su posición en las redes tróficas, que las vuelven

especialmente vulnerables ante la contaminación por MIT. Sin embargo, son escasos los estudios ecotoxicológicos en donde se les considere. Esto podría ser el resultado de las diferentes dificultades metodológicas que se presentan al trabajar con serpientes, sin mencionar el estatus de protección de varias especies que dificultan este tipo de estudios. Por ello, varios investigadores hacen hincapié en la utilización de metodologías no letales, que permitan la inclusión de más especies de serpientes al campo de la ecotoxicología (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013).

En México, pese a la basta diversidad ofídica, la ecotoxicología de serpientes representa un campo de investigación poco estudiado, siendo Crocodilia (cocodrilos, caimanes y gaviales) y Testudines (tortugas) las clases de saurópsidos más consideradas en estudios ecotoxicológicos (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013; Ibarra-Bautista et al., 2021).

El estado de Hidalgo, al centro de México, cuenta con 10 regiones geoculturales, dentro de las que destaca la Comarca Minera, esta región debe su nombre a la intensa actividad minera que ha tenido a lo largo de más de 500 años de minería, caracterizada principalmente por la extracción de plata (Ag) y oro (Au) por lo que los suelos de esta región pueden presentar contaminación por MIT asociados a la extracción de dichos minerales (Hernández-Acosta et al., 2009; SGM, 2018).

El estado de Hidalgo, también posee una basta diversidad ofídica en donde el género *Crotalus* (serpientes de cascabel) adquiere una gran importancia tanto ecológica como cultural. Este género, en Hidalgo, cuenta con ocho especies, mismas que se distribuyen ocupando diversos ecosistemas y climas del estado, que van desde zonas montañosas de bosques con climas templados hasta regiones áridas de matorral xerófilo (Fernández-Badillo et al., 2011; 2017).

Una de las especies de víbora de cascabel con mayor área de distribución es *Crotalus aquilus*, conocida como víbora magueyera. Es una especie de víbora de cascabel de montaña de talla mediana, distribuida desde el norte de Hidalgo, centro y sur, presentando mayor abundancia de sus poblaciones al centro del estado, precisamente en la región geocultural de la Comarca Minera (Fernández-Badillo et al., 2011; 2017).

Debido a la contaminación de dicha región y a la escasez de trabajos referidos a ecotoxicología de serpientes en México, resulta interesante llevar a cabo una evaluación ecotoxicológica con *Crotalus aquilus*, probando dos marcadores de bioacumulación de MIT, no letales, conocidos en serpientes y validando dos nuevos marcadores de bioacumulación de MIT, no letales y poco invasivos.

## ANTECEDENTES

### 1. Problemática ambiental por la presencia de MIT en la Comarca Minera, Hgo.

#### 1.1 Descripción de metales pesados, metaloides y MIT

Los metales pesados constituyen un grupo de elementos químicos con características particulares que los distinguen del resto de los elementos de la tabla periódica. Entre estas características se incluyen: su alta densidad, que puede ser igual o superior a 5 g/cm<sup>3</sup>; una masa y peso atómico generalmente superiores a 20 (con excepción de los metales alcalinos y alcalinotérreos); y su capacidad para generar efectos tóxicos en los organismos vivos (Adriano, 1986; Alloway, 2013). Por otro lado, los metaloides son elementos químicos que presentan propiedades intermedias entre los metales y los no metales, tales como el boro (B), silicio (Si), arsénico (As) y polonio (Po), entre otros (Londoño-Franco, et al., 2016).

La Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR) describe a los metales pesados y metaloides como un grupo de elementos con una elevada capacidad de producir efectos adversos a la salud, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, su uso y mecanismos fisiológicos y ambientales. Estos efectos adversos se pueden producir mediante dos mecanismos: el aumento de las concentraciones de estos elementos en las distintas matrices ambientales y la especiación química de los mismos que promueva su cinética ambiental y biodisponibilidad (ATSDR, 2019).

Los elementos metálicos presentes en el ambiente suelen clasificarse en dos grandes grupos desde el punto de vista biológico: los oligoelementos o micronutrientes esenciales, cuya presencia en los organismos vivos es requerida en cantidades mínimas o en trazas para el adecuado funcionamiento de procesos bioquímicos específicos como el Boro (B), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Selenio (Se) y Zinc (Zn); y los metales y metaloides de interés toxicológico (MIT), los cuales no cumplen funciones biológicas conocidas y cuya presencia, incluso en concentraciones muy bajas, puede causar alteraciones fisiológicas severas (Morales, 2013). Este segundo grupo incluye tanto metales tóxicos como el Cadmio (Cd), el Cromo (Cr), el Plomo (Pb) y el Mercurio (Hg), como metaloides tóxicos, tales como el Arsénico (As) y el Antimonio (Sb). Cabe señalar que, en el caso de los micronutrientes esenciales, cuando sus concentraciones superan ciertos umbrales fisiológicos, también pueden actuar como tóxicos,

afectando negativamente los sistemas biológicos en los que interactúan. (Goyer y Clarkson, 2001; Morales, 2013).

Los MIT, son considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y por la ATSDR, como contaminantes ambientales de gran preocupación, debido a las diversas características toxicológicas que los conforman (Londoño-Franco, et al., 2016).

Estos elementos son altamente persistentes en el ambiente, lo que significa que no pueden ser degradados ni eliminados mediante mecanismos naturales. Asimismo, su cinética ambiental y biodisponibilidad pueden verse favorecidas por cambios fisicoquímicos en la matriz donde se encuentren, transformando a los metales presentes en la corteza terrestre en especies más solubles. Estas pueden ser lixiviadas o transportadas mediante la formación de complejos solubles, permitiendo su redistribución en distintos ecosistemas hasta incorporarse en las redes tróficas. Una vez que ingresan a los organismos vivos, pueden ser retenidos en tejidos y fluidos específicos, en un fenómeno conocido como bioacumulación, lo que puede generar severos problemas de intoxicación. (Londoño-Franco et al., 2016).

Desde la Revolución Industrial hasta la actualidad, gran parte de las actividades asociadas al desarrollo humano han contribuido paulatinamente a la liberación de diversos contaminantes en los ambientes naturales. Entre estos destacan los metales de interés toxicológico (MIT), ya que, debido a su elevada persistencia ambiental, pueden permanecer en el entorno de manera indefinida, con la capacidad de interactuar con los seres vivos dentro del ecosistema. (Terzi y Kalkan, 2024).

Algunas de las industrias que han contribuido de manera significativa a la liberación de metales de interés toxicológico (MIT) al ambiente son la alimentaria, automotriz, minera, de soldadura, plomería y cementera, entre otras. De estas, las industrias minera y alimentaria destacan como las principales fuentes de emisión de MIT (Londoño-Franco *et al.*, 2016).

Particularmente para la biota, la exposición a estos contaminantes representa un impacto negativo que puede reflejarse, principalmente, en cambios significativos en la abundancia de las especies, con una disminución en las poblaciones de organismos más sensibles a la contaminación y un incremento notable en aquellas especies que pueden beneficiarse de las nuevas condiciones ambientales. La disminución de las poblaciones de organismos sensibles puede darse por exposiciones agudas o crónicas, donde se podrá observar desde la muerte inmediata de los organismos hasta el deterioro de su material genético, así como el deterioro o cambio en sus

comportamientos. Actualmente, estos efectos se han evaluado en diferentes taxones de animales y plantas, sin embargo, aún existen diversos grupos donde la información referente es escasa (Calao y Marrugo, 2015).

## 1.2 Principales MIT asociados a la minería

La minería es una actividad industrial cuyos procesos supeditan la liberación de MIT al ambiente, pudiendo llegar a comprometer las diferentes matrices medioambientales como el suelo, agua y aire (Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

Los diferentes procesos involucrados en la extracción de minerales, especialmente en la extracción de oro y plata, provocan la liberación de los metales de interés toxicológico (MIT) contenidos en la corteza terrestre hacia el subsuelo, contaminando el agua subterránea mediante el drenaje ácido de roca. Además, se genera contaminación en la superficie a través de la dispersión eólica de suelos de jales, fenómeno que ocurre principalmente en climas áridos. (Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

Durante el beneficio de oro y plata, realizado comúnmente mediante el proceso de amalgamación por mercurio y cianuro, no es posible la recuperación total de los compuestos o de los elementos adicionados, por lo que es común hallarlos en formas solubles en los jales mineros. (Fernández-Bremauntz et al., 2004; Romero y Gutiérrez-Ruiz 2010).

La técnica más común para la extracción de oro y plata implica el uso de cianuro para disolver a los metales de la mena. Sin embargo, este proceso puede liberar a los MIT que estén presentes, como el Pb y el Cd. Estos dos MIT, a menudo se encuentran en minerales de sulfuro que pueden estar presentes en depósitos de oro y plata. También, durante el proceso de trituración y molienda de los metales preciosos, los polvos y partículas finas que contienen Cd y Pb pueden liberarse al ambiente (Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017; Romero y Gutiérrez-Ruiz, 2010).

Por otro lado, la amalgamación es un proceso comúnmente utilizado en la extracción de oro, mediante el cual, se utiliza Hg para formar una amalgama con el oro, permitiendo que el metal precioso se separe de otros minerales. Sin embargo, este proceso puede liberar el Hg al ambiente si no se gestiona adecuadamente (Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017; Romero y Gutiérrez-Ruiz 2010).

### 1.3 Presencia de MIT en la Comarca Minera, Hidalgo

El estado de Hidalgo, México, cuenta con 10 regiones geoculturales, también llamadas regiones naturales y las cuales son definidas con base en características geográficas, sociales, climáticas y económicas. Dichas regiones son: La Huasteca, Sierra Alta, Sierra Baja, Sierra Gorda, Sierra de Tenango, Valle de Tulancingo, Altiplanicie Pulquera, Valle del Mezquital, Cuenca de México y Comarca Minera (SGM, 2018).

La Comarca Minera, a su vez, comprende diferentes municipios: Atotonilco el Grande, Huasca de Ocampo, Mineral del Chico, Mineral de la Reforma, Mineral del Monte, Pachuca de Soto, Epazoyucan y Omitlán de Juárez (Fernández-Badillo et al., 2011). Esta región geocultural debe su nombre al extenso historial minero que posee, mismo que data de más de 500 años de minería y la cual se ha caracterizado principalmente por la extracción de oro y plata, situación que ha propiciado la gradual contaminación de los suelos de la región por Cd, Hg y Pb (Fonseca, 2018; Hernández-Acosta et al., 2009; SGM, 2018).

## **2. Caracterización toxicológica del cadmio, mercurio y plomo**

### **2.1 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del cadmio (Cd)**

El Cd es un metal perteneciente al grupo II del bloque B de la tabla periódica, su forma elemental exhibe características de un metal blando, de color blanco con matices en azul. Posee un peso atómico de 112.40 g/mol y densidad relativa de 8.65 a 20°C (68°F), con número atómico 48, su punto de fusión es de 320.9°C (610°F) y de ebullición de 765°C (1410°F). Este elemento no se encuentra en estado libre en la naturaleza como metal puro y rara vez se le encuentra en grandes cantidades formando cloruros y sulfatos, generalmente, este se encuentra estrechamente asociado con el Zn (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005).

El cadmio (Cd) es liberado al ambiente mediante diversos procesos, entre los que destacan: de forma natural, a través de la descomposición de rocas en ríos, emisiones por incendios y actividad volcánica; y de manera antropogénica, principalmente por actividades industriales como la minería, especialmente en la extracción de zinc (Zn), plomo (Pb) y cobre (Cu). Se estima que su movilización anual a nivel mundial es de 9,039,000 toneladas (Ramírez, 2002). La contaminación de suelos agrícolas con cadmio es relevante debido a que este metal puede ingresar a la cadena trófica mediante el uso frecuente de fertilizantes fosforados, que constituyen una fuente importante de este compuesto. La cinética ambiental del Cd depende de varios factores, como el pH y la cantidad de materia orgánica, los cuales varían según las condiciones ambientales. Generalmente, el cadmio se adsorbe fuertemente a la materia orgánica, donde permanece inmóvil en el suelo, pero puede ser incorporado por las plantas, entrando así en la cadena alimentaria. (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005).

Dependiendo de la dosis, fuente y tipo de exposición puede dañar varios órganos como el hígado, riñón, pulmón, hueso, testículos y placenta. Así mismo el Departamento de Servicios de Salud Humana de Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services) propone que el Cd sea considerado un compuesto carcinogénico y la IARC también lo clasifica como cancerígeno para los humanos (Grupo 1) (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; IARC, 1993; Ramírez, 2002).

### **2.2 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del mercurio (Hg)**

El Hg es un elemento químico perteneciente al bloque D de la tabla periódica, con número atómico de 80. Presenta un peso atómico de 200.59 g/mol y una densidad relativa de 13.5 a 20°C. Su punto de ebullición se encuentra en los 356,7° C y su punto de fusión en los -38,83° C. Es un metal

líquido a 0°C, pesado, de color blanco-plateado, sin olor y que por lo general forma esferas. Posee una gran capacidad para amalgamar a casi todos los metales, se evapora a 13° C y no es esencial en ningún proceso biológico. Este elemento puede ser encontrado en la naturaleza en sus formas inorgánicas como mercurio elemental Hg (0) o formas iónicas como (Hg I y Hg II) y en sus formas orgánicas como dimetilmercurio ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg), fenilmercurio (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>HgO<sub>2</sub>) y metilmercurio ((CH<sub>3</sub>) Hg). El Hg (II) tiende a unirse fuertemente con los componentes del suelo, lo que reduce su disponibilidad. Sin embargo, el metilmercurio, una de las formas orgánicas de este metal, es altamente tóxico debido a su gran poder de biomagnificación. Además, posee la capacidad de acumularse en membranas biológicas y, debido a su liposolubilidad, puede atravesar fácilmente membranas como la placentaria y la hematoencefálica. En el ambiente, el mercurio puede encontrarse en diversas formas: elemental, inorgánica u orgánica (metilmercurio). (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005).

El Hg puede ser liberado al ambiente a través de diferentes procesos naturales, tales como los incendios forestales, la actividad volcánica, emisiones oceánicas y la desgasificación de la corteza terrestre. Sin embargo, las acciones antrópicas, como la minería, figuran como una de las principales causas de la liberación de este MIT a los ecosistemas (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005).

Se sabe que los efectos tóxicos del mercurio, varían en función de la especie química, la concentración y el tiempo de la exposición. Algunos de los efectos tóxicos del mercurio, observados en la salud humana consisten en efectos adversos sobre el sistema inmunológico, sistema reproductivo y sistema nervioso. Puede causar sordera, ceguera, impedimento del habla y retraso mental. En el sistema cardiovascular influye en la presión arterial, frecuencia cardíaca y enfermedades del corazón. De igual forma, puede causar daños a diferentes órganos, principalmente a los riñones y el cerebro, además de causar graves problemas en el sistema nervioso (ATSDR, 2005; Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

### 2.3 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del plomo (Pb)

El Pb es un elemento metálico de color azulado a gris mate, flexible e inelástico, perteneciente al grupo 14 del bloque P de la tabla periódica. Posee un número atómico de 82 y un peso atómico de 207.19 g/mol, con una densidad relativa de 11.4 a 16° C. Presenta un punto de fusión de 327.4° C y un punto de ebullición de 1725° C. Es un elemento que, desde el punto de vista de la toxicología,

es de alto riesgo debido a su potencial tóxico. A diferencia de otros elementos considerados micronutrientes, el plomo no ningún beneficio a los seres vivos, por lo que se le considera de riesgo aun en bajas concentraciones, causando problemas de tipo neurotóxicos asociados con la falta de concentración, pérdida de memoria, atrofia en las habilidades motoras el habla y el lenguaje en general; también es considerado como un elemento hepatotóxico, nefrotóxico y genotóxico (ATSDR, 2005; Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

Algunas de las principales fuentes de emisión de Pb al ambiente son la fundición, el procesamiento o beneficio de metales y propiamente la minería, mediante el mal manejo de jales mineros (ATSDR, 2005; Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

El Pb, debido a su naturaleza como catión divalente, presenta una fuerte afinidad por los grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas, ocasionando su desnaturalización. Dentro de los efectos tóxicos causados por el Pb destacan: la perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia, el incremento de la presión sanguínea, daño a los riñones, abortos, perturbación del sistema nervioso, daño al cerebro, disminución de la fertilidad del hombre a través del daño en el esperma, disminución de las habilidades de aprendizaje de los niños, perturbación en el comportamiento de los niños como agresión, impulsividad e hipersensibilidad (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; Covarrubias y Peña-Cabriaes, 2017).

### **3. Uso de bioindicadores en la evaluación del impacto ambiental por MIT**

#### **3.1 Definición y tipos de bioindicadores**

A los bioindicadores se les puede definir como procesos biológicos, especies, parte de ellas o comunidades enteras que se pueden utilizar para evaluar la calidad del ambiente y los diferentes cambios que este pueda tener a través del tiempo (Markert et al., 2003). Este método de evaluación, se ha implementado desde la década de los sesentas y a lo largo del tiempo se ha ido ampliado el repertorio de especies bioindicadoras con el fin de estudiar todo tipo de ambientes (Stankovic et al., 2013).

Los bioindicadores se definen como procesos biológicos, especies, partes de ellas o comunidades enteras que pueden utilizarse para evaluar la calidad del ambiente y los cambios que este pueda experimentar a lo largo del tiempo. Este método de evaluación se ha implementado desde la década de los sesenta, y con el tiempo se ha ampliado el repertorio de especies bioindicadoras para estudiar diversos tipos de ambientes (Stankovic et al., 2013).

Para conocer el estado de salud de un ambiente determinado, la toxicología sugiere la utilización de bioindicadores de calidad ambiental dentro de los que destacan:

**Bioconcentradores:** Organismos que acumulan contaminantes en sus tejidos a concentraciones superiores a las del entorno circundante. Estos organismos pueden emplearse para monitorear la presencia y concentración de contaminantes en un área (Markert et al., 2003).

**Bioindicadores de respuesta temprana:** Organismos que muestran cambios rápidos en su comportamiento, fisiología o morfología en respuesta a la presencia de contaminantes o alteraciones ambientales (Markert et al., 2003).

**Bioindicadores de respuesta tardía:** Organismos que tardan más en manifestar signos de estrés o cambios debido a contaminantes o alteraciones ambientales, pero que eventualmente exhiben efectos negativos en su salud o población (Markert et al., 2003).

**Bioindicadores de exposición crónica:** Organismos que reflejan la exposición prolongada a contaminantes a lo largo del tiempo, manifestándose en cambios en su estructura poblacional, reproducción o salud general (Markert et al., 2003).

## 4. Ecotoxicología de serpientes

### 4.1 Panorama general de la ecotoxicología de serpientes

Las serpientes son un grupo de vertebrados bastante diverso, contando con 4065 especies reportadas alrededor del mundo y cuyos hábitats se extienden a través de dos importantes matrices medio ambientales como son los ambientes acuáticos y terrestres, sin mencionar que sus características biológicas promueven su exposición a los contaminantes ambientales como son los MIT (Fernández-Badillo et al., 2011; 2017; Uetz y Hoske, 2023).

Como se mencionó anteriormente, las serpientes son especialmente vulnerables a la contaminación por MIT, pues sus características conductuales y hábitos alimenticios, inducen largos periodos de exposición a los contaminantes, incrementando la probabilidad de bioacumularlos y biomagnificarlos (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013; Hopkins, 2000; Quesada et al., 2014).

Sin embargo, pese al papel ecológico que este grupo desempeña en los ecosistemas y su vulnerabilidad ante la contaminación por MIT, los estudios que respectan al área de la ecotoxicología aplicada en serpientes, son bastante escasos, pues del total de trabajos ecotoxicológicos realizados en vertebrados, menos del 0.8 % corresponde a serpientes (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013).

Esta falta de trabajos se debe en parte, a las diferentes dificultades metodológicas que se presentan dada la propia conducta de las serpientes, así como las diferentes limitaciones durante la toma de muestras debido al estatus de protección de varias especies, por lo que algunos investigadores sugieren el incremento en el uso de metodologías no letales y poco invasivas que permitan determinar parámetros de bioacumulación y así lograr un mejor entendimiento sobre las posibles afecciones que estos contaminantes puedan tener sobre este grupo de animales en particular y de esta forma, poder dilucidar el papel que las serpientes pueden desempeñar como bioindicadoras de la calidad del ambiente (Jones y Holladay, 2006; Sparling et al., 2010; Quesada et al., 2014).

Puntualizando en el área de ecotoxicología, Campbell y Campbell (2001) mencionan que, para obtener mejores resultados en las evaluaciones de riesgo ecológico y en los estudios de contaminación ambiental por MIT, es necesario considerar un buen complemento de los miembros relevantes de los ecosistemas estudiados y aunque actualmente se han incrementado las investigaciones relacionadas al campo de la ecotoxicología aplicada a los saurópsidos no aves, las

serpientes siguen siendo un grupo poco estudiado pese a su gran diversidad e importancia ecológica.

Pese a que el campo de la ecotoxicología en serpientes, sigue siendo poco estudiados, en la mayoría de las evaluaciones ecotoxicológicas que se han realizado con estos organismos, las serpientes de hábitos semiacuícolas resultan ser las más utilizadas para medir la presencia de elementos tóxicos en dicha matriz, sin mencionar que dichos trabajos, las serpientes suelen presentar los valores más altos de bioacumulación en comparación con otros taxones evaluados, esto debido a su estatus de depredadores (Ibarra-Bautista et al., 2020). En dichos trabajos, el grupo de serpientes al cual se le ha dado un mayor interés ha sido la familia Natricidae, probablemente por ser una de las familias más diversas y al poseer especies con poblaciones relativamente más abundantes en comparación con otras familias de serpientes (Ibarra-Bautista et al., 2020).

Los miembros de la familia Natricidae comúnmente conocidos como culebras de agua, son serpientes de hábitos acuáticos o semiacuáticos, con una dieta muy variada que incluye anfibios y peces, así como ocasionalmente algunos artrópodos y moluscos (Fernández-Badillo et al., 2017), por lo que se les considera como buenos modelos para evaluar la bioacumulación de metales pesados vertidos en cuerpos de agua. También es importante considerar que la mayoría de los miembros de esta familia no poseen veneno y el veneno de los miembros que, si poseen, no resulta letal para el ser humano, por lo que la captura y toma de datos no representa un riesgo para los investigadores.

En la actualidad se cuenta con muy pocos trabajos en donde los organismos estudiados sean serpientes venenosas. Esto, sin duda abre el debate sobre la inclusión de este tipo de serpientes en estudios de ecotoxicología.

Debido a su gran diversidad, las serpientes venenosas, particularmente de la familia Viperidae, juega un papel de suma importancia en los ecosistemas mexicanos, pues su participación en las redes trófica es irremplazable, así mismo también resultan ser organismos muy importantes para las investigaciones médicas de carácter antropocéntrico (Fernández-Badillo et al., 2011), por lo que conocer la respuesta de estos animales ante la contaminación ambiental debe adquirir un mayor interés por parte de los investigadores de las ciencias ambientales.

Actualmente, el género *Agkistrodon* es el único género de serpientes venenosas pertenecientes a la familia Viperidae, con el que se ha llevado a cabo algún estudio o evaluación de riesgo ecológico y contaminación ambiental (Ibarra-Bautista et al., 2020). La mayoría de las especies de este género son animales con hábitos asociados a cuerpos de agua por lo que juegan un rol importante como bioindicadores de contaminación acuática. Sin embargo, son animales con poblaciones relativamente bajas y con hábitos secretivos, por lo que considerarlos dentro de este tipo de estudios, requiere de un esfuerzo de muestreo mayor respecto a otras especies de serpientes asociadas a cuerpos de agua, esto lo podemos ver reflejado en las especies mayormente utilizadas, como son los miembros de la familia Natricidae.

En un estudio realizado por Campbell y Campbell (2002), se presentó una recopilación de los antecedentes disponibles para esa fecha, sobre la implementación de serpientes en estudios ecotoxicológicos, recalcando la falta de datos para el momento (Tabla 1).

Tabla 1 Número de estudios toxicológicos con serpientes. Modificado de (Campbell y Campbell, 2002).

<b>Familia</b>	<b>Número de trabajos</b>	<b>Estudios sobre los efectos</b>
Acrochordidae	2	0
Aniliidae	1	0
Anomalepididae	0	0
Atractaspididae	0	0
Boidae	2	0
Bolyeriidae	0	0
Colubridae	14	4
Elapidae	4	0
Leptotyphlopidae	1	0
Loxocemidae	0	0
Natricidae	0	0
Pythonidae	0	0
Tropidophiidae	0	0
Typhlopidae	1	0
Uropeltidae	0	0
Viperidae	6	1
Xenopeltidae	1	0

Las familias no consideradas este trabajo de Campbell y Campbell en el 2002 y posiblemente incluidas en otra familia por error de clasificación son Natricidae en Colubridae y Pythonidae en Boidae. Como se puede observar en la tabla 1, son realmente escasos los trabajos en donde las serpientes son el organismo considerado para evaluar la contaminación por metales pesados en el ambiente, y más escasas son aquellas evaluaciones que hablan sobre el daño causado en las serpientes por la presencia de estos elementos tóxicos. También podemos notar que existen familias en las que la investigación ha sido prácticamente nula, lo cual abre un gran campo de oportunidades en cuanto a la ecotoxicología de este grupo.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios ecotoxicológicos realizados se han basado en demostrar el potencial de bioacumulación que las serpientes poseen, medir las concentraciones encontradas en diferentes órganos y compararlas ya sea entre sí, entre machos y hembras, diferentes zonas o a través del tiempo. Campbell y Campbell (2001) mencionan que la falta de trabajos relacionados a los efectos adversos que estos elementos tóxicos pueden tener sobre las serpientes, pueda ser debido principalmente a que muchas de las agencias de protección ambiental de Estados Unidos no requieren pruebas en serpientes, sin embargo, los mismos autores hacen énfasis en recapacitar dichas decisiones, principalmente por la gran importancia ecológica que estos organismos poseen. Como se mencionó con anterioridad, son las características biológicas propias de las serpientes lo que las vuelven propensas a la bioacumulación de distintos xenobióticos, en este caso a los MIT. Debido a esto es que se les puede considerar como indicadores útiles de contaminación ambiental, algunos autores hacen énfasis en este aspecto, considerando a las serpientes como auténticos centinelas ambientales (Burger et al., 2017; Campbell y Campbell 2001).

#### 4.2 Métodos de estudio

Los estudios de ecotoxicología con serpientes, son una rama que aún se puede considerar en desarrollo y en donde diversas especies de estos organismos no son considerados para alguna evaluación. Gran parte de este problema deriva de que muchas de las especies se encuentran en algún estatus de amenaza, por lo que la toma de muestras se ve comprometida, lo que obliga a los investigadores a trabajar con animales que puedan encontrarse muertos o bien, optar por trabajar con especies con poblaciones abundantes y que no se encuentren amenazadas (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013).

Si bien el estatus de conservación de este grupo de vertebrados puede ser un impedimento para el desarrollo de estudios de contaminación ambiental y evaluaciones de riesgo ecológico, esta misma condición también puede ser un detonante para impulsar a los investigadores a utilizar métodos no letales de muestreo, los cuales pueden ser fácilmente homologados de estudios en otros grupos de vertebrados (Burger et al., 2017).

Dada la escasez de trabajos de ecotoxicología en serpientes, algunos investigadores han sugerido la utilización de biomarcadores no letales y poco invasivos que permitan incluir en mayor medida a las serpientes en estudios ecotoxicológicos independientemente de que estén en un estatus de protección. Un biomarcador, por definición es, cualquier tipo de muestra biológica obtenida de una

determinada especie; puede ser tejido, fluido, partes del cuerpo o el cuerpo completo; con el cual se puedan detectar concentraciones de determinado contaminante; los biomarcadores no letales más utilizados en estudios toxicológicos con serpientes son la sangre, mudas de piel y “tail clips” (Tabla 2). Este último se refiere a una porción de cola, de entre 2 y 3 cm, que se amputa del animal (Burger et al., 2006; 2017; Jones y Holladay, 2006).

Tabla 2 Biomarcadores utilizados en diferentes especies de serpientes.

<b>Especie</b>	<b>Biomarcador</b>	<b>Fuente</b>
<i>Agkistrodon piscivorous</i>	Sangre y Tail clips	(Burger et al., 2006)
<i>Agkistrodon piscivorous</i>	Hígado	(Quesada et al., 2014)
Cobra de Punjab	Escamas	(Kaur, 1988)
<i>Elaphe guttata</i>	Muda de piel	(Jones y Holladay, 2006)
<i>Natrix natrix</i>	Hígado y musculo	(Gavrić et al., 2019)
<i>Natrix stelata</i>	Hígado y musculo	(Gavrić et al., 2019)
<i>Nerodia fsciata</i>	Sangre y Tail clips	(Burger et al., 2006)
<i>Nerodia fsciata</i>	Muda de piel, Tail clips y sangre	(Hopkins et al., 2001)
<i>Nerodia spideon</i>	Sangre, hígado, riñón, musculo y piel	(Campbell et al., 2005)
<i>Nerodia spideon</i>	Sangre y musculo	(Burger et al., 2005)
<i>Nerodia taxispilota</i>	Sangre y Tail clips	(Burger et al., 2006)
<i>Pituophis melanoleucus</i>	Hígado, riñón, sangre, musculo, corazón y mudas de piel	(Burger et al., 2017)
<i>Thamnophis gigas</i>	Hígado y Tail clips	(Wylie et al., 2009)

Algunas investigaciones incluso se han centrado únicamente en corroborar la utilidad de dichos biomarcadores (Tabla 2), algunos otros, propone otros más invasivos, como es el caso de lo reportado por Quesada et al. (2014), proponen biopsias no letales de hígado para el análisis de contaminantes bioacumulados en serpientes, pero su metodología más complicada e invasiva ha sido poco aceptada.

El interés por sumar a este grupo de vertebrados a los estudios de contaminación ambiental ha ido aumentando a medida que varios investigadores proponen nuevas metodologías cada vez menos agresivas para trabajar con estos animales, por lo que podemos decir que recientemente las serpientes están comenzando a tener la atención que merecen por parte de esta área de la ciencia (Burger et al., 2017; Quesada et al., 2014).

Profundizando un poco sobre el método de análisis mediante “tail clips” es necesario reconocer que se trata de un procedimiento poco invasivo y el cual permite analizar hueso, piel, tejido adiposo y sangre sin la necesidad de sacrificar a los animales (Burger et al., 2006; Hopkins, 2000; Wylie et al., 2009). Según la metodología reportada por los autores, la obtención de los “tail clips” se refiere a la amputación de 1 a 2 cm de la parte final de la cauda y puede ser empleado en serpientes cuya cola no esté implicada principalmente con métodos de cacería o defensa (en el caso del género *Crotalus*), sin embargo, existen algunos puntos discutibles sobre dicho método, como es la implicación de un procedimiento quirúrgico en el animal y el cual debe ser realizado, preferentemente, bajo condiciones de asepsia, con la finalidad de minimizar los riesgos que este procedimiento pueda suponer para los ejemplares de forma que, se complica la toma de muestras.

Pese a que se menciona que el biomarcador “tail clips” no compromete la integridad de los ejemplares, hay que analizar ciertos aspectos. Recordemos que las serpientes son animales que dependen únicamente de su cuerpo para desplazarse y que muchas de ellas utilizan la cauda para asirse de ramas y otros lugares, también, algunas de ellas como es el caso de varias especies del género *Agkistrodon*, utilizan parte de su cola para atraer presas, moviéndola de un lado a otro como, aparentando ser un gusano (Santibáñez, 2007). Por otro lado, las serpientes del género *Crotalus* dependen de su cola para advertir a sus depredadores de su potencial peligro (Fernández-Badillo et al., 2011). Si bien en este caso, el cascabel que ostentan estos animales al final de la cauda, es una estructura que puede ser reemplazable, cortar parte de la cola evitaría la nueva formación del cascabel. Por lo tanto, el biomarcador “tail clip” puede considerarse un avance en la

implementación de métodos no letales de muestreo, sin embargo, no podría definirse como un método completamente no invasivo.

Por otro lado, algunas investigaciones realizadas en búsqueda de biomarcadores no letales proponen el uso de la muda de piel, pues como ya se ha visto anteriormente en otros grupos de vertebrados, las estructuras queratinosas tienden a bioacumular a los MIT, de esta manera, los metales que entren al organismo de estos escamados podrán ser acumulados en la piel y posteriormente desechados junto con la misma (Jones y Holladay, 2006).

La implementación de la muda de piel como un biomarcador de bioacumulación de MIT, supone una técnica verdaderamente no invasiva, ideal para trabajar con especies cuyo estatus de protección limita los muestreos de otro tipo (Burger et al., 2017). Cabe destacar que, en los trabajos revisados, las concentraciones halladas en muda de piel se correlacionan significativamente con las concentraciones de órganos internos según los autores (Ibarra-Bautista et al., 2021).

Pese a la reciente implementación de nuevos biomarcadores no letales en serpientes, aun no se han reportado trabajos con las estructuras queratinosas comúnmente llamadas cascabeles, propias de animales del género *Crotalus* y mucho menos con el veneno de los mismos.

## 5. Inclusión del género *Crotalus* como herramienta toxicológica

### 5.1 Diversidad e importancia del género *Crotalus* en México

México cuenta con una gran diversidad de serpientes, destacando a las serpientes de cascabel (género *Crotalus*) como uno de los géneros más diversos y cuyas especies están presentes en casi todos los ecosistemas del territorio nacional, conformando así, un grupo de gran importancia cultural y ecológica para México (Fernández-Badillo et al., 2017). Particularmente en el estado de Hidalgo, el género *Crotalus* es igualmente diverso, pues ahí se distribuyen ocho de las 46 especies de víboras de cascabel del país, abarcando gran parte del estado (Fernández-Badillo et al., 2011; 2017; Uetz y Hoske, 2023).

Dada la gran importancia ecológica que las serpientes de cascabel poseen, la integración de este taxón en estudios ecotoxicológicos es precisa, sin embargo, debido al estatus de protección de varias especies, la consideración de estos animales en estudios ecotoxicológicos requiere de la implementación de metodologías no letales y poco invasivas que permitan la toma de muestras, sin perjudicar a los animales.

### 5.2 Biomarcadores no letales propuestos para el género *Crotalus*

Se han probado a diferentes tipos de muestras biológicas como biomarcadores no letales para su uso en serpientes, sin embargo, la obtención de algunas de estas, implican procesos quirúrgicos para los animales, que, si bien no se trata de métodos letales, si implica un procedimiento agresivo y estresante para los animales. Por otro lado, el cascabel de estas serpientes, al ser una estructura queratinosa, sin terminaciones nerviosas, formada por la muda de piel de los organismos, puede fácilmente ser retirado de las serpientes sin que esta acción signifique algún tipo de daño para los animales. Además, se ha observado que las estructuras queratinosas, como la muda de piel de las serpientes son buenos biomarcadores no letales, que permiten medir bioacumulación de MIT en este grupo de animales, pues en distintas investigaciones, las concentraciones reportadas en la muda de piel de las serpientes, se correlacionaban significativamente con las concentraciones reportadas en órganos internos de los animales (Burger et al., 2017; Campbell et al., 2006; Jones y Holladay; 2006).

De igual forma, se ha observado la presencia de MIT acumulados en tejidos y fluidos ricos en proteínas, dada la naturaleza de los MIT. Sin embargo, a la fecha, no se cuenta con ningún trabajo

que haya confirmado o descartado la utilización del veneno de las serpientes, como un marcador de bioacumulación de MIT, ya que el veneno está constituido, aproximadamente, por un 90% de proteínas en peso seco (Borja et al., 2014; Sparling et al., 2010).

Dado lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se basa en la aplicación de una evaluación ecotoxicológica en dos poblaciones de víboras de cascabel, utilizando métodos no letales y poco invasivos de muestreo, con el fin de ampliar el conocimiento de la relación entre contaminantes y sus posibles efectos genotóxicos en este tipo de serpientes mexicanas, así como brindar nuevas herramientas de muestreo y análisis no letales que promuevan la inclusión de estos organismos en evaluaciones ecotoxicológicas.

## JUSTIFICACIÓN

La Comarca Minera del estado de Hidalgo, presenta un amplio historial de extracción mineral, principalmente de oro, plata y plomo (Hernández-Acosta et al., 2009; SGM, 2018), situación que ha promovido, a lo largo de más de 500 años de minería, la contaminación ambiental por MIT asociados a la extracción de dichos metales preciosos, elementos metálicos que, son de interés por su potencial para causar efectos adversos en la salud humana, animal o ambiental; en general no tienen función biológica esencial (o solo en trazas muy controladas), son biodisponibles y bioacumulables, altamente persistentes en el ambiente y en general muy tóxicos, aun a bajas concentraciones.

Por ello, se requiere evaluar y monitorear la calidad del ambiente y sus posibles efectos en la biota asociada, muchas de las cuales son posibles gracias a la utilización de diversos organismos que sirvan como bioindicadores y biomonitores ambientales (Burger et al., 2005).

Al incluir a una especie de suma importancia ecológica y con una amplia distribución dentro de la zona de interés, como es *C. aquilus*, en un estudio ecotoxicológico, se estará ampliando significativamente el conocimiento en un área de la ecotoxicología que ha sido poco explorada en México y el mundo (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013; Ibarra-Bautista et al., 2021).

Por otro lado, debido a que muchas de las especies de serpientes mexicanas, particularmente del género *Crotalus*, se encuentran en alguna categoría de protección, se busca que este tipo de investigaciones se realicen bajo protocolos no letales y poco invasivos y bajo las NOMs para su protección (Burger et al., 2005).

Por lo tanto, debido a la contaminación por metales de interés toxicológico (MIT), causada por la minería en esta región, que es una actividad ancestral que se remonta a más de cinco siglos, ligada profundamente a la historia y cultura local; así como, a la escasez de trabajos referidos a la ecotoxicología de serpientes, el objetivo del presente estudio es llevar a cabo una evaluación ecotoxicológica aplicada a dos poblaciones de *C. aquilus* presentes en la Comarca Minera, Hidalgo, priorizando el uso de metodologías no letales y poco invasivas, con el fin de validar la utilización de un biomarcador no letal conocido en serpientes como es la muda de piel y proponer nuevos biomarcadores no letales como el cascabel y el veneno, mismos que puedan ser utilizados en un futuro como parte de una metodología particular para estudios ecotoxicológicos con serpientes del género *Crotalus*.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Realizar una evaluación ecotoxicológica de dos poblaciones de *Crotalus aquilus* (Klauber, 1952), expuestas ambientalmente a metales de interés toxicológico (MIT), en la Comarca Minera, Hidalgo, mediante metodologías de evaluación de riesgos y análisis de marcadores no letales de bioacumulación y daño, para contribuir al conocimiento ecotoxicológico de estos compuestos en serpientes y establecer el potencial de la especie como bioindicadora de calidad ambiental en estudios ecotoxicológicos.

### 2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia, concentración y el riesgo ecológico de tres MIT (Cd, Pb y Hg) en el suelo de las zonas de estudio, mediante espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) y la aplicación de una adecuación de la metodología para la evaluación de riesgos químicos propuesta por la CEPIS/OPS y ATSDR, para caracterizar el peligro de la zona y sustentar los criterios de la investigación.
2. Evaluar la vulnerabilidad, exposición y el riesgo ecotoxicológico de *C. aquilus* en los sitios de estudio por exposición a MIT, aplicando una adecuación a la de la metodología para evaluación de riesgos químicos propuesta por la CEPIS/OPS y ATSDR, para determinar los riesgos en poblaciones de *C. aquilus* evaluadas ante una exposición a estos compuestos.
3. Evaluar la presencia y concentraciones de MIT en distintos marcadores de bioacumulación de *C. aquilus* (cascabel, veneno, muda de piel y cuerpo completo) en las dos zonas de estudio, mediante ICP, para analizar los patrones de bioacumulación de los MIT en la especie y así corroborar el uso de los biomarcadores conocidos, incluyendo el cascabel y el veneno como nuevos biomarcadores de exposición no letales en serpientes.
4. Evaluar el daño genotóxico inducido por los MIT a concentraciones observadas, en ejemplares de *C. aquilus* de las dos zonas de estudio, mediante la frecuencia espontánea de micronúcleos en sangre periférica (fMN), con el fin de identificar el daño genotóxico potencial por bioacumulación de estos elementos.

# **CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO AMBIENTAL Y EVALUACIÓN DEL RIESGO ECOLÓGICO**

## **1. Introducción**

Actualmente, la salud de los ecosistemas constituye una preocupación global creciente, debido al constante incremento en la liberación de contaminantes al ambiente. Esta situación compromete no solo la integridad de los sistemas ecológicos, sino también el bienestar humano. En este contexto, diversas agencias sanitarias han enfatizado la importancia de comprender, de manera prioritaria, los riesgos biológicos y ecológicos asociados a la presencia de contaminantes en un entorno determinado. Por lo tanto, resulta fundamental identificar, limitar y controlar dichos compuestos para mitigar sus efectos adversos (Mendoza-Vázquez et al., 2022).

En concordancia con lo anteriormente expuesto, la primera etapa de este estudio se centra en la caracterización del peligro en la zona de análisis, lo cual implica la identificación y cuantificación de los metales de interés toxicológico (MIT), específicamente cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg), presentes en el área de estudio. Asimismo, se consideran diversas variables ambientales que pueden incrementar la peligrosidad de estos agentes químicos. A continuación, se describen los métodos analíticos más comúnmente empleados para la detección y cuantificación de los MIT en distintas matrices ambientales y biológicas (Linarez, 2020; USEPA, 2007):

Espectroscopía de absorción atómica (EAA): La EAA permite la determinación precisa de MIT mediante la absorción de radiación electromagnética a una longitud de onda específica (Linarez, 2020). La concentración de metales como Cd, Hg y Pb, que son altamente tóxicos incluso en bajas concentraciones, puede medirse de manera efectiva, aunque su sensibilidad depende de la longitud de onda seleccionada y del tipo de metal. Esta técnica es adecuada cuando se busca cuantificar concentraciones moderadas de un solo elemento a la vez. Comparada con otras técnicas como la espectrometría de masas, la EAA tiene una menor sensibilidad y capacidad para detectar trazas de metales, lo que la hace más limitada cuando se requiere una detección de niveles extremadamente bajos o la medición simultánea de múltiples elementos (Linarez, 2020; USEPA, 2007).

Espectrometría de masas (EM): La EM se distingue por su capacidad para identificar y cuantificar MIT mediante la medición precisa de las masas de los iones generados (Linarez, 2020). La técnica de ICP-MS (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente) es particularmente útil

debido a su excepcional sensibilidad y selectividad, permitiendo la detección de trazas de metales en concentraciones extremadamente bajas, incluso en el rango de partes por billón (ppb). Es ideal para casos donde se requiere una alta sensibilidad y se necesitan resultados rápidos y detallados de múltiples elementos simultáneamente. Comparada con la EAA, la EM ofrece una mayor sensibilidad y capacidad de análisis multi-elemental, lo que la convierte en la técnica preferida cuando se busca detectar niveles muy bajos de contaminantes en suelos o fluidos (Linarez, 2020; USEPA, 2007).

Cromatografía de alta resolución (HPLC): La HPLC se utiliza principalmente para separar y cuantificar componentes individuales en una muestra, aunque su aplicabilidad en la detección de MIT está generalmente limitada a la combinación con otras técnicas como la EAA o la EM (Acosta, 2007; Linarez, 2020). Cuando se utiliza con estos detectores, la HPLC permite identificar y cuantificar metales específicos y sus especies químicas, lo que puede ser crucial en estudios donde se desea conocer no solo la presencia del metal, sino su forma química (especiación), lo cual influye en su toxicidad y biodisponibilidad. La HPLC es particularmente útil cuando los MIT se encuentran asociados con otras sustancias en el suelo, lo que afecta su movilidad y requiere de técnicas que separen estos compuestos antes de la detección (Linarez, 2020; USEPA, 2007).

Espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP): El ICP es una técnica de elección para la identificación y cuantificación de MIT debido a su capacidad para analizar múltiples elementos simultáneamente con una alta sensibilidad (Linarez, 2020). En este método, la muestra se atomiza y ioniza en un plasma de alta temperatura, generando radiación electromagnética característica de cada metal, la cual es medida para determinar su concentración. Comparado con la EAA, el ICP tiene una sensibilidad mucho mayor y una capacidad superior para medir trazas de metales en muestras complejas. Además, la combinación de ICP con otras técnicas de separación, como la cromatografía, permite una caracterización detallada de los metales presentes, ofreciendo tanto sensibilidad como especificidad. Esto lo convierte en una técnica robusta y versátil, adecuada para la detección de trazas de metales pesados en suelos contaminados, especialmente cuando se requiere evaluar varios elementos simultáneamente con precisión (Linarez, 2020; USEPA, 2007).

Los métodos analíticos empleados son fundamentales para una caracterización precisa de la peligrosidad de los metales de interés toxicológico (MIT) en suelos. Esta caracterización es esencial

para evaluar su impacto potencial en la salud humana y en el medio ambiente. La eficacia de estos métodos depende de diversos factores, entre ellos su límite de detección, el tipo de matriz ambiental en la que se encuentran los contaminantes y el grado de interacción de estos con la matriz o con otros elementos presentes. La capacidad para detectar concentraciones incluso mínimas de MIT resulta crucial para implementar medidas preventivas y correctivas oportunas (Linarez, 2020).

El ICP es la técnica más adecuada para este estudio debido a su capacidad para analizar múltiples elementos simultáneamente con alta sensibilidad (Acosta 2007). Comparado con otras técnicas como la EAA, que es más limitada en su capacidad para medir concentraciones bajas de metales o analizar varios elementos a la vez, el ICP proporciona una determinación más precisa y detallada de los MIT, esto lo hace ideal para estudios de ecotoxicología, donde la detección de trazas de metales pesados es crítica para evaluar la peligrosidad de los suelos contaminados y la bioacumulación en organismos (Alloway, 2013; Linarez, 2020).

Por otro lado, las evaluaciones de riesgos químicos, son procesos complejos y rigurosos que implican la evaluación sistemática de los riesgos asociados con la exposición a sustancias químicas. Estas evaluaciones aplican metodologías bien definidas y un enfoque multidisciplinario para garantizar la integridad y la precisión de los resultados (CEPIS/OPS, 2005; Lu et al.,2015).

El proceso de evaluación comienza con la identificación de las sustancias químicas de interés y la recopilación de datos sobre sus propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas. Esto implica examinar estudios científicos, informes técnicos y datos epidemiológicos relevantes para determinar la naturaleza y el alcance de los posibles riesgos (Lu et al.,2015).

Una vez recopilada la información, se procede a evaluar la toxicidad de las sustancias químicas, considerando factores como la dosis, la vía de exposición y la duración de la exposición. Esto se realiza mediante la aplicación de modelos y criterios científicos aceptados internacionalmente, con el fin de determinar los efectos agudos y crónicos que pueden resultar de la exposición a las sustancias químicas en cuestión (CEPIS/OPS, 2005; Lu et al.,2015).

Paralelamente, se evalúa la exposición a estas sustancias, identificando las rutas potenciales de exposición, las fuentes de contaminación y los patrones de uso. Esto implica considerar factores como la contaminación del aire, agua y suelo, así como la exposición ocupacional y la ingesta de alimentos contaminados. Una vez completadas estas evaluaciones, se caracterizan los riesgos asociados con la exposición a las sustancias químicas, teniendo en cuenta la toxicidad y la

exposición. Esto implica la estimación de los niveles de riesgo para la salud, así como la identificación de posibles poblaciones vulnerables, ya sea por su sensibilidad o susceptibilidad, en el caso de especies silvestre, el término utilizado es riesgo ecotoxicológico, dejando el término de salud para estudio en humanos (CEPIS/OPS, 2005).

Finalmente, los resultados obtenidos a partir de la evaluación de riesgos constituyen una herramienta fundamental para respaldar la toma de decisiones regulatorias y la formulación de políticas en materia de salud pública y protección ambiental. Estos resultados pueden traducirse en la implementación de medidas para el control de la contaminación, la definición de estándares de calidad ambiental, así como en la elaboración de recomendaciones orientadas a salvaguardar la salud humana y la integridad de los ecosistemas frente a los riesgos identificados (CEPIS/OPS, 2005).

## **2. Material y métodos**

### **2.1 Caracterización de la zona de estudio**

Hidalgo es uno de los 32 estados de México, se ubica al centro del país entre las coordenadas 19°35'52" y 21°25'00" latitud norte y 97°57'27" y 99°51'51" longitud oeste. Presenta colindancias con el estado de San Luis Potosí al norte, con el estado de Veracruz al noroeste, con el estado de Puebla al suroeste, con el estado de Tlaxcala. el Estado de México al sur y con el estado de Querétaro al oeste y noroeste (Ramírez-Bautista et al., 2021).

El territorio hidalguense posee una superficie aproximada de 20 905 km<sup>2</sup>, lo que corresponde al 1.1% del territorio nacional y alberga una vasta diversidad biológica en sus diferentes ecosistemas, mismos que comprenden: bosque de coníferas, bosque de pino/encino, bosque mesófilo de montaña, selva alta perennifolia, matorral xerófilo y pastizales naturales, resultado de la ubicación geográfica transicional entre las regiones Neártica y Neotropical. Sin embargo, el impacto asociado a las actividades productivas, como la minería, han comprometido la salud de los diferentes ecosistemas (CEBC-CONABIO, 2021).

El estado de Hidalgo presenta un historial de más 500 años de extracción de minerales, por lo que se le considera una entidad minera de suma importancia para el país. Actualmente la extracción mineral del estado sigue siendo significativa, ocupando en el 2018 el tercer lugar a nivel nacional en extracción de Mn, Cd, Au, Ag, Pb y Zn (SGM, 2018).

La Comarca minera, pertenece a una de las diez regiones geoculturales en las cuales está dividido el estado de Hidalgo (Figura. 1), debe su nombre a la gran cantidad de yacimientos mineros y pertenece a la región minera Pachuca-Actopan, una de las cuatro regiones mineras del estado (Figura. 2).

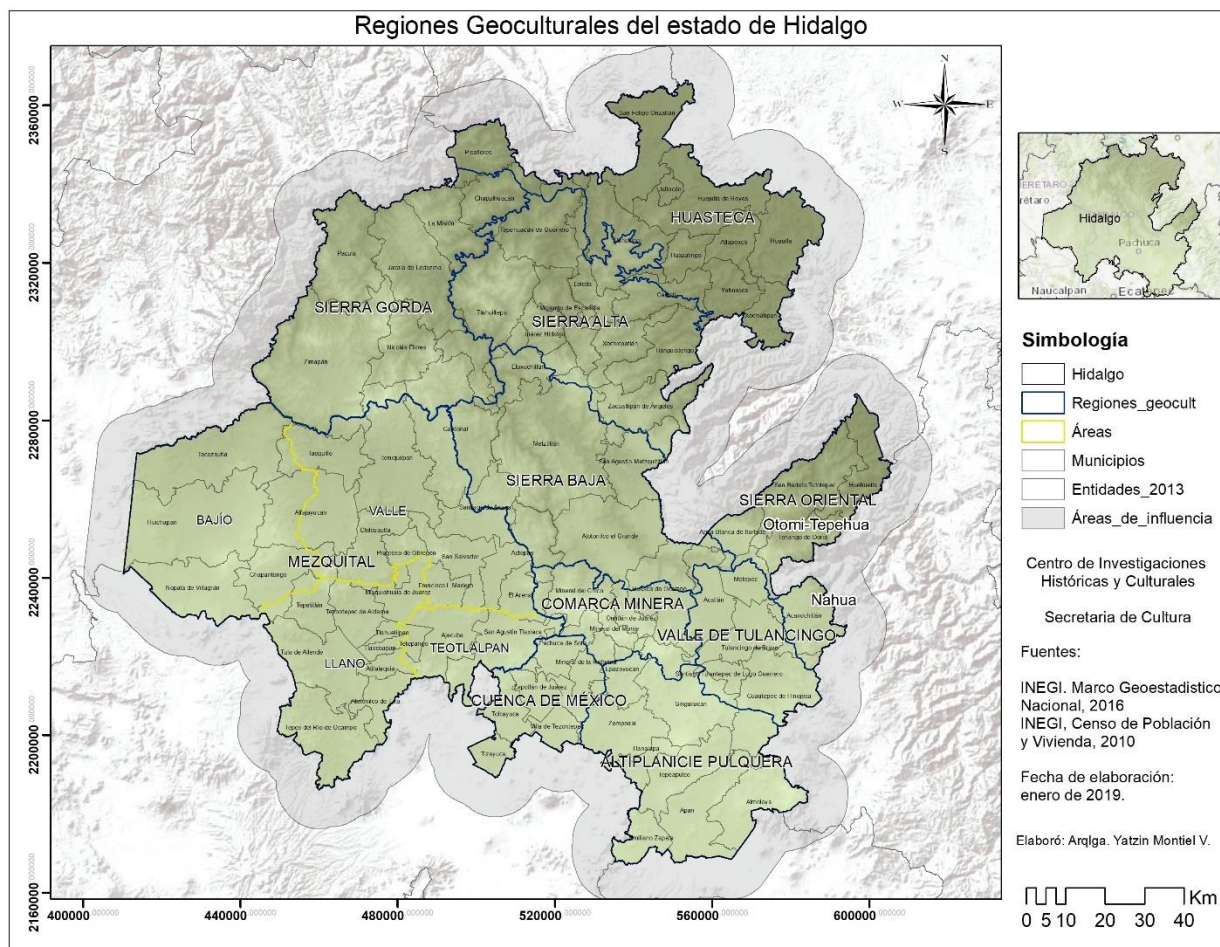


Figura 1. Regiones geoculturales del estado de Hidalgo. Tomado de Gobierno del Estado de Hidalgo, (2024).

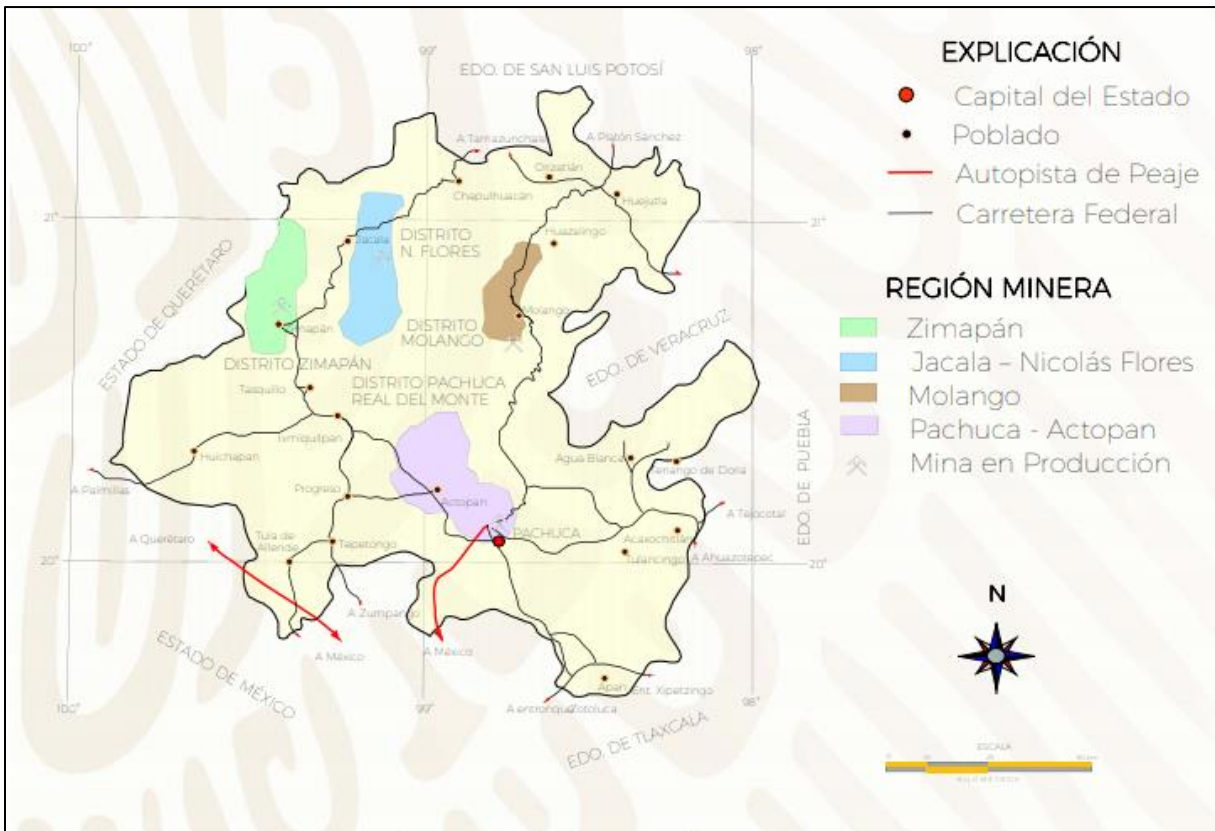


Figura 2. Regiones mineras del estado de Hidalgo. Tomado de Servicio Geológico Mexicano (2018).

En esta región se encuentra también la Sierra de las Navajas, localizada entre las coordenadas 21.20972 N y 98.58452 W (Figura. 3) y cuya historia la ubica como una zona de gran producción minera desde la época colonial, pues es una zona rica en yacimientos de Ag y Au principalmente (SGM, 2018). La zona presenta un intervalo altitudinal de 2600 a 3200 msnm. El clima de esta región es templado, con una vegetación compuesta principalmente por bosques de coníferas, bosques de pino y encino, áreas de matorral xerófilo y pastizales (Fernández-Badillo et al., 2011; Olvera-Olvera et al., 2021).

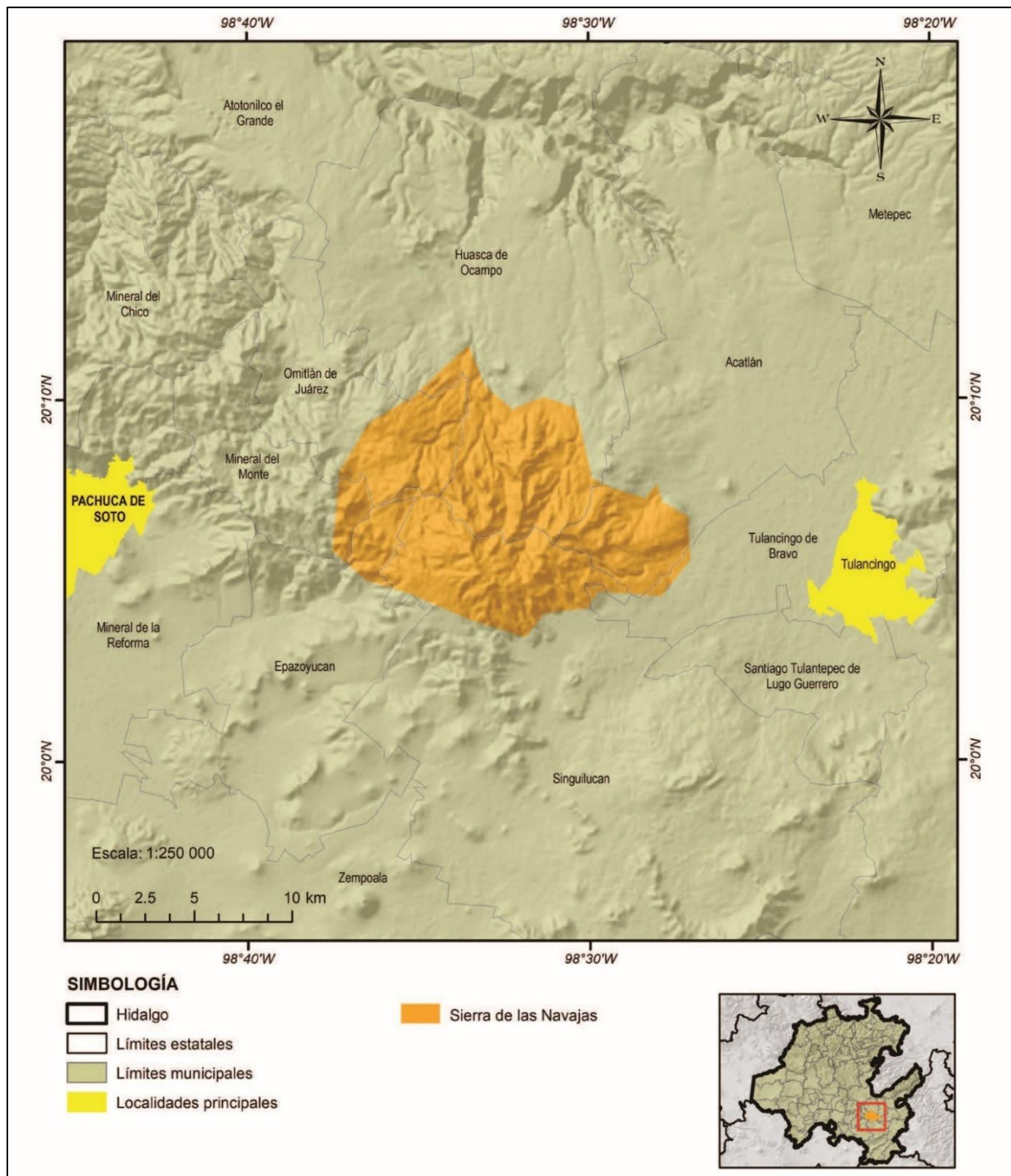


Figura 3. Sierra de las navajas en el estado de Hidalgo, México. Tomado de Olvera-Olvera et al. (2021).

El presente trabajo se realizó con dos poblaciones conocidas de *Crotalus aquilus* (Olvera-Olvera et al., 2021) distribuidas en dos ecosistemas diferentes dentro de la Comarca Minera, Hidalgo. Las

zonas de estudio fueron una zona de bosque de pino y encino perteneciente al ejido El Guajolote, en la Sierra de las Navajas, que incluye a los municipios de Epazoyucan y Omitlán de Juárez (Figura. 4) y un área de matorral xerófilo perteneciente al municipio de Xochihuacán, Hidalgo (Figura. 5), ambas zonas pertenecientes a la Comarca Minera, Hidalgo.



Figura 4. Sitio de muestreo de la zona de bosque, en el ejido El Guajolote, en la Sierra de las Navajas, Hidalgo (Google Earth, 2022).



Figura 5. Sitio de muestreo de la zona de matorral xerófilo, en el municipio de Xochihuacán, Hidalgo (Google Earth, 2022).

## 2.2 Recolección de suelo

La toma de muestras de suelo se efectuó siguiendo el protocolo establecido en la Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2016, que establece los parámetros para el muestreo de suelos para la identificación y cuantificación de metales y metaloides, y el manejo de las muestras. Y se realizó un muestreo de tipo exploratorio en las diferentes áreas de estudio. Este tipo de muestreo tiene como objetivo obtener muestras de suelo representativas para establecer la presencia de contaminación (NMX-AA-132-SCFI-2016).

En cada zona se recolectaron un total de 10 muestras simples, de 1 Kg cada una, para formar una sola muestra compuesta por cada zona de estudio, según la metodología descrita en la NMX-AA-132-SCFI-2016. El número de muestras se estableció atendiendo a lo recomendado para el estudio de sistemas naturales, debido a que dicha cantidad se considera suficiente para observar patrones en el comportamiento de una variable, al mismo tiempo que posee el suficiente sustento estadístico que respalde dicho comportamiento (Gotelli y Edison, 2004).

Se aplicó el método de muestreo dirigido, el cual establece que la selección de los puntos de muestreo debe basarse en el conocimiento previo sobre la fuente de contaminación. Por lo tanto, es fundamental contar con información física e histórica confiable del sitio de estudio. Este enfoque resulta especialmente adecuado para muestreos rápidos y con recursos limitados (NMX-AA-132-SCFI-2016).

Atendiendo lo anterior, las muestras de suelo se tomaron de manera superficial, con una profundidad de muestreo de 0 a 5 cm a partir de la superficie (NMX-AA-132-SCFI-2016). Para el traslado de las muestras de suelo al laboratorio, se continuó atendiendo a lo recomendado por la Norma Mexicana NMX-AA-132-SCFI-2016, apartado 6, página 18, que establece el manejo y control de muestras.

### 2.3 Determinación de los MIT en el suelo

Previo a la determinación de metales pesados en las muestras de suelo, estas deben pasar por un proceso de digestión ácida.

La digestión ácida de las muestras de suelo se realizó utilizando un horno de microondas MARSX, siguiendo el protocolo establecido por la USEPA (2007). En una balanza analítica, se pesaron 0.2 g de suelo, posteriormente se depositaron en vasos de propileno para microondas a los cuales se les agregó 5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). Posteriormente se realizó la digestión ácida bajo las condiciones establecidas en el método 3051A de la USEPA. Al término de la digestión, la muestra resultante fue aforada a 50 mL con agua desionizada para su posterior lectura (USEPA, 2007).

Finalmente, las muestras de suelo, se analizaron mediante la técnica de espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) Utilizando un equipo Perkin Elmer, Mod. Optima 8300, USA (Fonseca, 2018). Los metales fueron determinados en las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$CEXP = \frac{CL}{Pmu} \times Vaf \times Fd$$

Donde:

$C_{EXP}$  = Concentración de exposición (mg / Kg)

$CL$  = Concentración leída (mg / L)

$Vaf$  = Volumen de aforo (L)

$Fd$  = Factor de dilución. Volumen de aforo / Volumen de la alícuota

$Pmu$  = Peso de la muestra (g)

## 2.4 Análisis fisicoquímico del suelo

Se determinaron parámetros fisicoquímicos que pudieran supeditar la cinética ambiental de los MIT. Los análisis fisicoquímicos de las muestras de suelo se realizaron con base en lo establecido en la norma mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, los métodos para su estudio y análisis.

Se realizó la determinación del color del suelo mediante el método de tablas de Munsell (NOM-021-RECNAT-2000); la determinación de la textura del suelo se realizó mediante el método AS-09 (NOM-021-RECNAT-2000); la determinación del pH del suelo se realizó mediante el método AS-02 (NOM-021-RECNAT-2000); finalmente, los niveles de materia orgánica se determinaron de manera indirecta, con base en lo establecido por Castellanos (2000) y Molina y Méndez (2002) quienes mencionan que, el color, aunque no es un método directo para cuantificar la materia orgánica del suelo, este se puede utilizar como un indicador indirecto y cualitativo, relacionado con el porcentaje de materia orgánica.

## 2.5 Evaluación del riesgo ecológico

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis químico del suelo, se procedió a la evaluación del riesgo ecológico asociado a los metales de interés toxicológico (MIT), empleando la metodología propuesta por el CEPIS/OPS (2005) y Lu et al. (2015). El proceso se inició con el cálculo del Cociente de Peligro Ambiental (CP), utilizando la siguiente ecuación:

$$CP = C_{EXP}/C_{REF}$$

Donde:

$C_{EXP}$  = Concentración de exposición reportada en no más de un año, en este caso, las concentraciones obtenidas mediante el análisis de suelo (CEPIS/OPS, 2005; González-Mille et al., 2010; Latif y Yong, 2014; Lu et al., 2015).

$C_{REF}$  = Concentración de referencia establecida como límite máximo permitido, en este caso, obtenido de la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por Ag, As, Ba, Br, Cd, Cr (VI), Hg, Ni, Pb, Se, Tl y/o V (CEPIS/OPS, 2005; González-Mille et al., 2010; Latif y Yong, 2014; Lu et al., 2015).

Para la interpretación, el valor del Cociente de Peligro Ambiental (CP) permite evaluar si la concentración detectada representa un riesgo para la salud humana o ecosistémica, conforme a las normas establecidas. Se considera un “riesgo ambiental alto” cuando  $CP \geq 6$ , un “riesgo ambiental medio” para valores entre 1 y 5, y un “riesgo ambiental bajo” si  $CP \leq 1$  (CEPIS/OPS, 2005; Lu et al., 2015).

A partir del valor obtenido de CP, se determinó el Riesgo ecológico potencial ( $Er$ ), que es un indicador cuantitativo que evalúa el riesgo ambiental que representa un metal contaminante específico en un ecosistema, combinando su concentración relativa con su potencial tóxico, y se determinó mediante la siguiente ecuación (Hakanson, 1980; Hamid y Payandeh, 2022; Nozari et al., 2023).

$$Er = T_R \times CP$$

Donde:

$Er$  = Riesgo ecológico potencial

$T_R$  = Índice de respuesta a la toxicidad, cuantifica el grado de respuesta biológica ante una exposición a un tóxico, comparando la intensidad del efecto con la concentración de la sustancia. Se usa en estudios de riesgo ambiental y en pruebas de toxicidad de contaminantes en organismos vivos, con base en los criterios establecidos por Hakanson (1980), Hamid y Payandeh (2022) y Nozari et al. (2023); los valores de  $T_R$  para Cd, Pb y Hg son 30, 5 y 40 respectivamente.

Para la interpretación del riesgo ecológico potencial ( $Er$ ) de cada MIT, se considera el siguiente criterio:  $Er \leq 40$  riesgo bajo;  $Er > 40 < 80$ , riesgo medio;  $Er > 80, < 160$ , riesgo significativo;  $Er > 160 < 320$ , riesgo alto; y  $Er \geq 320$ , riesgo muy alto (Hakanson, 1980; Hamid y Payandeh, 2022; Nozari et al., 2023).

Debido a la múltiple presencia de MIT en la zona de estudio, se calculó el Índice de riesgo ecológico acumulativo (ERI), el cual se calcula en base a la sumatoria de los  $Er$  de cada contaminante evaluado, siempre y cuando sean un grupo de compuestos con efectos similares o mismo grupo de compuestos, mediante la siguiente ecuación (García-Reynoso et al., 2007; Hamid y Payandeh, 2022).

$$ErI = \sum Er_i$$

Para su interpretación, se consideran como riesgo ecológico bajo si  $ERI \leq 150$ , moderado si  $ERI \leq 300$ , alto si  $ERI \leq 600$  y muy alto si  $ERI \geq 600$  (García-Reynoso et al., 2007; Hamid y Payandeh, 2022).

De igual forma se evaluó el Tiempo de vida media en suelo (TMs) de los MIT, el cual puede definirse como el tiempo que se requiere para que una sustancia química alcance la mitad de su concentración en el suelo (Martín-Olmedo et al., 2016; Ramírez y Lacasaña, 2001); A mayor TMs, mayor permanencia en el ambiente y por ende mayor peligrosidad (MINAM, 2015).

Por lo general, debido a la naturaleza química de los metales pesados, la peligrosidad corresponderá a la más alta, por su alta permanencia ambiental, debido a que no se degradan no física, ni química ni biológicamente.

Finalmente, para los objetivos de este trabajo, se diseñó un indicador de peligro que evaluara diferentes propiedades fisicoquímicas del suelo que pudieran supeditar el comportamiento ambiental peligroso de los MIT a evaluar. Donde, Marín (2008) y Sauquillo et al. (2003) mencionan que los parámetros fisicoquímicos del suelo, tales como el pH, la materia orgánica y la textura, son fundamentales para comprender el comportamiento ambiental de los metales de interés toxicológico (MIT), pues estos factores influyen de manera significativa en la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes.

Según Marín (2008), el pH del suelo es un determinante crítico que afecta la solubilidad de los metales pesados. Un pH ácido puede aumentar la disponibilidad de ciertos metales, facilitando su absorción por las plantas y organismos del suelo.

Por otro lado, Sauquillo et al. (2003) mencionan que la materia orgánica no solo actúa como un agente estabilizador, sino que también facilita la movilización de los MIT a través de la formación de complejos que aumentan su solubilidad en el agua. Este proceso puede hacer que los metales sean más accesibles para las plantas y organismos del suelo, lo que puede incrementar el riesgo de toxicidad.

Por último, la textura del suelo, que se refiere a la proporción de partículas de arena, limo y arcilla, influye en la capacidad de retención de agua y nutrientes, así como en la permeabilidad del suelo (Marín, 2008). Un suelo con textura arcillosa puede retener contaminantes de manera más efectiva debido a su mayor superficie específica, mientras que los suelos arenosos tienden a permitir un mayor drenaje y menor retención de metales (Marín, 2008).

Para la evaluación del indicador del Comportamiento ambiental peligroso (CAmb) de los MIT basado en parámetros fisicoquímicos del suelo, se tomará en cuenta una clasificación de cinco niveles para cada propiedad a evaluar, se asignarán valores ponderados a cada una de las propiedades medidas, finalmente, los valores ponderados de cada propiedad serán sumados e interpretados bajo un criterio de cinco niveles. Se utilizará la siguiente ecuación:

$$CAmb = \sum pH MO Tx$$

Donde:

$pH$  = potencial hidrogeno

$MO$  = materia orgánica

$Tx$  = textura del suelo

Para su interpretación se considera alta movilidad si la suma final= 15 puntos; media-alta movilidad= 13-14 puntos; media movilidad= 10-12 puntos; baja movilidad= 4-9 puntos; movilidad desconocida  $\leq 3$  puntos.

Potencial de hidrógeno (pH)

Los metales generalmente presentan una mayor solubilidad en suelos con pH ácido, excepto el arsénico (As), molibdeno (Mo), selenio (Se) y cromo (Cr), cuyos comportamientos difieren. El pH del suelo influye en diversos mecanismos de retención metálica, siendo un parámetro clave que afecta los procesos de sorción-desorción, precipitación, disolución, formación de complejos químicos y reacciones de óxido-reducción (Acosta, 2007; Narwal et al., 1999). La determinación del pH se realizó conforme al método AS-02 establecido en la norma NOM-021-RECNAT-2000.

De acuerdo con Pereira y Maycotte (2011) y Rivera et al. (2018) (Tabla 3), se considera:

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Alta solubilidad, si su pH es $< 6.5$ =              | 5 |
| b) | Media solubilidad, si su pH está entre $6.6 - 7.3$ = | 4 |
| c) | Baja solubilidad, si su pH es $> 7.4$ =              | 3 |
| d) | Solubilidad desconocida =                            | 1 |

Tabla 3 Clasificación de pH del suelo. Modificado de (Pereira y Maycotte, 2011; Rivera et al., 2018).

pH de la solución del suelo	Categoría
Extremadamente ácido	<4.5
Muy fuertemente ácido	4.5 – 5.0
Fuertemente ácido	5.1 – 5.5
Medianamente ácido	5.6 – 6.0
Ligeramente ácido	6.1- 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente básico	7.4 – 7.8
Moderadamente básico	7.9 – 8.4
Fuertemente básico	8.5 – 9.0
Muy fuertemente básico	>9.1

#### Materia orgánica (MO)

La formación de complejos por la materia orgánica, es un proceso que determina el transporte de metales pesados. La toxicidad de estos xenobióticos se potencia en gran nivel debido a su tendencia a crear complejos organometálicos, dicho proceso facilita la solubilidad, disponibilidad y dispersión de los elementos (Sauquillo et al., 2003). De acuerdo a lo mencionado por Castellanos (2000) y con base en la tabla de interpretación de análisis de suelos propuesta por Molina y Méndez (2002) (Tabla 4), se considera:

- a) Alta dispersión, si presenta entre 6% > de Mo = 5
- b) Media dispersión, si presenta entre 3 - 5% de Mo = 4
- c) Baja dispersión, si presenta < 2% de Mo = 3
- d) Dispersión desconocida = 1

Tabla 4 Interpretación de porcentajes de materia orgánica (MO). Modificado de Molina y Meléndez, (2002).

Parámetro	Unidades	Bajo	Medio	Óptimo	Alto
MO	%	< 2	3- 5	6 - 10	> 10

#### Textura (Tx)

La porción mineral de los suelos está compuesta por distintas fracciones texturales: arena, limo y arcilla, cuya proporción determina propiedades clave para el comportamiento de los metales de interés toxicológico (MIT) (Acosta, 2007). Las partículas de arcilla, por su elevada área superficial específica y carga superficial negativa, poseen una notable capacidad de adsorción de iones metálicos, reteniéndolos en sus sitios de intercambio catiónico. Esta capacidad influye directamente en la movilidad, biodisponibilidad y persistencia de los MIT en el suelo, reduciendo su lixiviación y limitando su incorporación a sistemas acuáticos o biológicos (Marín, 2008).

En suelos con alto contenido de arcilla, los metales tienden a permanecer adsorbidos a las superficies coloidales, lo que puede disminuir su disponibilidad inmediata para los organismos, aunque no elimina su potencial toxicidad a largo plazo. En contraste, los suelos arenosos, con baja capacidad de intercambio catiónico y menor fracción fina, favorecen la movilidad de los MIT, facilitando su transporte vertical hacia capas profundas por lixiviación (Acosta, 2007; Marín, 2008).

La textura del suelo, fundamental para predecir el comportamiento de los MIT, se determina mediante el método AS-09, establecido en la NOM-021-RECNAT-2000, que permite clasificar los suelos según su contenido porcentual de arena, limo y arcilla.

De acuerdo con Acosta (2007) y al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos "USDA" (2022) (Figura. 6), según el porcentaje del contenido de arcillas en un suelo, se considera:

- a) Alta probabilidad de cambio de 0% a 25% de arcillas = 5
- b) Mediana probabilidad de cambio de 26% a 44% de arcillas = 4
- c) Baja probabilidad de cambio de 45% a 100% de arcillas = 3
- d) Porcentaje de arcillas desconocido = 1

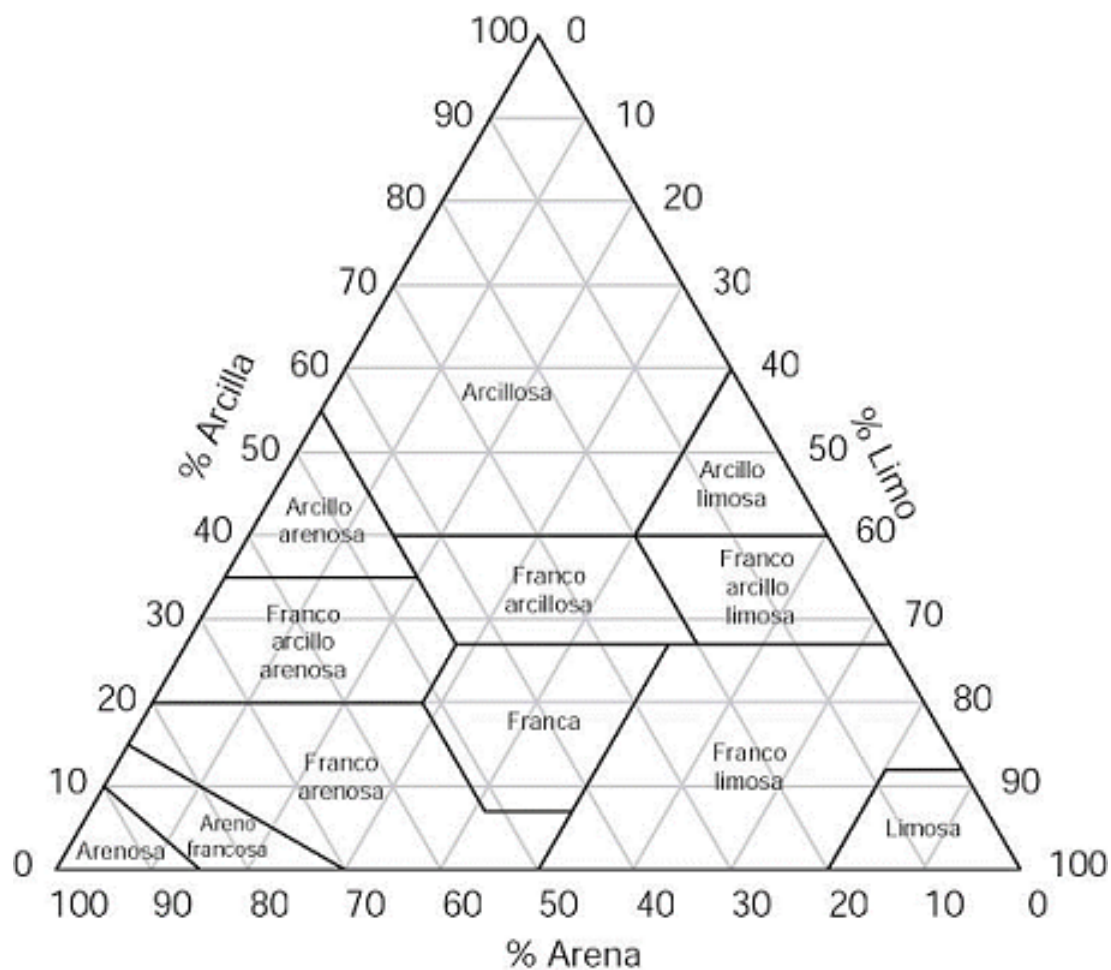


Figura 6 Clases texturales (USDA, 2022).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Evaluación del riesgo ecológico

Se reportan los valores obtenidos de la cuantificación ( $C_{REF}$ ) de los tres MIT a investigar (Cd, Cr y Pb), así como, los cálculos del cociente de peligro ambiental (CP), el riesgo ecológico potencial (Er), el índice de riesgo ecológico acumulativo (ERI) y el comportamiento ambiental peligroso basado en factores fisicoquímicos del suelo (CAmb) obtenidos para cada uno de los metales evaluados en cada zona de estudio (Tabla 5). Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de los tres MIT varían significativamente entre zonas, destacando una mayor concentración de Cd y Pb en la zona de bosque, lo que podría estar asociado con factores de retención del suelo, como el contenido de materia orgánica. Aunque las concentraciones de los tres metales evaluados se encuentran por debajo de los límites permisibles establecidos en la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, su presencia representa una fuente potencial de riesgo ambiental (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; Lema et al., 2010). Se observaron concentraciones significativamente mayores de cadmio (Cd) y plomo (Pb) en la zona de bosque, en comparación con la zona de matorral. Además, el plomo fue el metal que presentó las concentraciones más elevadas en ambas zonas de estudio, superando a Cd y mercurio (Hg).

Tabla 5 Evaluación de los indicadores de riesgo ecológico. La concentración de referencia ( $C_{REF}$ ) y la concentración de exposición (CEXP) se reportan en mg/Kg.

MIT	$*C_{REF}$	$C_{EXP}$		CP		Er		CAmb
		Bosque	Matorral	Bosque	Matorral	Bosque	Matorral	Ambas zonas
Cd	37	$3.45 \pm 2.44$	$0.58 \pm 0.02$	0.093	0.015	2.790	0.450	11
Hg	23	$0.05 \pm 0.009$	$8.06 \pm 1.58$	0.002	0.35	0.084	14.017	
Pb	400	$54.34 \pm 7.25$	$32.64 \pm 5.74$	0.135	0.081	0.675	0.405	
ERI						3.549	14.872	

\*NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004. Los análisis de varianza de Kruskal-Wallis muestran diferencias significativas entre las zonas:  $p = 0.0013$  (Cd),  $p = 0.0023$  (Hg),  $p = 0.0013$  (Pb). Cociente de peligro ambiental (CP): Alto si  $CP \geq 6$ ; Riesgo ecológico potencial (Er): Alto si  $Er \geq 161$ ; Índice de riesgo ecológico acumulativo (RI): Alto si  $RI \geq 301$ ; Comportamiento ambiental peligroso (CAmb): Alto si  $CAmb \geq 15$  (CEPIS/OPS, 2005; Lu et al., 2015).

En cuanto al cálculo del cociente de peligro ambiental (CP), se puede observar en la tabla 5, muestra que, en ambas zonas, el CP se encuentra dentro del rango “riesgo ambiental bajo” para Cd y Hg, mientras que el Pb en la zona de bosque presenta un CP de 0.135, lo que sigue indicando un “bajo medio riesgo” y en la zona de matorral “riesgo ambiental bajo”, según los criterios establecidos por Hakanson (1980) y Hamid y Payandeh (2022). Sin embargo, el índice de riesgo ecológico (Er) revela que mientras el Cd y el Hg presentan valores muy bajos, el Pb alcanza un Er de 0.675 en la zona de bosque y 0.405 en el matorral, lo que, aunque aún clasificado como bajo riesgo, sugiere una mayor acumulación de este metal en el suelo (García-Reynoso et al., 2007; Hamid y Payandeh, 2022).

Al sumar los Er de los tres metales, el riesgo ecológico acumulado (RI) es de 3.549 en la zona de bosque y 14.872 en el matorral (Tabla 5). Estos resultados indican un “riesgo ecológico bajo” para ambos ecosistemas. Además, el comportamiento ambiental peligroso (CAmb) de los tres MIT, para ambos ecosistemas fue de 11, lo que indica una “movilidad media”, lo cual implica que, aunque los metales no representan un riesgo inmediato de desplazamiento, aún existe la posibilidad de que puedan bioacumularse en la biota local, especialmente en organismos que habitan en contacto directo con el suelo, como las serpientes.

En resumen, si bien los valores de Er y ERI sugieren un bajo riesgo ecológico en las zonas estudiadas, es necesario considerar la persistencia, bioacumulación y biomagnificación de estos metales en el ambiente, especialmente en especies vulnerables como las serpientes, cuyas características ecológicas las posicionan en alto riesgo de exposición crónica a estos contaminantes. Estudios a largo plazo y el monitoreo de estas especies son esenciales para evaluar el impacto a nivel poblacional y comunitario (Delgadillo-Ubaldo, 2008; Gaytán-Oyarzun y López-Herrera, 2019; Kazemi et al., 2022).

Por otro lado, se determinaron distintos parámetros fisicoquímicos del suelo de ambas zonas de estudio, con la finalidad de identificar condiciones que pudiesen supeditar la movilidad de los MIT en la matriz. De manera directa se determinó el pH, el color y la textura; los niveles de materia orgánica se determinaron de manera indirecta, con base en lo establecido por Castellanos (2000), los resultados de la caracterización del suelo se muestran a continuación en la tabla 6.

Tabla 6 Propiedades fisicoquímicas evaluadas en el suelo de las zonas de estudio.

Zona	Color		Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural	pH
	H	S					
Bosque	10 YR 4/6 Café	7.5 YR 7/2 Gris	38.30 ± 2.85	43.3 ± 0.92	18.33 ± 7.04	Franco	5.48 ± 0.802
Matorral	10 YR 5/6 Amarillento	10 YR 7/1 Gris claro	40 ± 0.005	40 ± 0.005	17.5 ± 2.30	Franco	7.29 ± 0.802

\*Se muestra la determinación del color en estado húmedo (H) y seco (S) de acuerdo a las tablas de Munsell, los porcentajes de arena, limo y arcilla ± su desviación estándar, la clase textural y el promedio de pH ± su desviación estándar.

Los parámetros físicos analizados, como el color y la textura del suelo, indican que ambas muestras presentan coloraciones claras tanto en estado húmedo como seco, lo cual sugiere condiciones predominantemente aeróbicas. De acuerdo con Castellanos (2000), este tipo de coloración está asociada con niveles intermedios de materia orgánica, lo que coincide con los valores observados en ambas zonas. La materia orgánica desempeña un papel crucial en la dinámica de los contaminantes del suelo, ya que actúa como agente quelante, facilitando la retención de metales y promoviendo el intercambio iónico entre las fases sólida y líquida del suelo, así como entre el suelo y las raíces de las plantas.

En cuanto a la textura, el análisis granulométrico muestra que tanto en el bosque como en el matorral el suelo puede clasificarse como franco, con proporciones similares de arena, limo y arcilla. Los porcentajes de arcilla fueron de 18.33 % en el bosque y 17.5 % en el matorral, lo cual indica una capacidad intermedia de retención de agua y nutrientes. Según Acosta (2007), los suelos francos presentan una baja cinética ambiental para los contaminantes debido a su limitado contenido de arcillas finas, las cuales son responsables de una parte importante de la capacidad de adsorción y de intercambio catiónico. En este tipo de suelos, la movilidad de los metales de interés toxicológico (MIT) puede aumentar si no existen otras fracciones estabilizantes, como una alta proporción de materia orgánica o pH alcalino.

Respecto a los parámetros químicos, se observaron diferencias relevantes entre ambas zonas. En la zona de matorral se registró un pH cercano a la neutralidad ( $7.29 \pm 0.802$ ), mientras que en la zona

de bosque se observaron condiciones marcadamente ácidas ( $5.48 \pm 0.802$ ). West Analítica y Servicios S.A. de C.V. (2021) reporta que estos niveles de pH son representativos de los ecosistemas en cuestión, lo que respalda la validez de los resultados obtenidos. Desde una perspectiva ecotoxicológica, estas diferencias de pH tienen implicaciones directas en la movilidad y biodisponibilidad de los MIT. En ambientes ácidos, como el del bosque, los metales tienden a permanecer en formas iónicas solubles, lo que incrementa su disponibilidad para las plantas y su potencial para ser lixiviados hacia las capas más profundas del suelo o incluso alcanzar los cuerpos de agua subterráneos (Castellanos, 2000). En contraste, en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, como las del matorral, los metales pesados tienden a formar complejos menos móviles o a precipitarse, lo que limita su movilidad, pero no necesariamente reduce su persistencia a largo plazo.

En conjunto, la caracterización fisicoquímica del suelo sugiere que, si bien ambas zonas presentan una textura semejante y un contenido medio de materia orgánica, las diferencias en el pH podrían generar contrastes importantes en la dinámica ambiental de los MIT, especialmente en su movilidad, biodisponibilidad y riesgo potencial de transferencia hacia los organismos del ecosistema.

## 5. Conclusiones del capítulo

1. Se identificó la presencia de tres metales de interés toxicológico (MIT): cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg), en las muestras de suelo de las zonas de bosque y matorral. Aunque sus concentraciones se encontraron por debajo de los límites establecidos por la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004, sin embargo, su presencia indica un potencial riesgo ecológico que justifica una evaluación más detallada.
2. Los indicadores individuales de riesgo ecológico (Er) reflejaron un nivel de "riesgo bajo a medio", atribuible a las bajas concentraciones detectadas. No obstante, el Índice de Riesgo Ecológico Acumulativo (ERI) sugiere que la toxicidad conjunta de los MIT podría representar un riesgo significativo a largo plazo.
3. Las características fisicoquímicas del suelo en la zona de bosque, como el pH ácido y el contenido de materia orgánica, podrían favorecer la movilidad y biodisponibilidad de los MIT. Esta condición incrementa su potencial de absorción por las plantas y su transporte hacia cuerpos de agua subterráneos.
4. En contraste, los parámetros fisicoquímicos en la zona de matorral indican una menor movilidad de los contaminantes. Sin embargo, la persistencia de los metales en el ambiente resalta la necesidad de establecer programas de monitoreo continuo, debido a los posibles efectos acumulativos sobre los organismos expuestos.
5. En conjunto, los resultados sugieren que, si bien las concentraciones actuales no representan un riesgo inmediato, la persistencia, bioacumulación y biomagnificación de los MIT justifican la implementación de estrategias de vigilancia ambiental y evaluación de riesgos ecológicos para prevenir impactos crónicos en los ecosistemas locales.

## **CAPITULO II: EVALUACIÓN DE LA VULNERABILIDAD, LA EXPOSICIÓN Y EL RIESGO ECOTOXICOLÓGICO DE *Crotalus aquilus***

### **1. Introducción**

La presencia de contaminantes como los MIT en un determinado ecosistema supone una situación de riesgo ecológico, dadas las características toxicológicas de estos contaminantes antes mencionadas. De acuerdo a la metodología sugerida por Kaifer et al, (2004), en la guía de análisis de riesgos para la salud humana y los ecosistemas, una vez establecido dicho riesgo ecológico mediante la química analítica de la matriz y el análisis de indicadores de riesgo, es preciso evaluar la vulnerabilidad, la exposición y el riesgo ecotoxicológico de las poblaciones afectadas, en este caso, de las poblaciones de *C. aquilus*.

El término “Evaluación de riesgos” se refiere al uso de datos existentes para definir la probabilidad de que se presenten efectos potencialmente adversos a la salud de la población evaluada ante una exposición a alguna agente estresor ambiental (Kaifer et al, 2004; Reyes y Almeida, 1992). Estas metodologías son herramientas que permiten al evaluador, estimar el riesgo ante una situación de exposición a algún agente químico peligroso (AQP) como son los MIT, a partir de la evaluación de indicadores de riesgo a la salud, de exposición y de vulnerabilidad, establecidos por las agencias sanitarias (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; Gaytán-Oyarzun y López-Herrera, 2019).

EL protocolo recomendado por la ATSDR (2005), el CEPIS/OPS (2005) sugiere la selección de indicadores sustentados en cálculos matemáticos o clasificaciones, de manera preferentes, ya que esto evita ambigüedades en la interpretación de los resultados (Gaytán-Oyarzun y López-Herrera, 2019; Gaytán-Oyarzun et al., 2020; Quiterio-Pérez, 2012; Rodríguez-Anaya et al., 2014).

Generalmente, las evaluaciones de riesgo a la salud se aplican a poblaciones humanas. Sin embargo, de acuerdo con el Ministerio de Medio Ambiente, (2018), en la guía de lineamientos metodológicos para la evaluación de riesgos ecotoxicológicos, también es posible estimar los posibles daños a la salud en receptores no humanos. Esto puede realizarse de manera directa, mediante la medición de concentraciones internas de contaminantes en tejidos o fluidos de la población en estudio; o bien de forma indirecta, a través de indicadores que permitan estimar dicho riesgo, siempre y cuando se disponga de información suficiente sobre la población involucrada.

## 2. Material y métodos

### 2.1 Obtención de datos ecológicos y morfológicos de *C. aquilus*

Se realizó una búsqueda bibliográfica estratificada y dirigida, sobre trabajos referentes a la ecología y morfología de *C. aquilus*, con lo cual se pudieran obtener datos que permitieran estimar la tasa de ingesta, peso promedio de adultos y sub-adultos, así como el promedio de vida, con el fin de poder evaluar la exposición y vulnerabilidad de estos animales hacia los MIT detectados.

Para la determinación de estos parámetros, se consideraron todos los trabajos realizados con *Crotalus aquilus* en los que se describieran aspectos como su tipo de dieta, longevidad, hábitos y medidas morfométricas. En caso de que la información recopilada resultara insuficiente o no estuviera disponible, se utilizaron como referencia los datos reportados para otras especies de serpientes pertenecientes a las familias Viperidae, Colubridae y Natricidae, con el propósito de obtener información del mismo nivel taxonómico (Orden: Serpentes) y de ejemplares cuyas características morfométricas fueran comparables a las de *C. aquilus*.

Se emplearon los motores de búsqueda: Springer Link, Scopus, Scielo y Google académico; utilizando las palabras claves: *Crotalus aquilus*, *Crotalus*, Dieta, Ecología, Viperidae, Serpientes, Squamata; sin restricción en los años. También se recurrió a la consulta de fuentes bibliográficas descriptivas de la especie (Campbell y Lamar 2004; Heimes, 2016; Klauber, 1982).

### 2.3 Evaluación de la vulnerabilidad y del riesgo de exposición

En esta dimensión, se evalúan factores como el tiempo y el contacto, ya sea directo o indirecto de un sector determinado que se encuentre expuesto ante un AQP, con el fin de determinar si el grado de la exposición presenta un riesgo significativo, contemplando la probabilidad de exposición, biodisponibilidad de los contaminantes, subpoblaciones más susceptibles; que, en los organismos de vida silvestre se refiere a sus etapas críticas (etapas larvarias, huevos y crías), o también a si están o no en un estatus de protección (Ministerio de Medio Ambiente, 2018; Sánchez-Olivares, 2021).

Para evaluar la vulnerabilidad de una población silvestre, ante un escenario de exposición a algún agente químico peligroso (AQP), en este caso los MIT, se diseñó un indicador que considerará el estatus de protección (Ep) de la especie a evaluar, su vagilidad relativa (Vr) y su periodo de vida

vs el tiempo de vida del contaminante o tiempo de exposición (TdE), a este indicador se le asignó el nombre de índice de vulnerabilidad (IdV).

Para su evaluación, a cada variable se le asignó una ponderación numérica para su interpretación individual, posteriormente, estas ponderaciones fueron sumadas para conocer el IdV mediante la siguiente ecuación:

$$IdV = \sum Ep Vr TdE$$

Donde:

*Ep* = Estatus de protección de la especie estudiada

*Vr* = Vagilidad relativa de la especie

*TdE* = Tiempo de exposición

Este indicador se diseñó con base en las propuestas de Gaytán-Oyarzun et al. (2012), MINAM (2015), Peña et al. (2001) y Quiterio-Pérez et al. (2012).

La variable *Ep* (estatus de protección) se diseñó con base en las categorías de riesgo de la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo), a excepción de la categoría E (probablemente extinto en el medio silvestre).

De acuerdo con las categorías de riesgo de la NOM-059-SEMARNAT-2010, se consideraron las siguientes ponderaciones numéricas:

- |    |   |   |
|----|---|---|
| a) | Alta vulnerabilidad, si el estatus de la especie es P (en peligro de extinción) =       | 4 |
| b) | Media vulnerabilidad, si el estatus de la especie es A (amenazada) =                    | 3 |
| c) | Baja vulnerabilidad, si el estatus de la especie es Pr (sujeta a protección especial) = | 2 |
| d) | Vulnerabilidad desconocida, si la especie no está considerada en la norma =             | 1 |

Posteriormente, se construyó una clasificación de cuatro niveles que determina, de manera relativa, la vagilidad de una especie (capacidad de desplazamiento), con base en reportes científicos. Esta clasificación considera mayormente vulnerables a las especies con poca vagilidad, pues esta característica puede supeditar largos periodos de exposición a algún Agente químico peligroso (AQP).

Se considerará una especie restringida si se reportan desplazamientos  $\leq 10$  km a la redonda; una especie limitada si se reportan desplazamientos de  $> 10$  km a la redonda, pero  $< 100$  km y una especie libre si sus desplazamientos se reportan a más de 100 km a la redonda.

Con base en la clasificación anterior, se considerará la siguiente ponderación numérica:

- a) Especie restringida = 4
- b) Especie limitada = 3
- c) Especie libre = 2
- d) Vagilidad desconocida = 1

La siguiente variable compara el periodo de vida de la población con el tiempo de vida media los contaminantes en el suelo (TMs) al ser mayor el TMs que el promedio de vida de la especie, se determinó un periodo de exposición crónica, otorgando el valor más alto en la ponderación de 4 niveles.

Los valores obtenidos de las ponderaciones de las variables anteriores fueron sumados para evaluar la vulnerabilidad de la especie y la cual se denomina como Índice de vulnerabilidad (IdV). Para la interpretación de los resultados, se considerará una alta vulnerabilidad si el IdV se encuentra entre 9 y 7, media vulnerabilidad si el IdV se encuentra entre 6 y 4 y baja vulnerabilidad si el IdV es de 3 o menos.

Se evaluó también el Riesgo de exposición indirecta mediante la dieta (EID). La cual se determinó a través del número de especies que formen parte de la dieta de la especie a evaluar y que, además, estén presentes o asociadas a la matriz en la que se ha identificado la presencia del contaminante. A mayor número de especies asociadas a la dieta, mayor será la probabilidad de una exposición indirecta (Delgadillo-Ubaldo y Longar-Blanco, 2008).

Para la interpretación de los resultados, se considera una alta exposición indirecta, si se reportan más de 5 especies, exposición indirecta media si se reportan entre 4 y 3 especies y exposición indirecta baja si se reportan entre 2 y 1 especies (Delgadillo-Ubaldo y Longar-Blanco, 2008).

Para evaluar el Riesgo de exposición (Rexp) por la biodisponibilidad de los contaminantes, se evaluó el Coeficiente de partición octanol/agua ( $\text{Log}_{\text{Kow}}$ ). Este parámetro determina una cualidad inherente de un contaminante en particular y sirve como indicador de la afinidad que dichos

contaminantes poseen por los lípidos y, por ende, su tasa de penetración a través de las membranas biológicas (biodisponibilidad). En el entendido que los compuestos más liposolubles atraviesan mejor las membranas biológicas (Delgado-Mota, 2014). Los  $\text{Log}_{\text{Kow}}$  son valores reportados en fichas toxicológicas de los contaminantes a evaluar, por lo que no necesitan ser calculados.

Se considera un  $\text{R}_{\text{exp}}$  alto si el  $\text{Log}_{\text{Kow}} > 4$ ,  $\text{R}_{\text{exp}}$  medio si el  $\text{Log}_{\text{Kow}}$  se encuentra entre 3 – 4 y  $\text{R}_{\text{exp}}$  bajo si el  $\text{Log}_{\text{Kow}}$  se encuentra entre 2 – 0 (Delgado-Mota, 2014).

## 2.2 Evaluación del riesgo ecotoxicológico

En este rubro se evalúa la posibilidad de la manifestación de efectos adversos en la biota local expuesta a matrices ambientales contaminadas, a través de la evaluación de distintos indicadores (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005).

Se evaluó el Riesgo Ecotoxicológico (RE), el cual permite estimar el riesgo potencial que un contaminante representa para la biota local expuesta a concentraciones específicas en el ambiente. Su cálculo se basa en la relación entre la concentración predictiva de exposición (PEC) y la concentración predictiva sin efecto (PNEC). Este índice es adimensional, ya que resulta de la razón entre dos concentraciones expresadas en las mismas unidades (por ejemplo, mg/kg); al tratarse de magnitudes de igual naturaleza, las unidades se cancelan. Esta propiedad facilita la comparación de resultados entre distintos sitios, metales o estudios, incluso cuando se emplean diferentes escalas o unidades. Además, permite clasificar los niveles de riesgo ecotoxicológico en categorías cualitativas (bajo, moderado, alto), lo que simplifica su interpretación y comunicación en contextos de gestión ambiental.

El cálculo de RE se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$RE = PEC / PNEC$$

Dónde:

RE = Riesgo ecotoxicológico

PEC = Concentración predictiva de exposición (debe ser calculada)

PNEC = Concentración predictiva sin efectos (debe calcularse)

La relación entre estas dos variables (PEC/PNEC) permite identificar si existe un riesgo ecotoxicológico significativo:

Cuando  $PEC \leq PNEC$ : Se considera que el riesgo ecotoxicológico (RE) es aceptable y los contaminantes están en niveles de bajo riesgo para la biota local, debido a que la simple presencia de los MIT representa un riesgo (Kaifer et al., 2004).

Cuando  $PEC > PNEC$ : Indica un riesgo ecotoxicológico (RE) inaceptable, lo que sugiere que las concentraciones de contaminantes en el ambiente superan los niveles considerados seguros para los organismos expuestos (Kaifer et al., 2004).

Un riesgo elevado se establece cuando la relación entre PEC y PNEC es superior a 1, si la relación es menor o igual a 1, se concluye que el RE es bajo o aceptable, dependiendo de la incertidumbre de los datos utilizados en el análisis (Kaifer et al., 2004; Lema et al., 2010).

- Para ello se determinó de manera previa la Concentración predictiva de exposición (PEC): Calculada para escenarios ecológicos locales en función de la concentración ambiental de los contaminantes ( $C_{EXP}$ ) y la tasa de ingesta de los organismos (TI). Se utiliza la siguiente ecuación:

$$PEC = \frac{C_{EXP} \times TI}{PCo}$$

Donde:

PEC = Concentración predictiva de exposición (mg/Kg)

$C_{EXP}$  = Concentración del contaminante en el ambiente (mg/Kg)

Ti = Tasa de ingesta del organismo (mg/día)

PCo = Peso corporal promedio de los organismos expuestos (Kg)

Por sí solo, la PEC se puede considerar como otro indicador más para evaluar el riesgo ecotoxicológico, pues esta representa la magnitud del efecto biológico esperado en función a la exposición crónica a un contaminante, mediante la ingesta de alimentos potencialmente contaminados y se expresa en unidades de masa de contaminante expuesta por unidad de masa corporal y día, de modo que, mientras más alto sea la PEC, la probabilidad de observar un efecto negativo asociado a esa exposición es mayor (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; 2017; Kazemi et al., 2022).

Para la interpretación de los resultados del cálculo de la PEC, los autores consideran un riesgo ecotoxicológico alto si la PEC es  $\geq n \times 10^{-3}$  mg/kg/día; un riesgo medio si la PEC se encuentra

entre los valores de  $n \times 10^{-4}$  mg/kg/día y  $n \times 10^{-5}$  mg/kg/día y un riesgo bajo si la PEC es  $\leq n \times 10^{-6}$  mg/kg/día (ATSDR, 2005; CEPIS/OPS, 2005; 2017; Kazemi et al., 2022).

- Así mismo, también se determinó de manera previa la Concentración predictiva sin efecto (PNEC). Este valor calculado representa la concentración del contaminante por debajo de la cual no se esperan efectos tóxicos en la biota (Kaifer et al., 2004). Se calcula a partir de datos toxicológicos previos (como el NOAEL, RfD o nivel sin efecto observable) y aplicando el factor de incertidumbre MF (Kaifer et al., 2004; Lema et al., 2010). La ecuación original para el cálculo de la PNEC es la siguiente:

$$PNEC = RfD / FI$$

Donde:

PNEC = Concentración predictiva sin efectos (mg/Kg)

RfD = Dosis de referencia (mg/Kg)

FI = Factores de incertidumbre sugeridos por Lema et al. (2010), para el cálculo en evaluaciones de riesgo.

Dado que no se reporta una RfD para esta especie de reptiles en las bases de datos de la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR) y del Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente/Organización Panamericana de la Salud (CEPIS/OPS) encontrándose reportadas solo para salud humana y para animales de experimentación; por lo tanto, se requirió en el presente trabajo estimar la RfD para esta especie.

Para ello, se siguió lo propuesto por Lema et al. (2010), dividiendo la RfD humana por los factores de incertidumbre designados por la USEPA para este tipo de extrapolación. Estos factores de incertidumbre son valores numéricos que permiten compensar las diferencias entre especies y otros aspectos desconocidos en la extrapolación, asegurando que la RfD estimada sea adecuada para la especie en estudio (Lema et al., 2010).

Entre los factores de incertidumbre, los autores destacan el factor UF<sub>h</sub>, utilizado para la extrapolación de datos de animales a humanos y al que se le asigna un valor constante de 10 (Lema et al., 2010). También se emplea el factor MF cuando la evidencia resulta insuficiente o conflictiva; a este se le asigna un valor entre 1 y 10, basado en el juicio subjetivo del investigador sobre la evidencia disponible, donde 1 indica la menor incertidumbre y 10 la mayor (Lema et al., 2010).

Dado que los datos sobre la esperanza de vida, peso promedio y consumo alimenticio de las serpientes se estimaron a partir de estudios realizados con la especie en cuestión y con otras especies de serpientes, en el presente trabajo se asignó un valor de 5 al factor MF, reflejando la escasez de datos puntuales sobre la especie.

Cuando se utilizan más de un factor de incertidumbre, estos se multiplican entre sí, para posteriormente dividir la RfD conocidas para humanos entre el valor obtenido, tal como se muestra en la siguiente ecuación (Lema et al., 2010):

$$PNEC = RfD / (UFh \times MF)$$

Donde:

PNEC = Concentración predictiva sin efecto

RfD = Dosis de referencia (mg/Kg) calculadas para humanos, disponibles en las bases de datos ATSDR, CEPIS/OPS

UFh = Factor de incertidumbre que se considera para la extrapolación de datos entre especies (Lema et al., 2010)

MF = Factor de incertidumbre que se considera cuando la evidencia no es suficiente o resulta conflictiva (Lema et al., 2010)

De acuerdo con las agencias sanitarias ATSDR (2005), CEPIS/OPS (2005) y la Oficina de Evaluación de Riesgo a la Salud de California (OEHHA), en caso de la presencia de más de un contaminante o xenobiótico de interés toxicológico como es el caso del presente trabajo donde se encontró Cd, Pb y Hg, se calcula el Índice acumulativo de riesgo ecotoxicológico (HI), el cual es la suma del riesgo ecotoxicológico calculado para cada MIT (ATSDR, 2005; García-Reynoso et al., 2007).

$$HI = \sum RE_i$$

Para la interpretación de resultados, los autores consideran un riesgo ecotoxicológico alto si el HI es  $\geq 4$ ; un riesgo ecotoxicológico medio si el HI está entre los valores 1–3 y un riesgo ecotoxicológico bajo si el HI es  $\leq 1$  (ATSDR, 2005; García-Reynoso et al., 2007).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Obtención de datos ecológicos y morfológicos de *C. aquilus*.

Se llevó a cabo una revisión exhaustiva y sistemática de la literatura existente sobre la ecología y morfología de *Crotalus aquilus*, que incluyó un total de 14 fuentes entre el 2004 a la fecha, tales como siete libros, dos tesis, una nota científica y cuatro artículos académicos. Esta búsqueda permitió recopilar datos relevantes sobre la dieta, longevidad, hábitos y características morfométricas de la especie, elementos fundamentales para estimar la tasa de ingesta, el peso promedio de adultos y sub-adultos, así como el promedio de vida (tabla 7). Los promedios estimados a partir de esta revisión servirán como base para los cálculos de indicadores relacionados con la vulnerabilidad, la exposición y el riesgo ecotoxicológico de las serpientes.

Tabla 7 Parámetros ecológicos de *C. aquilus* estimados con base en la bibliografía disponible.

Parámetro	$\bar{x} \pm S$	Rango basado en fuentes	Fuentes
Longevidad	$25.16 \pm 6.24$	19 - 35	(Martínez, 2017; Sutton y Harmon, 2001)
Peso en adultos y sub-adultos	$72.77 \pm 33.68$	31 - 176	(Mociño-Deloya, 2015; Mociño-Deloya et al., 2014)
Consumo alimenticio	$3.96 \pm 2.18$	N/A	(Arnaud, 2015; Campbell y Lamar, 2004; SEMARNAT, 2018; Fernández-Badillo et al., 2011; 2012; 2017; Lazcano et al., 2009; Mociño-Deloya, 2015; Mociño-Deloya et al., 2008; 2014; Ramírez-Bautista, 2009; 2014).

Longevidad (años), peso (g) y consumo alimenticio (g/día).

Particularmente, para poder determinar su tasa de ingesta (TI), fue necesario profundizar más en lo reportado por Mociño-Deloya (2015), pues su trabajo fue el más descriptivo respecto a la dieta de la especie. A partir de ahí, se consultaron diferentes fuentes bibliográficas (Hernández-Flores y Rojas-Martínez, 2010; Olvera-Olvera et al., 2021) para cotejar la lista de especies reportadas por Mociño-Deloya (2015) con la biodiversidad propia de las zonas de estudio, de modo que se contó con un sustento bibliográfico sobre la presencia de las presas potenciales de *C. aquilus* en las zonas

de interés. Fue entonces que, a partir de esta investigación, se estimaron los pesos promedios de las presas reportadas de *C. aquilus* (Tabla 8).

Tabla 8 Pesos promedio de presas (g) y tasa de ingesta (TI) estimada para *C. aquilus* (g/día).

<b>Presa</b>	<b>Peso promedio</b>	<b>Fuente</b>
<b>Reptiles</b>		
<i>Barisia imbricata</i>	24	(Brito, 2014)
<i>Sceloporus spp.</i>	20.1	(Álvarez et al., 2016)
<i>Thamnophis spp.</i>	15.1	(Luja et al., 2013)
<i>Pituophis deppei</i>	54.80	(Borrayo 1990)
<i>Crotalus aquilus</i>	32.91	(Lazcano et al., 2009)
<b>Mamíferos</b>		
<i>Sylvilagus spp</i>	50.17	(Martínez, 2015)
<i>Microtus mexicanus</i>	24.25	(Hernández-Flores, 2010)
<i>Baiomys taylori</i>	7.75	(Garduño, 2005)
<i>Peromyscus maniculatus</i>	24.55	(Garduño, 2005)
<i>Reithrodontomys spp</i>	24.61	(Velásquez, 2019)
<b>Aves</b>		
<i>Tachycineta spp</i>	17.84	(Liljestrom, 2011)
<i>Empidonax fulvifrons</i>	13.03	(William y Russell, 1953)
<i>Cyrtonyx montezumae</i>	51.56	(López, 2015)
<b>TI</b>	<b>3.96 ± 2.18</b>	

Al no contar con un reporte sobre la frecuencia alimenticia de serpientes en estado silvestre, se consideró la frecuencia de alimentación de serpientes en condiciones experimentales en cautiverio,

posteriormente, se realizó el cálculo del promedio de consumo por semana, basados en lo reportado por Lazcano et al. (2009).

En la actualidad, continúan siendo escasos los trabajos en donde se describan, de manera detallada, diversos aspectos ecológicos de las serpientes mexicanas; esta situación complica en gran medida la aplicación de metodologías basadas en la recopilación de información bibliográfica, como es el caso de las evaluaciones de riesgos. Particularmente para el caso de las serpientes del género *Crotalus*, pese a ser importantes miembros de la fauna de los ecosistemas mexicanos, la información respecto a la ecología de muchas especies continúa siendo insuficiente y poco detallada (Mociño-Deloya et al., 2015).

De acuerdo con lo reportado por Mociño-Deloya et al. (2014), la mayoría de las publicaciones relacionadas particularmente a la dieta de muchas serpientes de cascabel mexicanas, están limitadas por un pequeño conjunto de datos, basados únicamente en avistamientos breves o antecedentes aislados, así como conjeturas realizadas por los académicos y anécdotas reportadas ya sea por los propios investigadores o incluso por los habitantes de las zonas donde se distribuyen estos animales, sin estar sustentados por estudios sistemáticos.

Para el caso particular de *C. aquilus* la información encontrada respecto a sus hábitos alimenticios y otras cuestiones ecológicas, no fue más completa que para otras serpientes, situación que concuerda con lo reportado anteriormente por Mociño-Deloya et al. (2014) y Mociño-Deloya et al. (2015) quienes mencionan que, para el caso particular de las serpientes de cascabel de montaña, como *C. aquilus*; la información ecológica es escasa.

No obstante, las estimaciones realizadas para *C. aquilus* se determinaron con base en el criterio de Lema et al. (2010), quienes mencionaban que, en la aplicación de las evaluaciones de riesgo ecotoxicológico y/o a la salud; si los datos son insuficientes, los datos con los que se cuente deben considerarse como válidos, pues en este tipo de evaluaciones, es preferible sobreestimar el riesgo y no subestimarlos.

### 3.2 Evaluación de la vulnerabilidad, el riesgo de exposición y el riesgo ecotoxicológico de *C. aquilus*

Se presentan los resultados de los cálculos correspondientes al índice de vulnerabilidad (IdV), la exposición indirecta mediante la dieta (EID), el coeficiente de partición octanol/agua (LogKow), el índice de riesgo ecotoxicológico (RE), la concentración predictiva de exposición (PEC) para cada uno de los metales evaluados en las poblaciones de *C. aquilus* de ambas zonas, así como el índice acumulativo de riesgo ecotoxicológico (HI), debido a en caso de la presencia de más de un contaminante o xenobiótico de interés toxicológico. Estos cálculos se realizaron utilizando las concentraciones de MIT detectados en el suelo en el presente trabajo en ambas zonas de estudio y en la ingesta estimada de presa, lo que permite una evaluación integral del riesgo potencial asociado a la exposición a metales pesados (Tabla 9).

Tabla 9 Evaluación de los indicadores de vulnerabilidad, exposición y riesgo ecotoxicológico de *C. aquilus* por exposición a metales de interés toxicológico (MIT) en dos zonas de la Comarca Minera, Hgo.

MIT	IdV	EID	LogKow	PEC (mg/Kg)		PNEC (mg/Kg)	RE	
				Bosque	Matorral		Bosque	Matorral
Cd			0.021	0.181	0.031	0.00002	*9387.11	1578.12
Hg	*7	*13	*5.95	*0.002	0.439	0.000006	453.48	*73101.55
Pb			0.017	2.957	1.776	0.00007	*42243.93	*25374.34
<b>HI</b>							*52084.53	*100054.02

\*Valore significativos. Índice de vulnerabilidad (IdV): Alto si  $\text{IdV} \geq 4$ ; Exposición indirecta (EID): Alta si  $\text{EID} > 5$  especies; Riesgo de exposición (LogKow): Alto si  $\text{LogKow} > 4$ ; Concentración predictiva de exposición (PEC): Alta si  $\text{PEC} \geq n \times 10^{-3} \text{ mg/kg/día}$ . Riesgo ecotoxicológico (RE): Alto si  $\text{RE} \geq 20$ ; Índice de riesgo ecotoxicológico acumulativo (HI): Alto si  $\text{HI} \geq 4$ .

En la tabla 9, se puede observar que la vulnerabilidad de *C. aquilus* frente a un escenario de exposición se clasifico como "alta" de acuerdo a los criterios establecidos con base en los autores Gaytán-Oyarzun et al. (2012), MINAM (2015), Peña et al. (2001) y Quiterio-Pérez et al. (2012), dado que el valor total ponderado de las variables de interés fue de 7.

El IdV elevado se debe a la limitada vagilidad de la especie (valor de 3) y a la discrepancia entre la vida media de los contaminantes en el suelo y el tiempo de vida de la serpiente (valor de 3), lo que indica que los organismos estarán potencialmente expuestos durante la mayor parte de su vida.

Así mismo, como depredador de segundo y tercer grado, *C. aquilus* consume múltiples especies que pueden estar contaminadas, lo que incrementa la probabilidad de exposición indirecta, especialmente por biomagnificación a través de la dieta (Delgadillo-Ubaldo y Longar-Blanco, 2008).

Otro factor importante a considerar en las evaluaciones de riesgos aplicadas a poblaciones silvestres, es el rol ecológico del taxón de estudio, es decir, conocer qué papel tiene dentro de la red trófica, pues aquellos taxones que se encuentren en niveles altos de la red alimenticia, podrán verse en una situación de exposición indirecta por el consumo de presas contaminadas. De esta forma y con base en el trabajo de Mociño-Deloya 2015, se determinaron más de 10 especies comestibles para *C. aquilus* lo cual corrobora su estatus de depredador de segundo y tercer grado en su ecosistema, debido a esto, su exposición indirecta hacia los contaminantes se considera alta.

El coeficiente de partición octanol/agua (LogKow) es un parámetro crucial para entender la biodisponibilidad de los contaminantes en organismos vivos (Delgado-Mota, 2014). En este estudio (Tabla 9), los valores de LogKow para Cd y Pb, indican una baja biodisponibilidad (Cd: 0.021, Pb: 0.017), mientras que el Hg mostró un valor elevado (5.95), lo que sugiere una alta afinidad por lípidos y, por lo tanto, una mayor biodisponibilidad. Estos resultados son consistentes con lo esperado para estos compuestos y refuerzan el potencial riesgo de exposición (Delgado-Mota, 2014).

En cuanto al RE es un valor calculado para poblaciones silvestres en condiciones de exposición a algún contaminante (Tabla 9), fueron determinados con base a los valores de referencia (RfD) ajustados mediante un factor de incertidumbre UFh, de acuerdo a la ATSDR, (2005) y al CEPIS/OPS, (2005). Sin embargo, en este trabajo se aplicó también el factor de incertidumbre MF debido a la falta de información puntual sobre la ecología de la especie, estrategia propuesta por Lema et al. (2010), para ajustar la RfD calculada para humanos y hacerla aplicable a especies silvestres sin que ello implique restricciones en la evaluación para serpientes. Según Lema et al. (2010), estos factores tienen validez suficiente para la estimación de riesgos en organismos no humanos.

De acuerdo a lo anterior, en la Tabla 9 se puede observar, que todos los valores calculados de RE en la zona de bosque, superan ampliamente el umbral de  $RE \geq 20$ , lo que indica un alto riesgo para la salud de las serpientes en esta zona, siendo el Pb y el Cd los MIT de mayor riesgo. De igual forma, en la zona de matorral los RE calculados fueron mayores al valor umbral, mostrando al Pb y el Hg como los elementos de mayor riesgo en la zona. Estos resultados confirman un riesgo elevado asociado a cada uno de los metales evaluados en ambas zonas, siendo el Pb el MIT con mayor riesgo en los dos ecosistemas.

El Índice de riesgo ecotoxicológico acumulativo (HI), que se obtiene sumando los RE de los contaminantes que afectan al mismo órgano, sistema o mecanismo de acción (García-Reynoso et al., 2007), resultó muy alto en ambas zonas (Tabla 9): Bosque con un valor calculado de 52084.53 y Matorral con un valor de 100054.03. Este elevado valor de HI, basado la presencia simultánea de múltiples contaminantes, refleja la peligrosidad acumulada de estos y refuerza el alto riesgo potencialmente acumulativo de exposición para *C. aquilus*.

Por otro lado, la concentración predictiva de exposición (PEC), la cual refleja la magnitud del efecto biológico esperado en función de una exposición crónica a contaminantes a través de la ingesta de presas potencialmente contaminadas, presentó los siguientes valores: Zona de bosque: Cd: 0.181 mg/kg/día, Hg: 0.002 mg/kg/día, Pb: 2.957 mg/kg/día; Zona de matorral: Cd: 0.031 mg/kg/día, Hg: 0.439 mg/kg/día, Pb: 1.776 mg/kg/día (Tabla 9).

Estos valores fueron calculados con base en la revisión bibliográfica sobre la ecología trófica y morfología de *Crotalus aquilus*, a partir de la cual se estimaron parámetros fundamentales como el peso promedio de los organismos, su longevidad y la tasa de ingesta (TI). Dicha revisión incluyó literatura especializada y trabajos comparativos con especies cercanas del mismo orden taxonómico (Serpentes), lo que permitió sustentar adecuadamente los escenarios de exposición analizados.

En este contexto, el uso de la PEC constituye un indicador derivado de variables ecológicas específicas de la especie, permitiendo evaluar de manera más realista el riesgo toxicológico al que están expuestas estas serpientes en su entorno natural. Según los criterios de interpretación de la PEC, se considera un riesgo ecotoxicológico alto cuando el valor es igual o superior a  $n \times 10^{-3}$  mg/kg/día. Bajo este enfoque, la elevada PEC de Pb en ambas zonas sugiere un riesgo potencialmente alto para *C. aquilus*, mientras que las PEC de Cd y Hg, aunque menores, adquieren

relevancia al analizarse en conjunto con los valores de riesgo ecotoxicológico (RE) e índice de riesgo (HI), reforzando así la preocupación sobre los efectos crónicos derivados de la exposición acumulativa a estos metales.

La evaluación del Riesgo Ecológico (RE), calculado como la razón entre la PEC y PNEC, permiten estimar el potencial de daño que estos contaminantes representan para la biota local. Cabe destacar que un RE superior a 1 indica que la concentración ambiental del contaminante excede los niveles considerados seguros, siendo preocupante cuando esta relación es varias órdenes de magnitud mayor.

En ambos hábitats, los valores de RE para Cd son extremadamente altos, lo que evidencia que la exposición a Cd supera ampliamente el umbral sin efectos tóxicos. En el bosque, la PEC es 9 387 862 500 veces mayor (órdenes de magnitud) que la PNEC, mientras que en el matorral la relación es de 1 578 veces. Dichos resultados indican un riesgo ecotoxicológico elevado para la biota, lo que concuerda con estudios previos que han documentado efectos subletales y genotóxicos de este metal en reptiles; además de que se espera una disminución de la biodiversidad en suelos y cuerpos de agua contaminados, alteración de las redes tróficas y el equilibrio ecológico; y posiblemente una reducción de la productividad de ecosistemas agrícolas y naturales (Baker y Brooks, 1989; Hopkins et al., 2002; Burger y Gochfeld, 2005).

Para el Hg, se observa que, aún en la zona de bosque donde la PEC es relativamente baja comparada con los otros elementos y sitios de estudio, donde el RE alcanza 453 órdenes de magnitud reflejando que incluso concentraciones modestas pueden representar un riesgo significativo. En contraste, en el matorral la razón se dispara por arriba de los 73 101 órdenes de magnitud, indicando un riesgo inaceptable para la salud de la biota sobre todo en la zona de matorral, donde los factores fisicoquímicos favorecieron su acumulación ambiental. Diversos estudios han evidenciado que el mercurio puede afectar la neurobiología y el comportamiento en reptiles, comprometiendo su supervivencia y éxito reproductivo (Burger y Gochfeld, 2005; Vásquez et al., 2015), sin olvidar que es uno de los elementos más tóxicos en el ambiente, por lo que se espera, que en animales acuáticos se pueda acumular afectando el sistema nervioso, la reproducción, el comportamiento y el desarrollo embrionario y transmitirlo a través de la cadena alimentaria, mientras que otros organismos como aves y mamíferos (incluyendo humanos), se espera daño neurológico severo, especialmente

en fetos y crías, efectos en el comportamiento, la reproducción y la supervivencia, con una lata transferencia de madres a crías (vía placenta o leche) (Clarkson, 1997).

En el caso del Pb, tanto en el bosque como en el matorral se detectaron concentraciones de PEC que superan por varios órdenes de magnitud la PNEC, siendo los valores más altos de los tres MIT evaluados. En el bosque, la relación PEC/PNEC está arriba de los 42 244 órdenes de magnitud y en el matorral por encima 25 374 órdenes de magnitud. Estos niveles de exposición podrían favorecer la toxicidad acumulativa, manifestando genotoxicidad en la fauna local (Echeverría et al., 2016).

Este análisis revela que, aunque en algunos casos la PEC en zona de matorral es menor que en bosque (como sucede con Cd y Pb), la proporción con la PNEC sigue siendo desmesurada en ambos ecosistemas. Esto evidencia un “riesgo ecotoxicológico inaceptable” para las poblaciones de *C. aquilus* en la región de estudio, independientemente del hábitat. Las diferencias entre ambas zonas pueden atribuirse a variaciones en la fuente y distribución de los contaminantes; así como, a propiedades fisicoquímicas del suelo, factores climatológicos y/o situacionales.

La magnitud de los RE calculados (que superan en múltiples órdenes de magnitud el valor crítico de 1), lo que sugiere que las concentraciones de metales pesados se encuentran en niveles extremadamente peligrosos para la salud ecológica, por lo que es necesario profundizar en estudios que correlacionen estos valores con efectos a nivel poblacional y de cadena trófica, a fin de comprender mejor las implicaciones a largo plazo en la biodiversidad local, lo que evidencia un escenario de alta exposición en ambos hábitats, poniendo en riesgo la integridad de la biota local.

Los resultados presentados son consistentes con la literatura existente sobre la toxicidad de metales pesados en reptiles; así como, con la suposición de altas concentraciones de estos en sitios como la comarca minera, en donde la extracción de metales como Au y Ag pueden estar asociados con ala contaminando los suelos aledaños a la actividad. Por ejemplo, estudios en el género *Nerodia* han revelado efectos adversos significativos ante exposiciones crónicas a metales pesados, lo que sugiere que los riesgos observados en *C. aquilus* podrían ser igualmente graves (Hopkins et al., 2002). También, en otras especies de reptiles, se ha documentado que la exposición a cadmio y plomo puede generar daños genotóxicos, reflejando la necesidad de monitoreo continuo de estas especies en ambientes contaminados (Burger y Gochfeld, 2005; Echeverría et al., 2016).

La evaluación de PEC en *C. aquilus* indica que las concentraciones de los tres MIT superan las PNEC, lo que representa un riesgo ecotoxicológico alto principalmente para el Hg seguido del Pb y finalmente del Cd en esta evaluación. Abordar la relación concentración-efecto es fundamental para entender los riesgos que enfrentan estas especies, y contribuir así en su conservación.

Hasta este momento no se contaba bibliográficamente con ninguna evaluación sobre la calidad del ambiente y el impacto potencial que las actividades antropocéntricas pudieran tener sobre la herpetofauna de las zonas de interés. Si bien se cuenta con un antecedente histórico sobre los procesos mineros del sitio de estudio, en general, hay muy pocas evaluaciones sistemáticas sobre la salud de los ecosistemas de la comarca minera en el estado de Hidalgo, y de cómo ésta puede o no afectar a la fauna circundante.

Dentro de los estudios ecotoxicológicos aplicados en la fauna de la Comarca Minera del estado de Hidalgo, destacan algunos trabajos previos realizados principalmente en aves y anfibios (Fonseca, 2018; González-Salazar et al., 2015; Pacheco, 2013) sin embargo, existe una larga lista de organismos que aún siguen sin ser considerados en estas evaluaciones, dentro de los que destacan los reptiles y especialmente las serpientes.

Particularmente para los miembros de este grupo, estos trabajos cobran un sentido mayor, no solo por la importancia ecológica de estos organismos, sino también, porque hasta ahora solo se ha especulado sobre como la contaminación pueda afectar a los miembros de este grupo taxonómico, sin contar, con estudios detallados al respecto, por lo que las estimaciones del riesgo forman parte del primer acercamiento para la realización de investigaciones más detalladas al respecto. Además de que es importante mencionar que existe muy poca información respecto a los efectos negativos de la contaminación química del ambiente hacia las serpientes. Tan solo Campbell y Campbell (2001) y Schneider et al. (2013) indicaron que no existen estudios continuos y sistemáticos con serpientes que determinen las concentraciones a las que estos organismos presentan efectos adversos, por lo que la aplicación de una evaluación de riesgo a la salud es indispensable para tener un punto de partida respecto a esta área.

Finalmente, los resultados obtenidos sobre el riesgo de exposición de *C. aquilus* indican que, aunque se trata de un depredador con una dieta diversa, su exposición a metales tóxicos está influenciada significativamente por su rol dentro de la red trófica por ser un depredador. Los valores elevados de CDI, especialmente para Cd y Pb, son consistentes con estudios previos en

serpientes, que señalan la importancia de la dieta como un factor clave en la acumulación de metales en estos organismos (Burger y Gochfeld, 2016; Campbell y Campbell, 2001; Schneider et al., 2013). Estos resultados subrayan la necesidad de realizar estudios más detallados para evaluar los efectos crónicos de los metales pesados en la salud de las serpientes y su posible impacto a largo plazo en las poblaciones de la región.

#### 4. Conclusiones del capítulo

1. Se identificaron concentraciones de cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) en las zonas de bosque y matorral que superan las dosis de referencia (RfD) establecidas para la protección de la biota. Los valores del Riesgo Ecotoxicológico (RE) y del Índice de Peligrosidad (HI) indicaron un riesgo considerable, especialmente para el mercurio en la zona de matorral, donde se observaron los valores más elevados. Asimismo, el plomo mostró concentraciones persistentemente altas en ambas zonas de estudio. Estos resultados sugieren una alta vulnerabilidad de (*Crotalus aquilus*) frente a la exposición crónica a estos metales en su hábitat natural
2. La posible biodisponibilidad y bioacumulación de estos MIT se fundamenta en los valores de LogKow observados. Además, su posible bioacumulación está respaldada por los valores obtenidos mediante el indicador propuesto de EID (Exposición indirecta de la dieta) lo que indica que la exposición crónica a estos contaminantes podría tener efectos adversos en la salud y fisiología de la especie.
3. La estimación del RE como indicador adimensional basado en la relación PEC/PNEC ofreció un enfoque integral para evaluar el riesgo potencial que implica la exposición a MIT en *C. aquilus*. Este análisis establece las bases para los análisis de los siguientes capítulos, que se centrarán en la evaluación de las concentraciones internas de estos metales en la población de Cascabeles, así como en los posibles efectos genotóxicos.
4. La incorporación de la tasa de ingesta (TI), estimada a partir de los patrones de consumo alimenticio de la especie, permitió calcular la concentración de exposición de forma más realista. Esta propuesta metodológica representa una herramienta innovadora para la evaluación de riesgos en organismos terrestres poco estudiados, como las serpientes, que fungen como bioindicadores ecológicos clave.
5. En conjunto, los hallazgos de este estudio sientan las bases para una evaluación más profunda de los efectos de los MIT en (*C. aquilus*), sustentando la necesidad de analizar diversos tejidos biológicos para cuantificar la acumulación interna de metales y sus posibles efectos genotóxicos. Estos resultados son relevantes para diseñar estrategias de conservación y monitoreo ambiental en hábitats susceptibles a contaminación por metales pesados.

### **CAPITULO III: EVALUACIÓN DE LA BIOACUMULACIÓN DE MIT EN DIFERENTES BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN DE *Crotalus aquilus***

#### **1. Introducción**

Como se mencionó anteriormente, las serpientes constituyen un grupo de vertebrados particularmente vulnerable a la contaminación por metales de interés toxicológico (MIT) (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013), debido a su escasa vagilidad, longevidad, dieta predominantemente carnívora y largos periodos de inactividad. Estas características las hacen propensas a la exposición prolongada, biodisponibilidad, bioacumulación y biomagnificación de los MIT presentes en el ambiente. En consecuencia, la exposición a estos contaminantes puede ser considerablemente prolongada y generar efectos adversos en los distintos niveles tróficos en los que estos organismos participan. (Hopkins, 2000; Quesada et al., 2014). No obstante, pese a su importancia ecológica y su vulnerabilidad ante la contaminación, la información que respecta al área de ecotoxicología en este grupo sigue siendo escasa, ya que, del total de trabajos ecotoxicológicos realizados en vertebrados a nivel mundial, menos del 0.8% corresponde a serpientes (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013).

Gran parte de esta problemática se origina en el hecho de que muchas especies se encuentran bajo algún estatus de amenaza, lo que limita la posibilidad de realizar muestreos directos y compromete la obtención de datos. Esta restricción obliga a los investigadores a trabajar con ejemplares encontrados muertos o, en su defecto, a optar por especies cuyas poblaciones sean abundantes y que no se encuentren en riesgo (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013).

Dada la escasez de trabajos de ecotoxicología en serpientes, algunos investigadores han sugerido la utilización de biomarcadores no letales y poco invasivos que permitan incluir en mayor medida a las serpientes en estudios ecotoxicológicos, sin poner en riesgos a las poblaciones de estudio. La química analítica de fluido y tejidos, es esencial para identificar y cuantificar la presencia de xenobióticos en los organismos de estudio, y con variables espaciales y temporales permiten determinar varios bioindicadores de exposición, biodisponibilidad y/o bioacumulación. Algunos de los fluidos o tejidos utilizados, son denominados biomarcadores de exposición, y dentro de estos hay algunos que son poco invasivos y no letales que se utilizan de manera frecuente en serpientes, como son la sangre, mudas de piel y “tail clips”. Este último se refiere a una porción de cola, de

entre 2 y 3 cm, que se amputa del animal (Burger et al., 2006; 2017; Jones y Holladay, 2006), la obtención de algunas de estas muestras biológicas, conllevan procesos quirúrgicos en los animales, mismos que implican un procedimiento agresivo y estresante; por eso la búsqueda de más biomarcadores de exposición, que sean no letales y poco invasivos que conlleven a una toma de muestra accesible y fácil es una de las prioridades de este tipo de investigaciones.

El cascabel de las serpientes del género *Crotalus*, puede ser una alternativa de estos biomarcadores no letales y poco invasivos al ser una estructura queratinosa sin terminaciones nerviosas y formada por la muda de piel de los organismos, puede ser fácilmente retirado sin ocasionar daño alguno a los animales (Meik y Pires-daSilva, 2009). Además, debido a su composición de queratina, el cascabel presenta un potencial para la acumulación de metales, similar a lo observado en otras especies donde los MIT han sido detectados en estructuras queratinosas como plumas, uñas y pelo (Beyer et al., 1998; González et al., 2016). Estas estructuras queratinosas han demostrado ser efectivas como biomarcadores de exposición a contaminación ambiental por MIT, basado en que la queratina puede bioacumular metales pesados presentes en el entorno (Beyer et al., 1998). El cascabel, que se renueva con cada muda, ofrece una ventaja adicional al permitir la monitorización continua de la bioacumulación de metales a lo largo del tiempo. A diferencia de otros biomarcadores más invasivos, la obtención del cascabel es menos laboriosa y estresante para los animales, lo que lo convierte en una opción viable para estudios ecotoxicológicos en serpientes del género *Crotalus* (Ibarra-Bautista et al., 2021; Meik y Pires-daSilva, 2009).

Por otra parte, el veneno de las serpientes del género *Crotalus*, compuesto en un 90% por proteínas en peso seco, podría constituir un biomarcador adecuado de exposición a metales de interés toxicológico (MIT), de manera similar a lo que se ha documentado en otros tejidos o fluidos biológicos de diversas especies (Borja et al., 2014). Por ejemplo, se ha observado que las plumas de aves y el pelaje de mamíferos pueden acumular metales pesados debido a su composición proteica y estructura. Investigaciones han demostrado que las plumas pueden contener metales como plomo y cadmio, relacionados con la contaminación ambiental (Fonseca, 2018), lo que sugiere que el veneno de las serpientes también podría reflejar niveles de exposición a estos contaminantes. En este sentido, la detección de MIT en el veneno de *Crotalus aquilus* podría proporcionar información valiosa sobre su exposición ambiental y el potencial impacto en la salud de estos organismos. México cuenta con una gran diversidad de serpientes, destacando a las serpientes de cascabel (género *Crotalus*) como uno de los géneros más diversos y cuyas especies

están presentes en casi todos los ecosistemas del territorio nacional, conformando así, un grupo de gran importancia cultural y ecológica para México (Fernández-Badillo et al., 2017). Particularmente en el estado de Hidalgo, el género *Crotalus* es igualmente diverso, pues ahí se distribuyen ocho de las 46 especies de víboras de cascabel del país, abarcando gran parte del estado (Fernández-Badillo et al., 2011; 2017; Uetz y Hoske, 2023).

Dada la gran importancia ecológica que las serpientes de cascabel poseen, la integración de este taxón en estudios ecotoxicológicos es precisa, sin embargo, debido al estatus de protección de varias especies, la consideración de estos animales en estudios ecotoxicológicos requiere de la implementación de metodologías no letales y poco invasivas que permitan la toma de muestras, sin perjudicar a los animales; así como, del trámite de una licencia de recolecta científica, que se ven más fácilmente gestionado, cuando implica poco o nula manipulación de los organismos y poco o nulo daño físico ejercido al tomar una muestra biológica.

Debido a la contaminación generada por la actividad minera en la región, y a la limitada disponibilidad de estudios enfocados en ecotoxicología, resulta pertinente realizar una evaluación ecotoxicológica aplicada a dos poblaciones de *Crotalus aquilus* presentes en la Comarca Minera, Hidalgo. Este estudio prioriza el uso de metodologías no letales y mínimamente invasivas, con el objetivo de validar el uso de un biomarcador no letal previamente reconocido en serpientes como es la muda de piel, así como proponer nuevos biomarcadores potenciales, como el cascabel y el veneno. Estos biomarcadores podrían ser incorporados en el futuro como parte de una metodología específica para estudios ecotoxicológicos en serpientes del género *Crotalus*.

## 2. Material y método

### 2.1 Descripción del taxón de estudio.

*Crotalus aquilus* (Klauber, 1952) es una víbora de cascabel de montaña, endémica de México, de talla mediana, la cual no sobre pasa los 80 cm de longitud (Fernández-Badillo et al., 2017; Heimes, 2016; Uetz y Hoske, 2023). Presenta un patrón de coloración conformado por manchas dorsales con forma cuadrada y/o rectangular, generalmente más oscuras que el resto del cuerpo, la coloración corporal varía entre colores marrón, café y verde, siendo las hembras usualmente más oscuras que los machos (Figura. 7) (Campbell y Lamar, 2004; Fernández-Badillo et al., 2011; Heimes, 2016).

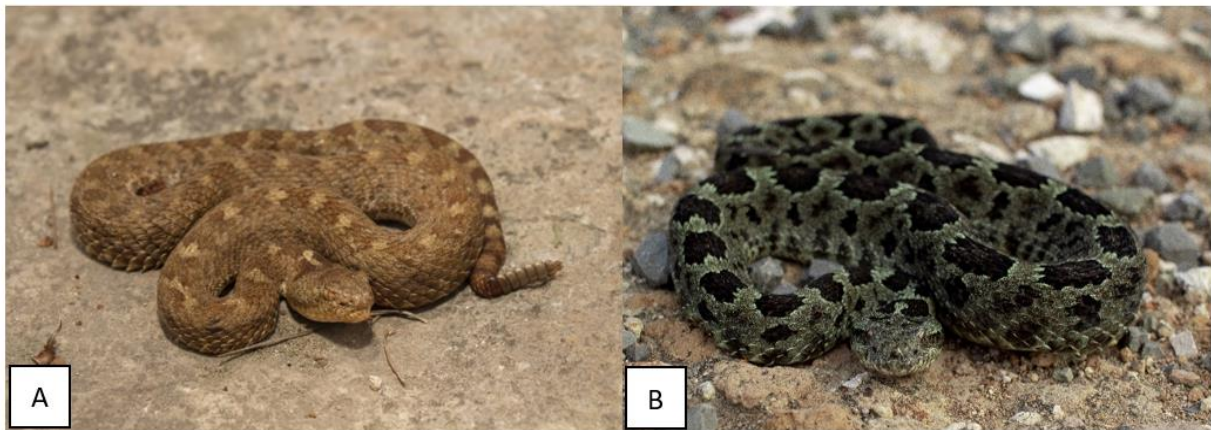


Figura 7 Ejemplares de *C. aquilus* A) hembra B) macho. Fotografías tomadas por Felipe Cerón Mejorada.

En cuanto a la escutelación, diversos autores (Campbell y Lamar, 2004; Heimes, 2016) reportan que *Crotalus aquilus* presenta un promedio de 12 escamas supralabiales, con la escama prenasal curvada por debajo de la postnasal, y de dos a tres escamas internasales. El cascabel está compuesto por 10 escamas en su base.

La escama rostral es generalmente más ancha que alta, mientras que la escama prenasal se curva bajo la postnasal. La escama subocular anterior contacta con la cuarta y quinta escamas supralabiales. Usualmente, hay dos escamas preoculares, siendo la superior frecuentemente dividida verticalmente. Posee de dos a tres escamas internasales grandes y en contacto (Figura. 8).

Generalmente presenta dos escamas cantales, una a cada lado; de cero a cuatro escamas intercantales; entre cinco y diez escamas en la región internasal-prefrontal; y de dos a cinco escamas intersupraoculares. Cuenta con una escama loreal a cada lado, de 11 a 13 escamas supralabiales y de 10 a 12 infralabiales; de 142 a 164 escamas ventrales; 17 a 30 escamas subcaudales; y el cascabel delimitado por 10 escamas. (Figura. 8).

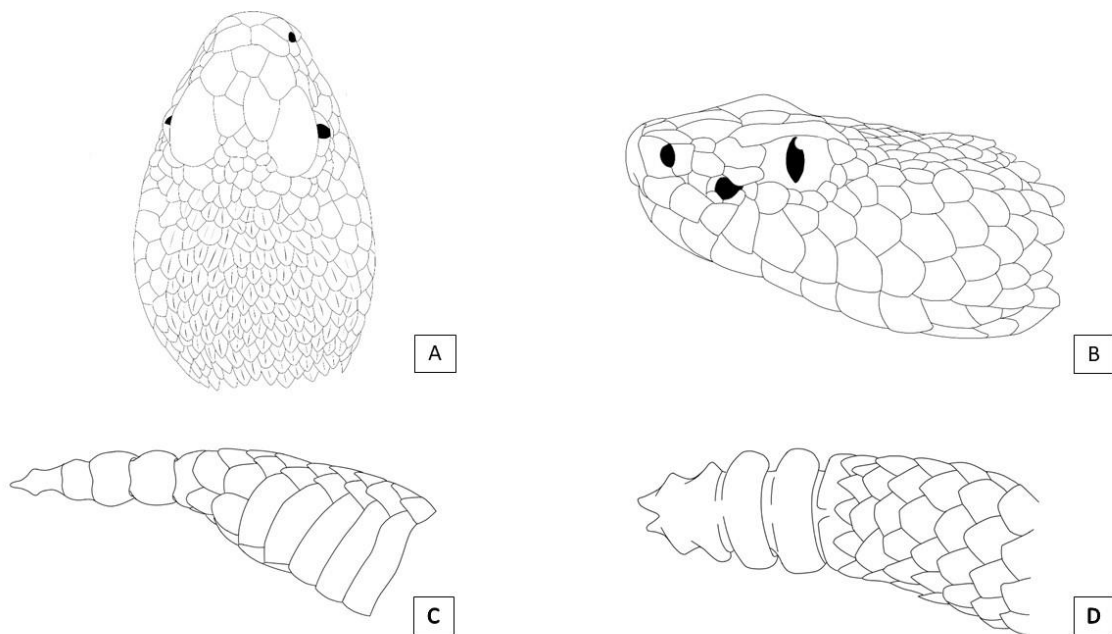


Figura 8 Escutelación de *Crotalus aquilus*. A) vista dorsal de la cabeza B) vista lateral de la cabeza C) vista ventral del cascabel D) vista lateral del cascabel. Elaborado por Pablo Jesús Salvador Morales.

En cuanto a sus hábitos alimenticios; *C. aquilus* posee una dieta sumamente variada, alimentándose de pequeños invertebrados, ranas, salamandras y lagartijas generalmente del género *Sceloporus*, pequeños mamíferos de los géneros *Microtus*, *Peromyscus* y *Sylvilagus*, aves de la especie *Haemorrhous mexicanus* y de otras serpientes de los géneros *Pituophis*, *Thamnophis* y *Crotalus* siendo así, un importante depredador en sus respectivos ecosistemas (Klauber, 1972; Mociño-Deloya et al., 2008; Rebón-Gallardo et al., 2015).

## 2.2 Trabajo de campo para la toma de muestras biológicas

### 2.2.1 *Búsqueda y captura de los ejemplares*

El trabajo de campo se realizó durante el periodo febrero-agosto de 2022 y 2023, con el fin de obtener un buen esfuerzo de muestreo. Para la búsqueda de los organismos se realizaron 3 salidas de campo al mes, las cuales constaron de cuatro días cada una; a partir de marzo hasta mes de octubre.

Para efectuar la recolecta de los ejemplares, se expidió una licencia de recolecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitad crítico, otorgada por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre, con número de registro SGPA/DGVS/06339/21.

Para el trabajo de campo se utilizó el método de búsqueda directa o VES por sus siglas en inglés (Visual Encounters Surveys), el cual consiste en una exploración intensiva, sin restricciones en el área de estudio designada. Por lo general en esta metodología, se utilizan los senderos existentes para acceder a los sitios de estudio y se realiza el muestro durante las primeras horas de día y al atardecer ya que, durante ese tiempo, las temperaturas son favorables para que las serpientes se encuentren activas (Aguirre–León, 2014; Manzanilla y Péfaur, 2000).

De acuerdo con Aguirre–León (2014) el avistamiento de sauropsidos no aves se presenta en función de la temperatura ambiental, pues de esta depende su temperatura corporal, por lo que las búsquedas se realizaron durante un horario de 9:00 am a 14:00 pm y de 16:00 pm a 19:00 pm.

Las serpientes fueron capturadas vivas en campo. Se tomaron las coordenadas geográficas de cada uno de los individuos recolectados y se describieron las características ecológicas de los sitios de recolecta como es el tipo de vegetación, microhábitat, altitud, etc. Estos datos ecológicos son de suma importancia puesto que, de ser necesaria la extracción de cualquier ejemplar, con ayuda de la georreferencia, el animal podría ser devuelto a su zona. También, nos brindan información sobre el desplazamiento de los ejemplares, la cual puede ser de utilidad para sustentar su carácter de bioacumuladores. De igual forma, se pueden obtener datos satelitales sobre las zonas con mayor densidad poblacional.

Los animales fueron recolectados haciendo uso de ganchos y sacos herpetológicos, una vez encostalado cada animal, fue llevado a una zona despejada para realizar el manejo del mismo en

condiciones de seguridad (Aguirre–León, 2014). Durante todo el protocolo de manejo se evitó la manipulación directa con las manos con el fin de reducir el riesgo de una mordedura, así mismo se hizo uso de tubos de acrílico diseñados para el manejo específico de los ejemplares. De acuerdo con los protocolos establecido por Aguirre–León (2014) y Villegas (2005), las serpientes serán introducidas en los tubos de acrílico, manejándolas siempre con los ganchos herpetológicos. Una vez que dos tercios de su cuerpo estén dentro del tubo, este deberá inclinarse sobre el cuerpo de la serpiente para sujetarla contra el suelo, para después ser sujeta con la mano (Figura. 9).

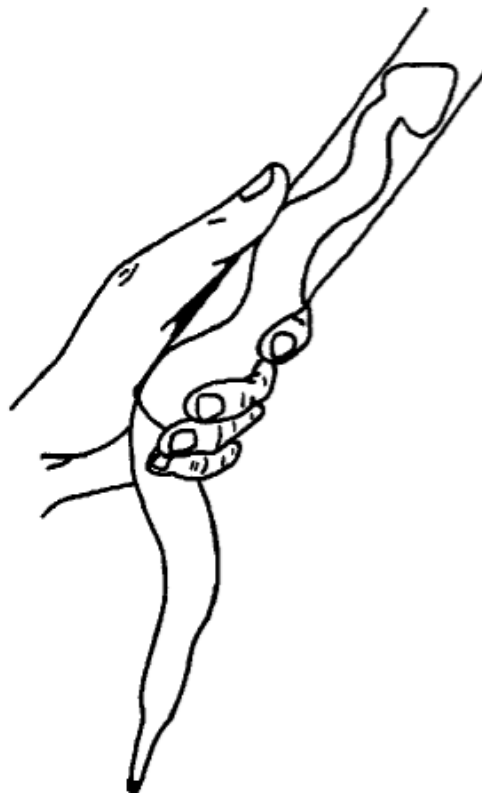


Figura 9 Sujeción de serpiente venenosa mediante entubación (Villegas, 2005).

Para la identificación de la especie se utilizaron las claves taxonómicas descritas por Campbell y Lamar (2004). A cada ejemplar capturado se le asignó un número clave para su registro individual bajo las siglas PECA (Proyecto Ecotoxicológico de *Crotalus aquilus*) y el número del ejemplar.

El marcaje de los ejemplares se realizó mediante una fotografía del patrón de coloración dorsal según el método sugerido por Moon et al. (2004), pues los patrones de coloración son únicos de

cada ejemplar, no varían con el paso del tiempo y es el método menos invasivo de marcaje (Carlstrom y Edelstam, 1946).

### 2.2.2 Toma de muestras

La toma de datos y muestras se realizó directamente en campo. Los ejemplares capturados fueron entubados en tubos de acrílico transparente, de un tamaño menor al cuerpo de los animales con el fin de poderlas manipular con mayor seguridad (Aguirre-León, 2014; Villegas, 2005).

Se registraron medidas morfométricas de los ejemplares, incluyendo el peso (medido con una báscula digital), la longitud hocico-cloaca y la longitud total (medidas con una cinta métrica). La determinación del sexo se realizó mediante la técnica de sexado mediante estiletes (Figura. 10).

Para realizar el sexado de un ejemplar, se introducirá una sonda o estilete de punta roma lubricado y previamente esterilizado por un lado de la cloaca de la serpiente y en dirección caudal. En machos, la sonda pueda penetrar profundamente (entre 8 a 15 escamas subcaudales) esto debido a que los hemipenes se encuentran invertidos, mientras que en hembras no se podrá penetrar más de 3 o 4 escamas subcaudales (Varela, 2002).

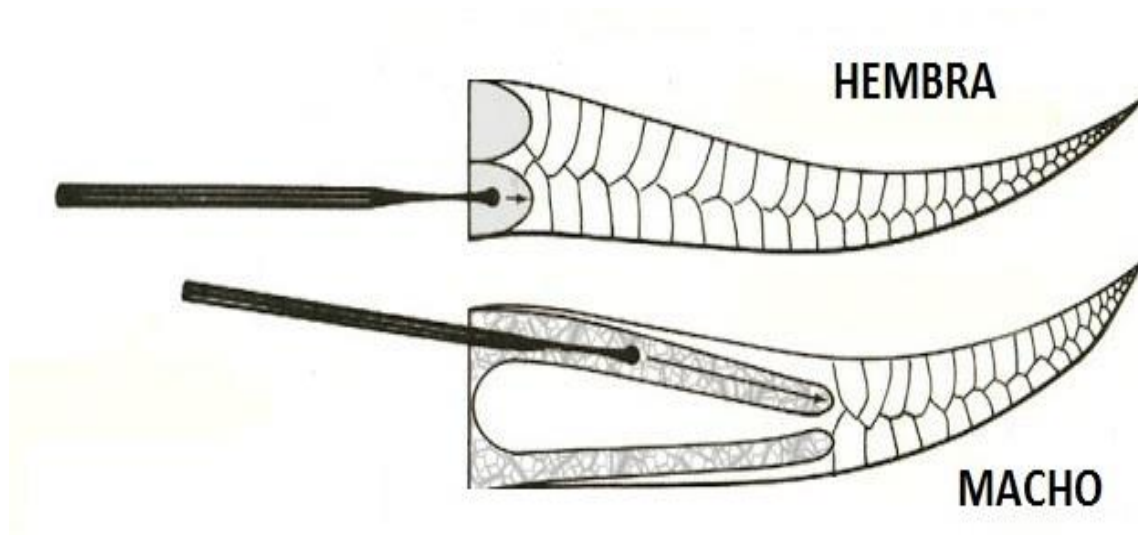


Figura 10 Sexado de serpiente por medio de sonda (Varela, 2002).

Posteriormente, se procedió a tomar las muestras biológicas correspondientes de acuerdo a los procedimientos establecidos por Aguirre–León (2014) Varela (2002) y Villegas (2005).

### Cascabel

El cascabel, al ser una estructura queratinizada, no presenta terminaciones nerviosas y este se recupera con cada muda de piel que realiza la serpiente. Esta estructura se puede obtener sin necesidad de realizar cortes, separando un segmento de otro. La obtención se realizó a partir del segundo segmento del mismo (Figura. 11).

Cada uno de los cascabeles obtenidos se almacenarán en refrigeración en frascos de plástico, previamente lavados y etiquetados con la clave de registro del ejemplar correspondiente hasta su posterior traslado al laboratorio (Fonseca, 2018).

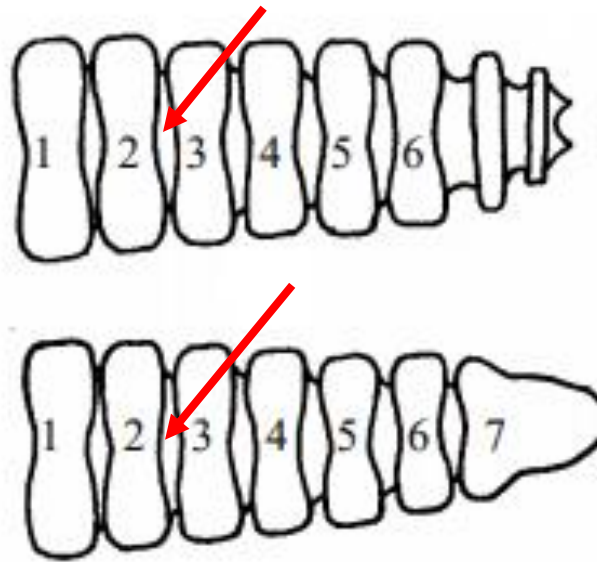


Figura 11 Segmentos de cascabeles numerados. Se señala el lugar en donde se separa para tomar la muestra. Modificado de Varela, (2002).

### Veneno

Las muestras de veneno se obtuvieron mediante el método de ordeña manual (Figura. 12), en vasos para muestras coproparasitoscópicas, estériles, cubiertos de plástico Parafilm y previamente rotuladas. Posteriormente, el veneno fue recuperado mediante el uso de una micropipeta de 100 a

1000  $\mu$ l y depositado en tubos Eppendorf rotulados con la clave de identificación propia de cada animal (Borja et al., 2014). Estas muestras se resguardaron en refrigeración hasta su posterior traslado al laboratorio.



Figura 12 Extracción de veneno mediante ordeña manual. Fotografía tomada por Felipe Cerón Mejorada.

### Mudas de piel

Durante el trabajo de campo se lograron recolectar mudas de piel pertenecientes a *C. aquilus*, estas fueron obtenidas directamente de ejemplares que se encontraban en proceso de muda, dada la temporalidad de muestreo, así como de ejemplares que recién habían mudado, por lo que las muestras se encontraron en buen estado. Las mudas de piel encontradas fueron identificadas en campo, identificando la escutelación de la especie y patrones de coloración que quedan levemente impresos en la muda.

Por otro lado, un ejemplar de la zona de matorral fue recolectado por autoridades del municipio (cuerpo de bomberos) y depositado en la Unidad de Rescate, Rehabilitación y Reubicación de Fauna Silvestre, Endémica y Exótica (URF) de Pachuca, espacio autorizado por SEMANART México, la cual permitió tener acceso a los organismos para realizar tomas de muestras.

## 2.3 Procesamiento de las muestras

### 2.3.1 Transporte y almacenaje

Las muestras recolectadas en campo fueron transportadas en una hielera con gel refrigerante hasta el laboratorio, en donde permanecieron en congelación a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas (Burger et al., 2006).

### 2.3.2 Preparación de las muestras

#### Cascabeles

Debido a que no se cuenta con una metodología establecida para el procesamiento de este tipo de muestra biológica para su análisis como biomarcador y debido a la naturaleza de las mismas, la adecuación de esta metodología se basa el procedimiento descrito por Fonseca (2018), quien analizó plumas y egagrópilas de aves como biomarcadores de la contaminación por MIT en un ambiente urbano.

Cada cascabel fue lavado con agua desionizada y secado a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, una vez alcanzado el peso constante los cascabeles fueron triturados en morteros de porcelana (Figura. 13).



Figura 13 Muestras de cascabeles y restos de una serpiente.

## Veneno

El veneno es una secreción biológica, compuesta en un 90% por proteínas (Borja et al., 2014), las cuales pueden desnaturalizarse fácilmente con cambios de temperatura o por la exposición prolongada al ambiente. Debido a que no se cuenta con un protocolo establecido para el análisis de metales pesados en muestras de veneno de serpientes, estas muestras se transportaron y almacenaron bajo los protocolos de análisis para la caracterización de veneno recomendado por Borja et al. (2014).

El veneno fue trasladado al Laboratorio de Genética Evolutiva y Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), en donde se procesó. Cada muestra fue recuperada en tubos eppendorf y centrifugada en una microcentrífuga de mesa, a una velocidad de 5 000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, la muestra de veneno fue nuevamente recuperada con una micropipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  y depositada en tubos de polipropileno para digestión y pesada en una balanza analítica.

## Mudas de piel

Para la preparación de las mudas de piel, estas fueron lavadas con agua desionizada y secadas a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, una vez alcanzado el peso constante, se procedió a cortar con tijeras cada muda y almacenada en frascos copro de manera independiente. Finalmente, cada muestra fue agitada con un agitador vortex durante 2 minutos, con la finalidad de homogenizar la muestra para posteriormente ser pesada en una balanza analítica (Jones y Holladay, 2006).

## Cuerpo completo

De manera adicional se procesaron 3 serpientes (un posible adulto y dos crías) que fueron encontradas muertas en las zonas de muestreo. Para ello, las serpientes fueron secadas a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, una vez alcanzado el peso constante, se procedió a cortar con tijeras cada ejemplar y a almacenar los restos en frascos copro. Finalmente, cada frasco fue agitado con un agitador vortex durante 2 minutos, con la finalidad de homogenizar la muestra para posteriormente ser pesada en una balanza analítica.

### 2.3.3 Digestión ácida de las muestras

La digestión de las muestras se realizó mediante el protocolo ácido asistido por microondas descrito en la metodología 3051A de la USEPA (2007). Para ello, se empleó un horno de digestión por microondas modelo Mars X, que permite un control preciso de la temperatura y presión, garantizando la descomposición eficiente de la matriz orgánica y la liberación completa de los metales presentes. Este método asegura una digestión rápida, reproducible y segura, cumpliendo con los estándares internacionales para el análisis de metales en muestras ambientales (USEPA, 2007).

Se colocó el material biológico en los vasos de propileno para digestión (Figura. 14), para ello, se pesó un máximo de 0.2 g de cada muestra, posteriormente se adicionaron 10 mL de ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3$ ) a cada vaso. Finalmente, se colocaron los vasos en el carrusel del horno y se procedió a realizar la digestión aplicando los parámetros cargados en el software del horno, bajo las especificaciones del método 3051A (Figura. 15). Una vez concluido el proceso de digestión, las muestras se dejaron enfriar por 30 minutos, antes de su filtrado.



Figura 14 Muestras en vasos para digestión.



Figura 15 Digestión de muestras en horno MARX.

Concluyendo el proceso anterior, las muestras fueron filtradas utilizando papel filtro del número 40 (Figura. 16). Posteriormente, se aforaron con agua desionizada a 50 mL. Finalmente, estas muestras fueron almacenadas en los frascos plásticos previamente preparados y rotulados con el código correspondiente a cada ejemplar para su posterior lectura en el espectrofotómetro (Figura. 17) (USEPA, 2007).



Figura 16 Filtrado de muestras digeridas.



Figura 17 Muestras digeridas y filtradas listas para su lectura.

## 2.4 Determinación de MIT en muestras biológicas

### 2.4.1 Preparación de estándares y curva patrón

Se prepararon soluciones madre de cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) a una concentración de 1000.00 mg/L, siguiendo las recomendaciones del manual técnico del espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-880.

Para la solución de Cd, se pesaron 0.1 g de sulfato de cadmio ( $\text{CdSO}_4$ ) y se disolvieron en 5 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado. En el caso del Pb, se pesaron 0.1 g del metal en su forma elemental, los cuales se disolvieron también en 5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Para la solución de Hg, se emplearon 0.1 g de metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ), disueltos en 5 mL de ácido nítrico concentrado. Una vez disueltas por completo las sales o compuestos metálicos, las soluciones fueron aforadas con agua desionizada hasta completar un volumen final de 100 mL en matraces volumétricos. Finalmente, se transfirieron a frascos de almacenamiento previamente etiquetados, para su posterior uso en la construcción de curvas de calibración. A partir de estos estándares se prepararon curvas patrón con una concentración de 1.5 mg/L con cinco puntos más un blanco a cero.

#### 2.4.2 Lectura de las muestras

Para la determinación de MIT en las muestras biológicas, se utilizó la metodología sugerida por Burger et al. (2006) de Espectroscopia de Emisión de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) con un equipo Perkin Elmer, Mod. Optima 8300 USA (Figura. 18).



Figura 18 Analizador multielemental ICP Perkin Elmer, Mod. Optima 8300 USA.

#### 2.5 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del análisis químico de las muestras de ambas zonas de estudio (bosque y matorral), se procedió a realizar el análisis estadístico. Previamente, se aplicaron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) para cada conjunto de datos, determinándose que estos no seguían una distribución normal. Se llevó a cabo un remuestreo Bootstrap para homogeneizar la varianza, posteriormente, se empleó estadística no paramétrica, utilizando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Mann-Whitney, debido a la naturaleza de los datos (Burger et al., 2017). Las pruebas estadísticas se realizaron en el software PAST, estableciendo un intervalo de confianza del 95 %. Se llevaron a cabo comparaciones entre las concentraciones determinadas en los diferentes biomarcadores, tanto de forma independiente como entre los promedios (obtenidos después del remuestreo Bootstrap) de las concentraciones de cada metal de interés toxicológico (MIT) en cada biomarcador.

Posteriormente, con los datos obtenidos sobre la concentración de MIT en suelo y las concentraciones determinadas en los biomarcadores, se realizó el cálculo para determinar el Factor de bioacumulación absoluto (BAFA) de cada uno de los MIT en los diferentes biomarcadores respecto al suelo, el cual es un índice adimensional que cuantifica el grado de bioacumulación de un contaminante, específicamente un metal de interés toxicológico (MIT), en un determinado biomarcador biológico (como piel, veneno, sangre, entre otros).

Se calcula como la razón entre la concentración del contaminante en el organismo y su concentración en el medio ambiente o vía de exposición. Al tratarse de una relación entre dos concentraciones expresadas en las mismas unidades, sus dimensiones se cancelan, resultando en un valor sin unidades, a través de la siguiente formula:

$$BAFA = C_{INT} / C_{EXP}$$

Donde:

BAFA = Factor de Bioacumulación Absoluto

$C_{INT}$  = Concentración interna - concentraciones determinadas en los diferentes biomarcadores (mg/Kg)

$C_{EXP}$  = Concentración de exposición - concentraciones determinadas en suelo (mg/Kg)

Valores de BAFA < 1 indican una baja bioacumulación (solo una fracción de la concentración ambiental fue absorbida), mientras que BAFA > 1 sugiere una acumulación efectiva del compuesto en el organismo, lo que puede representar un riesgo potencial para la biota expuesta (Carriquiriborde, 2021).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Trabajo de campo del periodo febrero - agosto de 2022

El trabajo de campo correspondiente al periodo de muestreo febrero–agosto 2022, se realizó únicamente en la zona de bosque. Se lograron capturar un total de 7 ejemplares, uno de ellos muerto (Figura.19-25), de igual forma se lograron obtener dos mudas de piel de la especie en el área de muestreo (Tabla 10).

Tabla 10 Datos morfométricos y muestras obtenidas de *C. aquilus* (zona de bosque).

Ejemplar	Datos morfométricos			Muestra		
	Sexo	Peso (g)	Longitud (cm)	Cascabel	Veneno	Muda de piel
PECA 001	♂	145	48.3	✓	✓	-
PECA 002	♀	144	41	✓	-	-
PECA 003	♂	383	53.5	✓	✓	✓
PECA 004	♀	80	30	✓	-	✓
PECA 005	-	-	-	-	-	✓
PECA 006	-	-	-	-	-	✓
PECA 007	♀	145	41.3	Cuerpo completo		
PECA 008	♀	110	40.5	✓	✓	-
PECA 009	♀	140	43	✓	✓	-

PECA (Proyecto Ecotoxicológico *Crotalus aquilus*).



Figura 19 Ejemplar No. PECA 001.



Figura 20 Ejemplar No. PECA 002.



Figura 21 Ejemplar No. PECA 003.



Figura 22 Ejemplar No. PECA 004.



Figura 23 Ejemplar No. PECA 007.



Figura 24 Ejemplar No. PECA 008.



Figura 25 Ejemplar No. PECA 009.

El periodo de muestreo tuvo lugar durante cuatro meses en donde se realizó una salida de campo por mes con duración de dos días. Los animales se buscaron en horarios de 9:00 am a 4:00 pm, pues al ser organismos ectotermos, este es el horario en el que se les suele encontrar mientras termorregulan (Aguirre-León, 2014). Las búsquedas se realizaron con un total de 4 personas. Por tanto, con base en el cálculo de horas hombre, el esfuerzo de muestreo arroja un total de 224 horas de trabajo, abarcando aproximadamente un área de 68.3 ha (Figura. 26).

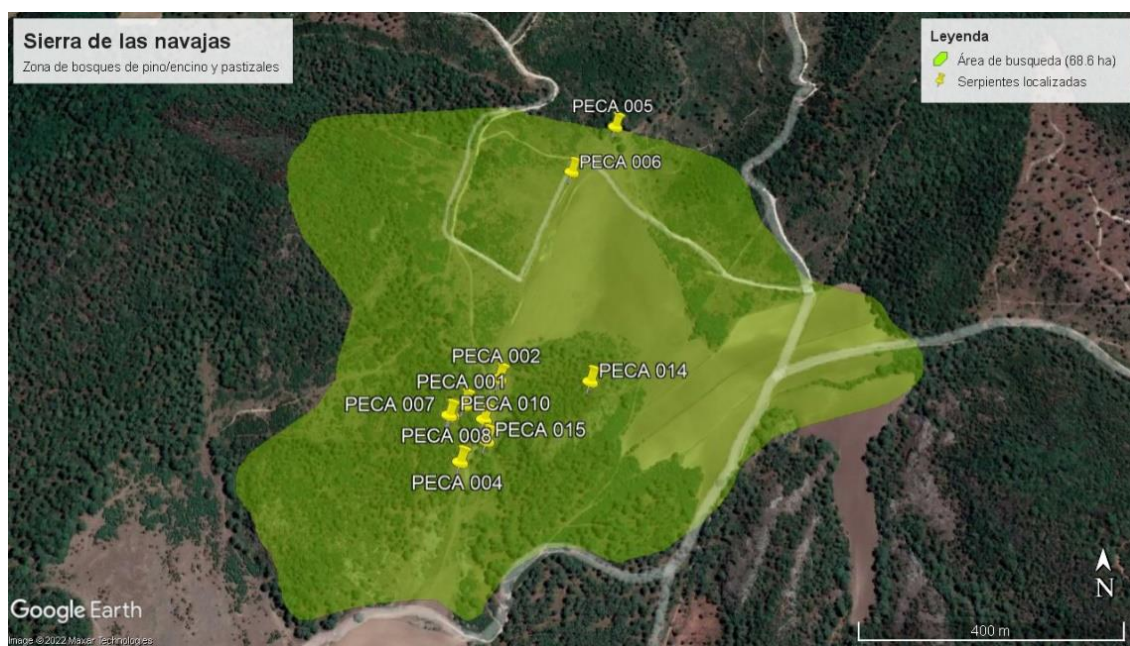


Figura 26 Superficie abarcada durante el muestreo en la zona de bosque.

Se puede observar una clara concentración de ejemplares en un punto definido del mapa (Figura. 27), los ejemplares de esa zona fueron encontrados mayormente en zonas rocosas, ligeramente inclinadas, la mayoría bajo rocas, lo cual es correspondiente a lo reportado en bibliografía sobre el comportamiento de las serpientes, demostrando su poca vagilidad, lo cual puede potenciar el efecto de bioacumulación de metales pesados en los organismos.



Figura 27 Puntos de geoposición de cada ejemplar de *C. aquilus* encontrado.

Así mismo, se logró obtener una recaptura (Figura. 28 y 29), lo cual por sí solo es un evento verdaderamente fortuito, mismo que representa un dato de suma importancia y que complementa el escaso conocimiento que se tiene sobre el desplazamiento de estos organismos. De igual forma, sustenta lo antes mencionado sobre los hábitos que incrementan la exposición de las serpientes hacia los metales pesados.



Figura 28 Puntos de captura y recaptura de un ejemplar de *C. aquilus*.

El primer avistamiento del ejemplar al cual se le designo como PECA 002, fue el día 17 de abril del presente año. Posteriormente, el mismo ejemplar fue localizado el día 5 de agosto del año en curso. La distancia calculada entre un punto de encuentro y otro fue de 80.3 m.



Figura 29 Fotografías de identificación del ejemplar de recaptura, se señalan las marcas que caracterizaron al ejemplar (A) primer avistamiento (B) segundo avistamiento.

### 3.2 Trabajo de campo del periodo febrero-agosto de 2023

El trabajo de campo correspondiente al periodo de muestreo febrero-agosto 2023, se realizó únicamente en la zona de matorral. Durante el periodo de muestreo se lograron capturar un total de 6 serpientes (Figura. 30 - 35). A continuación, en la Tabla 11, se muestran los datos morfométricos y las muestras obtenidas de los ejemplares recolectados en la zona de matorral.

Cabe destacar que la Unidad de Rescate, Rehabilitación y Reubicación de Fauna Silvestre, Endémica y Exótica (URF) del Bioparque de convivencia de Pachuca, Hgo. permitió la toma de muestras de un ejemplar resguardado en sus instalaciones, posiblemente perteneciente a la zona de recolecta; se llegó a esta conclusión debido a la cercanía que tiene la zona urbana en donde fue reportado y rescatado, con la zona de estudio.

Tabla 11 Datos morfométricos y muestras obtenidas de *C. aquilus* (zona de matorral).

Ejemplar	Datos morfométricos			Muestra		
	Sexo	Peso (g)	Longitud (cm)	Cascabel	Veneno	Muda de piel
PECA 010	♂	383	49	✓	✓	-
*PECA 011	♀	144	40.5		Cuerpo completo	
PECA 012	♂	210	41	✓	✓	✓
&PECA 013	♀	315	48.3	✓	✓	✓
PECA 014	♂	110	41	✓	✓	-
PECA 015	♀	93	43	✓	-	-

PECA (Proyecto Ecotoxicológico *Crotalus aquilus*). \*Ejemplar encontrado muerto &Ejemplar resguardado por la URF del Bioparque de convivencias de Pachuca, Hgo.



Figura 30 Ejemplar No. PECA 010.



Figura 31 Ejemplar No. PECA 011.



Figura 32 Ejemplar No. PECA 012.



Figura 33 Ejemplar No. PECA 013.



Figura 34 Ejemplar No. PECA 014.



Figura 35 Ejemplar No. PECA 015.

Para el trabajo de campo correspondiente a la zona de matorral se obtuvo un esfuerzo de muestreo de 224 h de trabajo, abarcando aproximadamente un área de 40.2 ha (Figura. 36). Durante el periodo de muestreo, se observaron menos ejemplares de *C. aquilus* en comparación con la zona de bosque, donde el número de ejemplares observados fue mayor, incluyendo varios avistamientos de crías de la especie, así como mudas de piel.

Debido al conocimiento previo de la población de la especie en la zona de matorral, se esperaba obtener un mayor número de capturas, sin embargo, aplicando el mismo esfuerzo de muestreo que en la zona de bosque, el número de muestras obtenidas no difirió significativamente entre zonas.



Figura 36 Superficie abarcada durante el muestreo de la zona de matorral.

### 3.3 Determinación y evaluación de las concentraciones de MIT en las muestras biológicas

#### 3.3.1 Evaluación de las muestras de la zona de bosque

Se digirieron un total de seis cascabeles, cuatro muestras de veneno, cuatro mudas de piel y un ejemplar completo (este se dividió en dos para su análisis, debido al peso de la muestra). Tras el

análisis de las muestras mediante ICP, se lograron determinar los 3 MIT (Cd, Pb y Hg) en todos los diferentes biomarcadores (cascabel, veneno, muda de piel y cuerpo completo) (Tabla 12).

Tabla 12 Concentraciones de MIT (mg/kg) en diferentes biomarcadores de *C. aquilus* (zona de bosque).

MIT	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
Cd	1046.91 ± 19.77	674.94 ± 129.00	80.14 ± 0.63	65.09 ± 1.28
	862.01 ± 5.55	530.64 ± 101.79	133.65 ± 0.90	73.43 ± 2.01
	568.42 ± 11.09	139.29 ± 27.51	251.80 ± 0.49	
	551.65 ± 7.05	250.12 ± 48.31	306.17 ± 5.41	
	526.19 ± 11.48			
	1111.68 ± 23.49			
Hg	*777.81 ± 264.30	*330.73 ± 221.24	*183.06 ± 84.20	*69.26 ± 4.56
	2061.52 ± 29.98	230.81 ± 47.54	122.77 ± 2.005	124.46 ± 0.86
	1736.14 ± 28.034	85.09 ± 12.84	239.23 ± 1.875	115.01 ± 2.14
	1406.41 ± 11.870	36.36 ± 12.58	448.5 ± 8.642	
	1479.02 ± 2.477	80.89 ± 10.14	662.16 ± 4.306	
	1479.77 ± 14.607			
Pb	2263.08 ± 17.765			
	*1737.66 ± 353.29	*116.72 ± 90.80	*381.55 ± 187.13	*119.73 ± 5.17
	2265.19 ± 47.33	836.07 ± 52.22	137.19 ± 0.98	103.87 ± 3.16
	1512.3 ± 20.32	681.47 ± 10.16	226.43 ± 4.76	126.61 ± 2.22
	978.1 ± 59.43	172.63 ± 10.93	453.63 ± 9.66	
	1136.45 ± 26.33	310.17 ± 44.67	541.99 ± 18.28	
	1356.36 ± 64.30			
	2097.52 ± 55.72			
	*1557.65 ± 519.21	*501.51 ± 319.12	*306.04 ± 168.49	*115.24 ± 12.45

Se muestran las concentraciones promedio de cada muestra ± su desviación estándar \*Promedios de concentraciones después de un remuestreo Bootstrap de mil pasos (n = x).

## Cadmio (Cd)

El análisis de varianza de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en las concentraciones de Cd entre los biomarcadores de *Crotalus aquilus* ( $p = 0.00029$ ). En particular, el cascabel presentó concentraciones de Cd significativamente más altas en comparación con el veneno ( $p = 0.021$ ), la muda de piel ( $p = 0.014$ ) y el cuerpo completo ( $p = 0.005$ ). Estas diferencias sugieren que el cascabel, al estar formado por segmentos de queratina que se acumulan con cada muda (Fernández-Badillo, 2011; Ibarra-Bautista et al., 2021), podría funcionar como un marcador acumulativo a largo plazo. Este comportamiento no se observa en otros tejidos, lo que refuerza la idea de que el cascabel podría ser un marcador más sensible y de mayor duración para el monitoreo de Cd en serpientes.

Se realizó el cálculo para determinar el BAFA del Cd en los diferentes biomarcadores respecto al suelo (Tabla 13).

Tabla 13 Factores de bioacumulación absoluto (BAFA) del Cd en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna ( $C_{INT}$ ) y concentración de exposición ( $C_{EXP}$ ) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$	$777.81 \pm 264.30$	$330.73 \pm 221.24$	$183.06 \pm 84.20$	$69.26 \pm 4.56$
$C_{EXP}$	$3.45 \pm 2.44$			
BAFA	225.45	95.86	53.06	20.08

En cuanto a los factores de bioacumulación absoluto (BAFA), el cascabel mostró una mayor capacidad de acumulación de Cd en relación con el suelo (225.45 órdenes de magnitud), mientras que el cuerpo completo exhibió el menor BAFA (20.08 órdenes de magnitud). Estos valores respaldan la observación de que los tejidos queratinosos, como el cascabel y la muda de piel, son más propensos a acumular metales pesados (Fonseca, 2018), probablemente debido a la afinidad de los MIT por la queratina. Sin embargo, se observa una tendencia decreciente en las

concentraciones de Cd en la muda de piel en comparación con el cascabel, lo que sugiere que el cascabel retiene Cd durante un mayor periodo de tiempo.

El veneno de *Crotalus aquilus*, compuesto en su mayoría por proteínas de bajo y alto peso molecular (Borja et al., 2016), presentó acumulación detectable de los tres metales evaluados, siendo el plomo (Pb) el de mayor concentración, particularmente en la zona de matorral ( $1131.60 \pm 499.28$  mg/kg). Las concentraciones de cadmio (Cd) en este biomarcador fueron también relevantes ( $330.73 \pm 221.24$  mg/kg en bosque;  $136.18 \pm 51.43$  mg/kg en matorral), aunque significativamente menores en comparación con las observadas en el cascabel ( $p = 0.021$ ), según el análisis de Kruskal-Wallis. El mercurio (Hg), por su parte, alcanzó valores de  $116.72 \pm 90.80$  mg/kg en bosque y  $236.14 \pm 105.11$  mg/kg en matorral, mostrando afinidad diferencial según la matriz.

La capacidad de acumulación de estos metales en el veneno puede explicarse por su afinidad con proteínas específicas presentes en secreciones glandulares, como ha sido documentado en estudios sobre otros fluidos biológicos (por ejemplo, leche y plasma). Si bien el cascabel mostró la mayor capacidad acumulativa para Cd, el veneno demostró ser particularmente sensible a la presencia de Pb y Hg, lo que sugiere un comportamiento metal-específico en la retención por tipo de tejido. Esta evidencia refuerza la propuesta del veneno como un biomarcador no letal emergente y funcional en estudios ecotoxicológicos, aunque se requieren más investigaciones para estandarizar su uso e interpretar sus implicaciones fisiotoxicológicas en reptiles.

#### Mercurio (Hg)

El mercurio mostró un patrón de acumulación comparable al del cadmio, destacando el cascabel como el biomarcador con mayores concentraciones ( $1737.66 \pm 353.29$  mg/kg), diferencias que fueron estadísticamente significativas frente al veneno ( $p = 0.021$ ), la muda de piel ( $p = 0.014$ ) y el cuerpo completo ( $p = 0.005$ ), según el análisis de Kruskal-Wallis.

Se realizó el cálculo para determinar el BAFA de las concentraciones de Hg en los diferentes biomarcadores respecto a las concentraciones del metal en el suelo (Tabla 14).

Tabla 14 Factores de bioacumulación (BAFA) de Hg en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna ( $C_{INT}$ ) y concentración de exposición ( $C_{EXP}$ ) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$ (mg/Kg)	1737.66 $\pm$ 353.29	116.72 $\pm$ 90.80	381.55 $\pm$ 187.13	119.73 $\pm$ 5.17
$C_{EXP}$ (mg/Kg)	0.05 $\pm$ 0.009			
BAFA	34753.20	2334.40	7631.00	2394.60

Este patrón confirma la alta afinidad del Hg por tejidos queratinizados de acumulación progresiva, como es el caso del cascabel, lo cual se refleja también en el valor de su BAFA (34753.20), que indica una acumulación 34,753 veces superior a la concentración detectada en el suelo. En comparación, los valores obtenidos para la muda de piel (7631.00) y el cuerpo completo (2394.60) sugieren una acumulación efectiva pero menos intensa, posiblemente relacionada con la dinámica de renovación celular o excreción.

El veneno también mostró una bioacumulación considerable de Hg (116.72  $\pm$  90.80 mg/kg en bosque; 236.14  $\pm$  105.11 mg/kg en matorral), con un BAFA de 2334.40. Estos resultados indican una afinidad significativa del mercurio por este fluido biológico, posiblemente debido a su composición altamente proteica y a la afinidad de este metal con grupos sulfhidrilos presentes en proteínas de secreción. A pesar de no existir estudios previos que reporten la acumulación de Hg en veneno de serpientes, estos hallazgos abren una nueva línea de investigación sobre su potencial como biomarcador alternativo y no letal.

Cabe destacar que la prueba de Mann-Whitney confirmó que las concentraciones de Hg en todos los biomarcadores fueron significativamente mayores que las del suelo, evidenciando un proceso de bioacumulación activo. En conjunto, los datos obtenidos permiten afirmar que el mercurio se bioacumuló en todas las matrices biológicas analizadas, con una especial afinidad por el cascabel y el veneno, en órdenes de magnitud superiores a 2000 y hasta 34,000 veces respecto a la concentración ambiental base.

## Plomo (Pb)

El Pb también mostró un patrón de acumulación similar a los otros MIT, con concentraciones significativamente más altas en el cascabel ( $p = 0.0013$ ). Los resultados del análisis post hoc indicaron que las concentraciones de Pb en el cascabel eran significativamente más altas que en el veneno ( $p = 0.021$ ), la muda de piel ( $p = 0.014$ ) y el cuerpo completo ( $p = 0.005$ ), lo que coincide con la capacidad de esta estructura para acumular MIT a largo plazo.

Se realizó el cálculo para determinar el BAFA de las concentraciones de Pb en los diferentes biomarcadores respecto a las concentraciones del metal en el suelo (Tabla 15).

Tabla 15 Factores de bioacumulación (BAFA) de Pb en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de bosque). Concentración interna ( $C_{INT}$ ) y concentración de exposición ( $C_{EXP}$ ) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$ (mg/Kg)	1557.65	501.51	306.04	115.24
$C_{EXP}$ (mg/Kg)		54.34 $\pm$ 7.25		
BAFA	28.66	9.23	5.63	2.12

Los valores de BAFA de Pb, también fueron más altos en el cascabel (28.66) en comparación con el veneno (9.23) y la muda de piel (5.63), lo que sugiere que, al igual que con el Cd y el Hg, el Pb tiene una afinidad particular por las estructuras queratinosas. Esto refuerza la hipótesis de que el cascabel, al acumular MIT durante sucesivas ecdisis (proceso de muda o desprendimiento del exoesqueleto o tegumento externo en animales), es un marcador especialmente efectivo para la exposición crónica.

Los niveles de Pb en el veneno fueron relativamente bajos en comparación con el cascabel. El cuerpo completo, por su parte, mostró las concentraciones más bajas.

### 3.3.2 Evaluación de las muestras de la zona de matorral

Se analizaron un total de cinco cascabeles, cuatro muestras de veneno, dos mudas de piel y un ejemplar completo, el cual se dividió en dos para su análisis por cuestiones de peso. Los resultados obtenidos mediante ICP mostraron concentraciones detectables de Cd y Pb en todos los biomarcadores analizados, mientras que Hg solo fue detectable en el veneno y en el cuerpo completo. En el caso de los cascabeles y las mudas de piel, las concentraciones de Hg estuvieron por debajo del límite de detección del equipo (Tabla 16).

Tabla 16 Concentraciones de MIT (mg/kg) en diferentes biomarcadores de *C. aquilus* (zona de matorral).

MIT	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
Cd	379.56 ± 72.87	134.53 ± 25.27	38.50 ± 7.33	90.23 ± 9.41
	157.68 ± 29.95	131.20 ± 21.76	63.60 ± 12.11	98.85 ± 7.63
	178.42 ± 33.88	233.62 ± 31.22		
	223.31 ± 65.70	93.27 ± 18.43		
	163.36 ± 31.32			
Hg	*220.94 ± 82.82	*136.18 ± 51.43	*51.05 ± 13.74	*93.10 ± 4.45
	N/D	429.21 ± 38.43	N/D	102.33 ± 11.82
	N/D	247.16 ± 20.40	N/D	82.45 ± 6.22
	N/D	144.82 ± 19.42		
	N/D	203.70 ± 18.58		
	N/D			
Pb	*N/D	*236.145 ± 105.11	*N/D	*92.39 ± 10.88
	410.89 ± 32.40	521.39 ± 21.71	31.86 ± 4.32	40.83 ± 4.55
	188.22 ± 34.28	1747.71 ± 120.92	94.00 ± 4.95	63.25 ± 4.83
	219.41 ± 14.62	1325.22 ± 108.32		
	283.65 ± 73.52	1348.69 ± 112.45		
	224.72 ± 65.83			
	*289.63 ± 98.86	*1131.60 ± 499.28	*62.93 ± 34.03	*48.30 ± 11.57

Se muestran las concentraciones promedio de cada muestra  $\pm$  su desviación estándar \*Promedios de concentraciones después de un remuestreo Bootstrap de mil pasos ( $n = x$ ). (N/D) Concentración por debajo del límite de detección del equipo.

#### Cadmio (Cd)

El análisis de varianza de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas en las concentraciones de Cd entre los biomarcadores analizados ( $p = 0.0124$ ). La prueba post-hoc de Mann-Whitney mostró que las concentraciones de Cd en el cascabel fueron significativamente más altas que en el veneno ( $p = 0.0442$ ), la muda de piel ( $p = 0.004$ ) y el cuerpo completo ( $p = 0.004$ ). La muda de piel presentó las concentraciones más bajas de Cd en comparación con los demás biomarcadores.

Se realizó el cálculo para determinar el BAFA del Cd en los diferentes biomarcadores respecto al suelo (Tabla 17).

Tabla 17 Factores de bioacumulación (BAFA) de Cd en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna ( $C_{INT}$ ) y concentración de exposición ( $C_{EXP}$ ) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$ (mg/Kg)	777.81 $\pm$ 264.30	330.73 $\pm$ 221.24	183.06 $\pm$ 84.20	69.26 $\pm$ 4.56
$C_{EXP}$ (mg/Kg)		3.45 $\pm$ 2.44		
BAFA	225.45	95.86	53.06	20.08

El cálculo del factor de bioacumulación absoluta (BAFA) para Cd en cada biomarcador mostró que el cascabel fue el tejido con mayor acumulación, alcanzando un BAFA de 225.45 órdenes de magnitud (Tabla 18). La prueba de Mann-Whitney confirmó que las concentraciones de Cd en los biomarcadores fueron significativamente mayores que las registradas en el suelo de la zona de matorral, lo que respalda la capacidad de *C. aquilus* para bioacumular este metal en sus tejidos

#### Mercurio (Hg)

Las concentraciones de Hg en el cascabel y en las mudas de piel se encontraron por debajo del límite de detección del equipo, sin embargo, el análisis de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas en las concentraciones de Hg entre los otros dos biomarcadores (veneno y cuerpo completo:  $p = 0.0033$ ). Posteriormente, la prueba de Mann-Whitney reveló que el veneno presentó concentraciones de Hg significativamente mayores que el cuerpo completo ( $p = 0.004337$ ).

Se realizó el cálculo para determinar el BAFA de las concentraciones de Hg en los diferentes biomarcadores respecto a las concentraciones del metal en el suelo (Tabla 18).

Tabla 18 Factores de bioacumulación (BAFA) de Hg en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$ (mg/Kg)	N/D	$236.145 \pm 105.11$	N/D	$92.39 \pm 10.88$
$C_{EXP}$ (mg/Kg)		$8.06 \pm 1.58$		
BAFA	0	29.29	0	11.46

Los factores de bioacumulación BAFA de Hg en el veneno (29.29 órdenes de magnitud) y en el cuerpo completo (11.46 órdenes de magnitud) indican una bioacumulación considerable de este metal, siendo el veneno el biomarcador con mayor concentración acumulada (Tabla 19). Las pruebas estadísticas también sugieren que las concentraciones de Hg en el veneno y cuerpo completo son significativamente superiores a las encontradas en el suelo, apoyando la capacidad del cascabel de *C. aquilus* para acumular MIT.

#### Plomo (Pb)

Para el Pb, el análisis de Kruskal-Wallis demostró diferencias significativas entre las concentraciones de este metal en los diferentes biomarcadores ( $p = 0.0002$ ). El análisis post-hoc de Mann-Whitney reveló que el veneno contenía las concentraciones más altas de Pb, siendo significativamente mayor que las encontradas en el cascabel, la muda de piel y el cuerpo completo

( $p = 0.004$  para cada comparación). Se realizó el cálculo para determinar el BAFA de las concentraciones de Pb en los diferentes biomarcadores respecto a las concentraciones del metal en el suelo de la zona (Tabla 19).

Tabla 19 Factores de bioacumulación (BAFA) de Pb en los diferentes tejidos de *C. aquilus* respecto al suelo (zona de matorral). Concentración interna (CINT) y concentración de exposición (CEXP) se expresan en mg/Kg ( $\bar{x} \pm S$ ).

	Cascabel	Veneno	Muda de piel	Cuerpo completo
$C_{INT}$ (mg/Kg)	$289.63 \pm 98.86$	$1131.60 \pm 499.28$	$62.93 \pm 34.03$	$48.30 \pm 11.57$
$C_{EXP}$ (mg/Kg)		$32.64 \pm 5.74$		
BAFA	8.87	34.66	1.92	1.47

Los BAFA de Pb evidencian bioacumulación en los biomarcadores analizados, con el veneno presentando el mayor BAFA (34.66 órdenes de magnitud), seguido por el cascabel (8.87 órdenes de magnitud), mientras que la muda de piel y el cuerpo completo mostraron los BAFA más bajos (Tabla 19). Además, el análisis de Mann-Whitney indicó que las concentraciones de Pb en el veneno y en el cascabel fueron significativamente mayores que en el suelo, mientras que las concentraciones en la muda de piel y en el cuerpo completo no fueron significativamente distintas del suelo. El análisis de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Mann-Whitney compararon las concentraciones promedio de Cd, Hg y Pb en cada biomarcador. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los MIT para el cascabel, la muda de piel y el cuerpo completo. Sin embargo, el veneno sí presentó diferencias significativas entre los tres metales analizados ( $p = 0.0124$ ), siendo Pb el metal con concentraciones significativamente más altas que Cd y Hg ( $p = 0.030$ ). Este estudio representa el primer reporte de concentraciones de MIT en cascabel y veneno de serpientes, estructuras que, al carecer de terminaciones nerviosas, pueden muestrearse sin causar daño al animal. También es relevante mencionar que esta estructura está

conformada por segmentos huecos de queratina la cual se forma cada que las serpientes mudan de piel (Fernández-Badillo, 2011; Ibarra-Bautista et al., 2021).

La queratina es la proteína presente en tejidos y estructuras como la epidermis, el pelo, las uñas, pezuñas, garras, caparazones, exoesqueletos de invertebrados, plumas de aves, entre otros. Varios trabajos ya han demostrado que las estructuras queratinosas tienden a acumular MIT, tal es el caso de Fonseca, 2018; quien determino concentraciones de MIT en plumas de *Athene cunicularia*. Lo cual corresponde con los resultados obtenidos en el presente trabajo

En el caso particular de las serpientes, se ha demostrado de que la muda de piel puede ser un biomarcador no letal y no invasivo para estudios concernientes a la ecotoxicología (Burger et al., 2017; Campbell et al., 2005; Holladay, 2006; Jones y Hopkins et al., 2001). Sin embargo, estudiar las concentraciones de metales pesados en serpientes, a través de la muda de piel, representa una gran dificultad metodológica, principalmente porque no se tiene certeza sobre cuando se da el proceso de muda en los animales y al ser un deshecho orgánico, el tiempo en el que una muda pueda estar disponible para los investigadores se vuelve incierto, llegando a obtener un tamaño de muestra reducido. Así mismo, el cascabel de las serpientes es una estructura relativamente fácil de obtener y la cual no implica ningún tipo de daño a los animales, pues este no cuenta con terminaciones nerviosas y se recupera con cada muda.

Por otro lado, el veneno de las serpientes es un compuesto constituido por un 90% de proteína en su peso seco (Borja et al., 2016), por lo que los MIT pueden mostrar afinidad química hacia este fluido biológico. Los MIT presentan afinidad hacia las proteínas debido a su capacidad para formar enlaces coordinados con los grupos funcionales de los aminoácidos presentes en las proteínas, como los grupos sulfhidrilos, carboxilo y amino. Así mismo, existen diversos trabajos en donde se reportada la presencia de MIT en fluidos ricos en proteínas, tales como la leche. Sin embargo, hasta ahora, no se había realizado ninguna determinación de este tipo de contaminantes en el veneno de las serpientes.

Los BAFA determinados para cada biomarcador, demostraron un efecto de bioacumulación de los MIT en los tejidos de las serpientes de ambas zonas. Respecto a ello, en este trabajo se encontraron concentraciones de MIT muy semejantes a las reportadas en trabajos anteriores respecto al cuerpo completo (Burger et al., 2005; 2017). Sin embargo, las mudas de piel analizadas se encontraron con concentraciones mayores a las reportadas. Aunque no se encontraron trabajos reportados para

ninguna especie del género *Crotalus*, esta podría ser una variable a considerar debido a la dieta tan variada que poseen estos animales (Mociño-Deloya et al., 2008), la cual pueda estar potenciando un efecto de biomagnificación de los MIT en los organismos de estudio. Para poder determinar esta relación, sería necesaria una investigación que abarque el análisis de las posibles presas de *C. aquilus* de forma que se pueda determinar un factor de biomagnificación.

A excepción de los cascabeles recolectados en la zona de matorral, los biomarcadores propuestos resultaron ser marcadores de bioacumulación efectivos, pues se detectaron en ellos concentraciones de MIT por encima de las concentraciones detectadas en el suelo. En la mayoría de los casos de ambas zonas de estudio, los biomarcadores propuestos exhibieron las concentraciones más altas de MIT en comparación con los biomarcadores conocidos. Particularmente, en el caso del veneno, esto puede deberse a la afinidad hacia las proteínas que caracteriza a los MIT y a la composición propia del veneno. Por otro lado, en el caso de los cascabeles; estas estructuras, a diferencia de la muda de piel, son formadas por la acumulación de ecdisis (muda) y no son desechadas, lo que podría suponer una acumulación progresiva de los contaminantes por cada nuevo segmento del cascabel formado. Con base en lo anterior, podemos considerar al veneno y al cascabel como potenciales biomarcadores novedosos, poco invasivos y no letales para estudios ecotoxicológicos en serpientes.

Al ser un área poco estudiada, no se cuentan con reportes sobre los efectos esperados que las concentraciones de MIT observadas puedan tener sobre las poblaciones de *C. aquilus*, por lo que se aplicará una evaluación del daño genotóxico medido a través de la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica, en serpientes en condiciones de exposición.

#### 4. Conclusiones del capítulo

1. *Crotalus aquilus* demuestra una capacidad significativa de bioacumular metales de interés toxicológico (MIT) en los tejidos y fluidos evaluados, con una variación en los niveles de acumulación de acuerdo con el biomarcador analizado y la zona de hábitat, destacando el uso del cascabel y el veneno como biomarcadores de exposición no letales y prometedores para el monitoreo ambiental.
2. Las concentraciones de cadmio (Cd) y plomo (Pb) fueron detectables en todos los biomarcadores analizados en ambas zonas de estudio (bosque y matorral). En contraste, el mercurio (Hg) solo se detectó en el veneno y en el cuerpo completo de los ejemplares provenientes de la zona de matorral, lo cual sugiere una baja afinidad de este metal por el cascabel y la muda de piel en las condiciones evaluadas.
3. En la zona de matorral, el cascabel presentó la mayor bioacumulación de cadmio (Cd) entre los biomarcadores analizados, con un BAFA de 225.45. Le siguió el veneno, que mostró los valores más altos de bioacumulación para mercurio (Hg) y plomo (Pb), lo que sugiere una elevada afinidad del veneno por estos metales inorgánicos traza (MIT). En contraste, en la zona de bosque, el veneno registró las mayores concentraciones de Pb, lo que indica una posible variación en la acumulación de metales en función del entorno.
4. Los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas en las concentraciones de Cd y Pb entre los distintos biomarcadores, especialmente entre el cascabel, el veneno y la muda de piel, lo que sugiere que cada biomarcador refleja un patrón de acumulación específico de MIT, probablemente influenciado por las características estructurales de cada tejido.
5. Los BAFA calculados para Cd, Hg y Pb en cascabel, veneno y en menor medida en la muda de piel y el cuerpo completo, respaldan la utilidad de estos biomarcadores para evaluar la exposición a metales en poblaciones de serpientes. La alta bioacumulación de Pb y Cd en el veneno y el cascabel respalda su validez como indicadores no letales y de bajo impacto en la salud del organismo.
6. La variación en los niveles de MIT entre biomarcadores y zonas sugiere que factores ambientales, como las diferencias en la calidad del suelo y las fuentes de alimento, podrían estar influyendo en la bioacumulación de estos metales en *C. aquilus*, especialmente en entornos donde se sospechan fuentes de contaminación antropogénica.

7. La evidencia obtenida sobre la peligrosidad ambiental de los metales inorgánicos traza (MIT), su capacidad de causar daño y sus respectivos factores de bioacumulación absoluta, respalda la necesidad de evaluar su potencial genotóxico en *Crotalus aquilus*. Esta evaluación complementarí el análisis ecotoxicológico mediante biomarcadores de daño en individuos expuestos, lo que permitiría una comprensión más profunda de los efectos subletales de estos contaminantes en poblaciones de serpientes y contribuiría al diseño de estrategias de conservación en ambientes impactados.

## CAPITULO IV: EVALUACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO EN *Crotalus aquilus*

### 1. Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, pese a la gran importancia ecológica que tienen las serpientes, continúan siendo escasos los estudios ecotoxicológicos en este grupo en particular (Egea-Serrano y Ortiz-Santaliestra, 2013; Ibarra-Bautista et al., 2021). Los estudios revisados para esta investigación han demostrado que la mayoría se enfocan en la bioacumulación, dejando menos explorados los efectos cuantitativos de los contaminantes en individuos o poblaciones completas (Campbell y Campbell, 2002). Esta carencia es crítica, ya que varios metales de interés toxicológico (MIT) pueden inducir daños en el material genético. Gardner y Oberdörster (2006) enfatizan la importancia de evaluar los efectos genotóxicos de los MIT en reptiles, tanto terrestres como acuáticos, ya que, si bien estos efectos genotóxicos han sido ampliamente estudiados en humanos y otros vertebrados como aves, peces y ratones, los estudios en reptiles siguen siendo limitados.

Los efectos genotóxicos de los MIT abarcan mecanismos como la interferencia con la reparación del DNA, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inhibición de la metilación del DNA y la interacción con grupos sulfhidrilo (-SH) (Gardner y Oberdörster, 2006). Por ejemplo, el cadmio (Cd) puede inhibir la actividad de enzimas claves en la reparación del DNA, como la exonucleasa de reparación por escisión de nucleótidos, bloqueando sus sitios activos e impidiendo la capacidad de estas enzimas para reconocer y eliminar el daño en el DNA (Odetti et al., 2024). Tanto el Cd como el mercurio (Hg) pueden estimular la producción de ROS al interactuar con biomoléculas y el metabolismo celular, lo que daña el DNA, oxidando bases nitrogenadas y afectando la estructura de la doble hélice. Los MIT también pueden inhibir las enzimas antioxidantes, provocando un aumento del estrés oxidativo y, en consecuencia, mayor daño en el DNA (Calao y Marrugo, 2015).

Además, el Hg tiene una alta afinidad por los grupos -SH presentes en proteínas y enzimas críticas para la replicación y reparación del material genético, formando enlaces covalentes que afectan su estructura y función, como la inhibición de la DNA polimerasa, necesaria para la replicación (Calao y Marrugo, 2015). También puede interactuar directamente con el DNA, alterando su estabilidad estructural y afectando procesos de replicación y reparación, lo que incrementa la probabilidad de

mutaciones y daños genéticos. Por su parte, el plomo (Pb) puede intercalarse entre las bases del DNA, distorsionando su estructura y afectando funciones críticas. Este MIT también puede unirse a enzimas de reparación como la DNA polimerasa y la topoisomerasa, bloqueando su actividad y dificultando la capacidad celular para reconocer y reparar daños (Calao y Marrugo, 2015).

La interpretación de la morfología de células sanguíneas, en particular de los eritrocitos, se ha convertido en un valioso bioindicador de daño no letal de genotoxicidad inducida por contaminantes ambientales. En los últimos años, se ha empleado el análisis de cambios en los núcleos de eritrocitos para evaluar efectos genotóxicos de distintos compuestos, incluyendo MIT (Gardner y Oberdörster, 2006). Otra técnica específica utilizada es el ensayo de micronúcleos en sangre periférica utilizada como biomarcador de daño en un amplio número de biomodelos, que detecta estructuras nucleares adicionales formadas durante la división celular debido a la rotura cromosómicas (efecto clastogénico) o por problemas en la segregación (efecto aneugénico). Estos micronúcleos contienen fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no se incorporaron correctamente en las células hijas, alterando la información genética de las células resultantes (Gardner y Oberdörster, 2006).

El ensayo de micronúcleos se realiza observando eritrocitos teñidos para identificar micronúcleos, que son evidencia de daño genético (Dacie et al., 1984). Esta técnica se ha aplicado en peces, aves y mamíferos, pero es poco común en estudios con anfibios y reptiles. Pese a esto, algunos trabajos han evaluado la frecuencia de micronúcleos (fMN) en reptiles, particularmente en caimanes, tortugas y algunas especies de serpientes (Hayretdağ et al., 2014; Hernández-Guzmán et al., 2015; López-González et al., 2017; Poletta, 2011; Strunjak-Perovic et al., 2010; Shaumburg et al., 2012, 2014; Zapata et al., 2016; Zúñiga-González et al., 2000, 2001).

La formación de micronúcleos ocurre debido a factores endógenos y exógenos que comprometen la integridad del DNA (Odetti et al., 2024). De manera endógena, pueden generarse errores durante la replicación del DNA, recombinación no homóloga o roturas cromosómicas mal reparadas, lo que justifica su aparición espontánea en condiciones de control. Durante la mitosis, los daños en el DNA, causados por radicales libres o mutágenos endógenos, pueden producir fragmentos de cromosomas que no se integran en los núcleos de células hijas, formando micronúcleos (Calao y Marrugo, 2015).

Los contaminantes ambientales como los MIT representan fuentes de estrés oxidativo y por lo tanto un potencial daño genotóxico, que puede verse reflejando con la frecuencia de micronúcleos (Calao y Marrugo, 2015). Estos agentes actúan directamente sobre el DNA, causando roturas, modificaciones en bases nitrogenadas o interfiriendo con los mecanismos de reparación, exacerbando los efectos genotóxicos (Calao y Marrugo, 2015).

Actualmente, existe actualmente un creciente interés por estudiar la ecotoxicología en reptiles, dada su fisiología y ecología, que los convierte en indicadores valiosos de la contaminación ambiental (Quiróz-Herrera y Palacio-Baena, 2017). Sin embargo, la información sobre los efectos genotóxicos en poblaciones silvestres de reptiles es aún limitada a escasa (Torres-Bugarin y Arias-Ruiz, 2023). A pesar de esta limitación, estudios recientes han descrito la fMN en serpientes y otros reptiles en condiciones silvestres y de cautiverio, con resultados prometedores que sugieren la utilidad del ensayo de micronúcleos como bioindicador de daño genotóxico.

El presente capítulo se centra en la evaluación de la frecuencia de micronúcleos (fMN) en sangre periférica de *Crotalus aquilus* como biomarcador de daño genotóxico, en el contexto de exposición ambiental a cromo (Cr), mercurio (Hg) y plomo (Pb). Esta aproximación permitirá valorar el potencial de la especie como bioindicador útil en estudios ecotoxicológicos, particularmente en ambientes contaminados con metales pesados.

## 2. Material y método

### 2.1 Recolecta de las muestras sanguíneas

Se evaluó la sangre de ejemplares silvestres en condiciones de exposición de la zona de bosque y de la zona de matorral, las muestras sanguíneas fueron obtenidas de los ejemplares que se encontraron a finales del periodo de recolecta febrero-agosto 2022 y en el periodo de recolecta febrero-agosto 2023. La extracción de sangre se realizó poco después de la captura de los ejemplares y mientras estos permanecían entubados. La sangre fue extraída de la vena caudal (Figura. 37) y se recuperó mediante la utilización de tubos capilares heparinizados, posteriormente se realizó un frotis en un porta objetos, se dejaron secar a temperatura ambiental por 15 min y después fueron trasladados al laboratorio.

Para el control, se extrajo sangre periférica de dos ejemplares de *Crotalus aquilus* en condiciones de cautiverio, depositados en el Herpetario Xplora-Reptilia, que cumpliera con requisitos de ser adulto sano y no haber estado expuesto a algún estresor ambiental en al menos 6 meses.

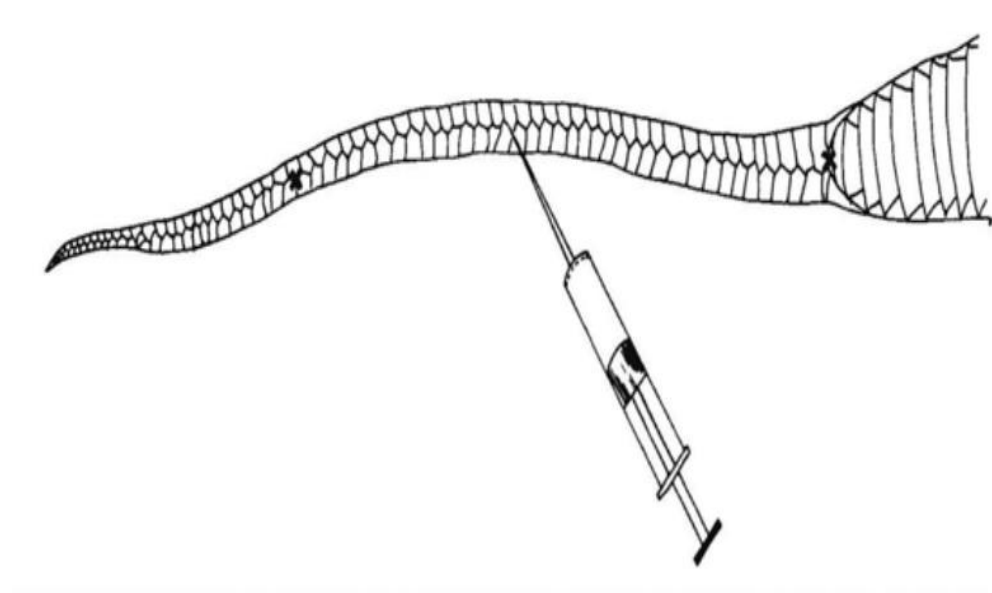


Figura 37 Esquema para la obtención de sangre periférica de serpientes (Varela, 2002).

### 2.3 Preparación de la muestra

Se realizaron preparaciones de sangre periférica de *C. aquilus* por triplicado en portaobjetos limpios por cada uno de los ejemplares muestreados.

Las muestras de sangre obtenidas se depositaron en portaobjetos previamente marcados con el registro de los ejemplares, haciendo uso de la técnica de frotis, posteriormente, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos (Figura. 38) (Dacie et al., 1984; Hayretdağ et al., 2014).



Figura 38 Muestra de sangre periférica de *C. aquilus* en frotis sobre portaobjetos.

Consecutivamente al secado, las muestras fueron cubiertas con etanol al 100% durante 15 minutos para su fijado. Terminado el proceso de fijación, las muestras fueron sumergidas en cubetillas de tinción con colorante de Giemsa durante 20 minutos (Figura. 39) (Dacie et al., 1984; Hayretdağ et al., 2014).



Figura 39 Muestra de sangre periférica de *C. aquilus* en tinción con colorante Giemsa.

Una vez concluido el tiempo de tinción, las muestras fueron retiradas de las cubetillas y se enjuagaron con agua destilada para, posteriormente, se dejaron secar a temperatura ambiente, sin cubreobjetos, durante una hora (Figura. 40), según el método descrito por Dacie et al. (1984) y Hayretdağ et al. (2014).

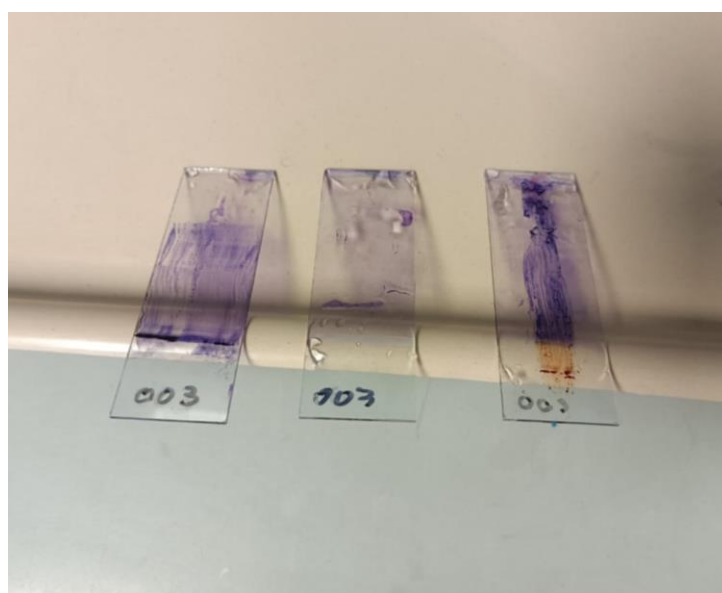


Figura 40 Preparaciones de sangre periférica de *C. aquilus*.

## 2.4 Observación al microscopio

Para determinar la frecuencia espontanea de micronúcleos (fMN), se cuantificaron un total de 2000 eritrocitos de cada portaobjetos, y como se realizó por triplicado, se obtuvo un conteo total de 6000 eritrocitos por cada serpiente analizada. Estas preparaciones fueron observadas en microscopio óptico con un aumento de 60x y 100x. La fMN, expresada como porcentaje (%) se obtuvo mediante la siguiente ecuación (Hayretdağ et al., 2014):

$$fMN = NMN/NC \times 100$$

Donde:

fMN = Frecuencia espontanea de micronúcleos

NMN = Promedio del número de micronúcleos observados

NC = Número de células contabilizadas (2000 células por portaobjetos, por triplicado)

Los micronúcleos se determinaron con base en los criterios establecidos por Gardner y Oberdörster (2006) y Odetti et al., 2024 quienes mencionan que un micronúcleo se identifica como un cuerpo citoplasmático de naturaleza nuclear, el cual posee un tamaño proporcional a menos de un tercio del núcleo celular, de forma redondeada; con presencia de cromatina, identificable al teñir con colorante Giemsa; con una ubicación bien definida, es decir que no presente uniones al núcleo ni a la membrana celular y que, además, no presente nucleolos.

## 2.5 Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los datos de fMN correspondientes a cada grupo (bosque, matorral y control), con base en la naturaleza de los datos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para evaluar diferencias entre los tres grupos y la prueba de Mann-Whitney U para realizar comparaciones por pares (Hayretdağ et al., 2014; Strunjak-Perovic et al., 2010).

Estas pruebas estadísticas se seleccionaron por su robustez frente a distribuciones no normales y su amplio uso en estudios de biomarcadores genotóxicos en organismos silvestres, especialmente en condiciones ambientales variables (Fenech, 2000; OECD, 2016).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Obtención de muestras y observación al microscopio

Se obtuvieron muestras de sangre de los ejemplares identificados como PECA 009, PECA 013 y el control (Figura. 41).

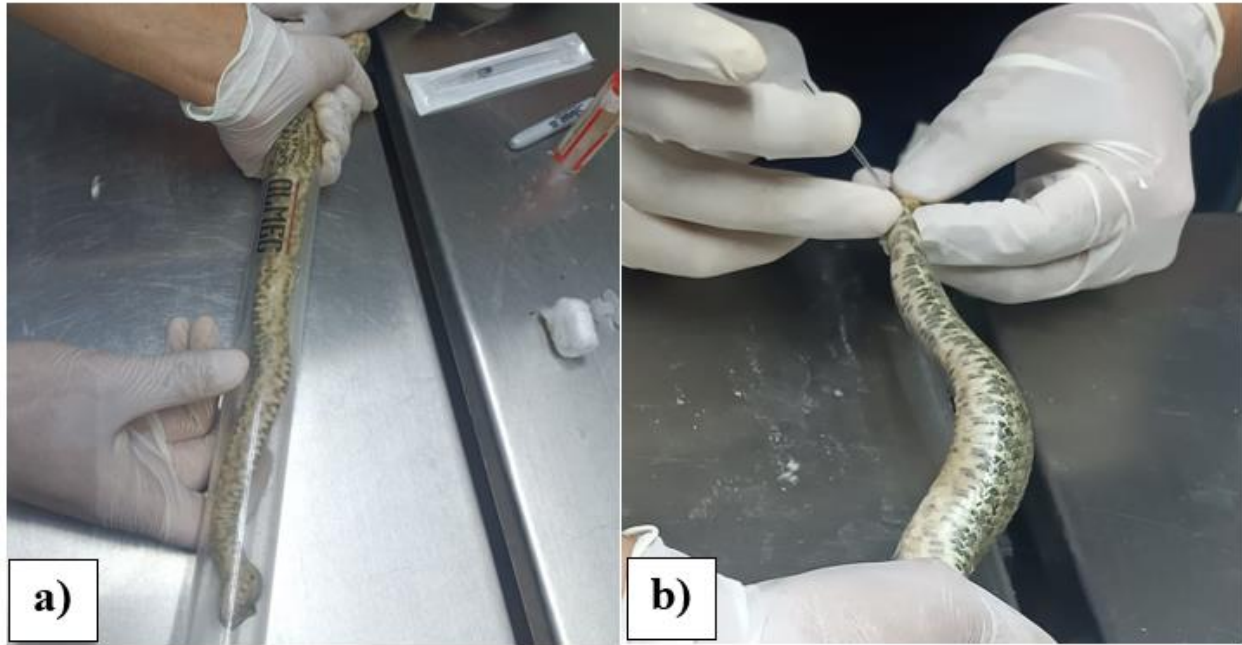


Figura 41 a) Inmovilización para la toma de muestra. b) Toma de muestra de sangre periférica mediante la vena caudal.

Tras el análisis en microscopio de las muestras sanguíneas se observaron eritrocitos nucleados de la sangre periférica de los ejemplares de *C. aquilus*. Existen pocos trabajos en donde se refiera a la aplicación de la técnica de micronúcleos de sangre periférica en reptiles, sin embargo, los estudios consultados para esta investigación, describen de manera detallada las características de las células de este grupo de animales, así como las fMN obtenidas para evaluaciones de genotoxicidad. La forma y tamaño de las células fueron acordes a lo reportado anteriormente por Hayretdağ et al. (2014), Odetti et al. (2024), y Strunjak-Perovic et al. (2010) referente a células sanguíneas sanas de diferente grupo de reptiles.

De igual manera, se logró determinar la presencia de micronúcleos en cada uno de los portaobjetos replicados y analizados, tanto de las muestras obtenidas de los ejemplares en condiciones de exposición, de las zonas de bosque y matorral (Figura. 42 y 43), como de la muestra obtenida del ejemplar control (Figura. 44).

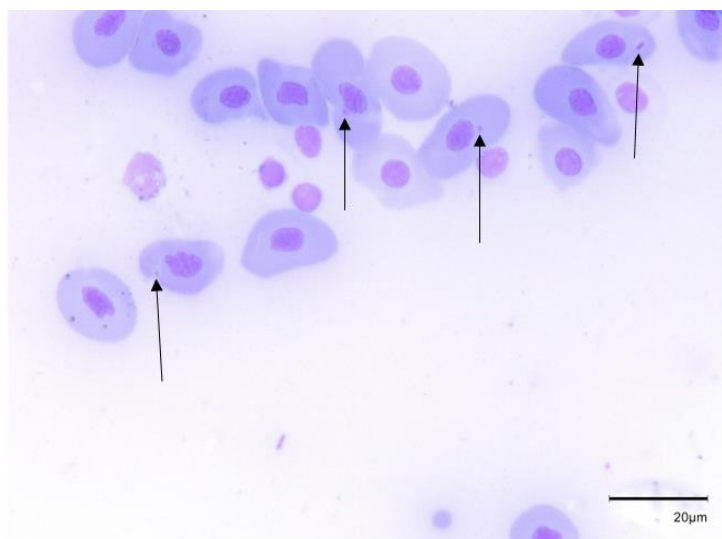


Figura 42 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar PECA 009 (zona de bosque), observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos.

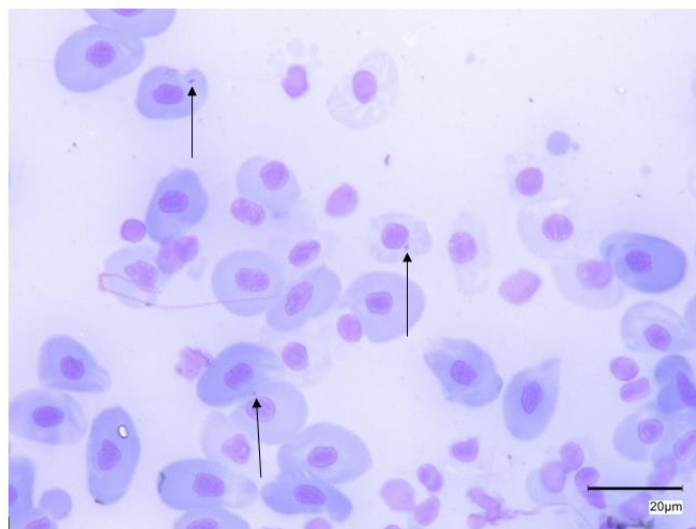


Figura 43 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar PECA 013 (zona de matorral), observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos.

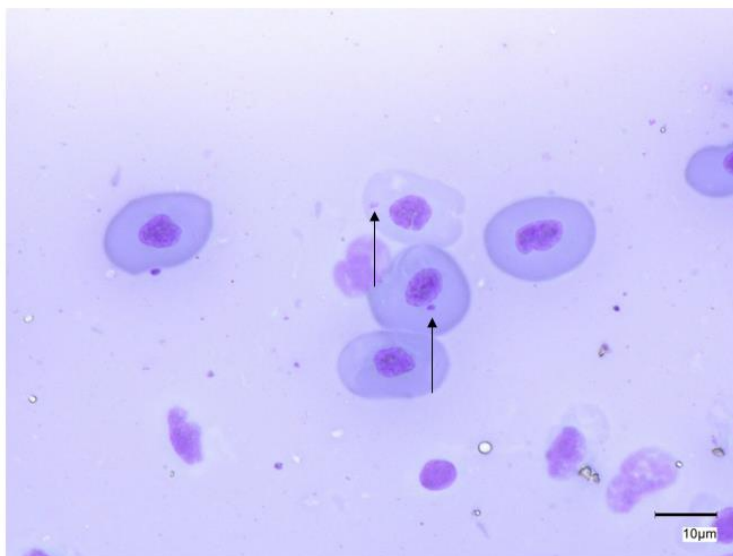


Figura 44 Eritrocitos de sangre periférica del ejemplar control, observación en microscopio óptico a 60 x, se señalan los micronúcleos.

### 3.2 Análisis estadístico.

Para evaluar el daño genotóxico en *Crotalus aquilus* expuesto a metales pesados (Cr, Hg y Pb), se analizó la frecuencia de micronúcleos (fMN) en sangre periférica. Los ejemplares provenientes de ambientes contaminados (bosque y matorral) presentaron valores de fMN más elevados en comparación con los individuos del grupo control. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que los datos no seguían una distribución normal ( $p > 0.05$ ). La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de micronúcleos entre los grupos analizados. Posteriormente, la prueba de Mann-Whitney mostró que las fMN observadas en los ejemplares del grupo control fueron significativamente menores en comparación con las de los individuos silvestres ( $p = 0.0072$ ), así mismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las fMN de los ejemplares procedentes de las zonas de bosque y matorral.

### 3.3 Evaluación de la genotoxicidad

A continuación, en la Tabla 20, se presentan el análisis de genotoxicidad a través de la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos (fMN) de sangre periférica de *C. aquilus*. En donde se observa que la presencia de micronúcleos en las muestras de serpientes en ambas zonas de estudio

y en el grupo control, además de que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo mayor en la zona de bosque que en la de matorral, evidenciando la presencia de factores ambientales a los que están expuestos estos organismos a lo largo de su vida y que tiene un potencial genotóxico en esta especie.

Tabla 20 Frecuencia de micronúcleos (fMN) en *C. aquilus*, en ambas zonas de estudio (bosque y matorral) de la Comarca minera, Hidalgo y el control negativo.

Preparaciones	No. De células contabilizadas	No. de micronúcleos		
		Bosque	Matorral	Control (-)
p1	2000	44	22	7
p2	2000	37	28	5
p3	2000	40	31	4
$\bar{x}$		*40.33 $\pm$ 3.51	*27.00 $\pm$ 4.58	5.33 $\pm$ 1.52
fMN		2.01	1.35	0.26

(\*) valores significativamente mayores al control ( $p = 0.0072$ ),  $\bar{x}$  promedio del número de micronúcleos observados por muestra  $\pm$  su desviación estándar, (fMN) frecuencia espontánea de micronúcleos (%).

La fMN obtenida para el ejemplar control (0.25%) (Tabla 19), fue muy similar a lo reportado anteriormente por Hayretdağ et al. (2014), quienes analizaron tres diferentes especies de serpientes de la familia Natricidae (*Coronella austriaca*, *Dolichophis schmidt* y *Natrix tessellata*) en estado silvestre y sin alguna condición de exposición, obteniendo las siguientes fMN:  $0.25 \pm 0.09$ ,  $0.13 \pm 0.07$  y  $0.30 \pm 0.08$  respectivamente para cada especie analizada. De igual forma, las fMN obtenidas en otros grupos de reptiles (como los caimanes y las tortugas) en estado silvestre y sin exposiciones significativas, son semejantes a las obtenidas en *C. aquilus* en estado de cautiverio. Por ejemplo, Castaño et al. (2020) reportan las fMN de la tortuga *Phrynops hilarii* con una media de  $0.17 \pm 0.07$ .

Para el caso del análisis de genotoxicidad de los ejemplares en condiciones de exposición, estos mostraron fMN más altas que las observadas en el control. Se aplicó un test de normalidad de Shapiro-Wilks a los resultados de cada muestra analizada, el mismo determinó que los datos obtenidos para bosque, matorral y el control no siguen una distribución normal ( $p = 0.8428$ ,  $p = 0.6369$ ,  $p = 0.6369$  respectivamente). Posteriormente, se aplicó una prueba de varianza de Kruskal-Wallis, la cual demostró diferencias significativas en las diferentes fMN obtenidas. Tras la

aplicación de una prueba de Mann-Whitney, se demostró que las fMN del control son significativamente menores a las obtenidas en las serpientes de estado silvestre ( $p = 0.0072$ ). La misma prueba reveló que no existen diferencias significativas entre las fMN obtenidas de los ejemplares de las zonas de bosque y matorral.

Estas fMN observadas en los ejemplares en condiciones de exposición son semejantes a lo reportado anteriormente en diferentes reptiles evaluados en condiciones de exposición a contaminantes, dentro de los que destacan agroquímicos y MIT. Ante estos resultados, varios autores destacan que el aumento en la fMN observados, podría estar fuertemente asociado a las actividades antropocéntricas que supeditan la liberación de contaminantes (Castaño et al., 2020; López-González et al., 2017; Strunjak-Perovic et al., 2010).

Si bien, las fMN se han utilizado para la evaluación de la genotoxicidad en diferentes taxones animales y vegetales, hace falta un estudio de mayor profundidad que considere diferentes marcadores de daño genotóxico, como podrían ser diferentes aberraciones celulares consideradas en otros estudios, que sean igualmente fáciles de evaluar y que no requieran muestras invasivas o letales para los animales. De esta forma, la evaluación genotóxica podría robustecerse sin necesidad de la aplicación de metodologías agresivas para los taxones estudiados.

#### 4. Conclusiones del capítulo

1. La evaluación genotóxica realizada en ejemplares de (*Crotalus aquilus*) expuestos a condiciones naturales mostró un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos (fMN) en comparación con los individuos mantenidos en cautiverio (grupo control). Estos resultados sugieren una exposición a agentes genotóxicos en el ambiente, siendo más pronunciada en la zona de bosque que en la de matorral.
2. Los resultados indican que los metales de interés toxicológico (MIT) presentes en ambas zonas podrían estar afectando negativamente la salud de las poblaciones de *C. aquilus*, incluso cuando sus concentraciones se encuentran por debajo de los límites permisibles establecidos por la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004. Esta situación puede explicarse por la persistencia, biodisponibilidad y bioacumulación de los MIT, así como por las características alimenticias y etológicas propias de la especie.
3. Aunque la frecuencia de micronúcleos fue mayor en las zonas de bosque y matorral respecto al control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas, lo que podría atribuirse al tamaño reducido de la muestra y a posibles diferencias en las condiciones ambientales entre sitios.
4. La prueba de micronúcleos en sangre periférica resultó ser un método eficaz, no letal y poco invasivo para la evaluación de la genotoxicidad inducida por MIT en *C. aquilus*. No obstante, es fundamental que los investigadores cuenten con experiencia en la obtención de muestras de sangre para evitar comprometer la salud de los ejemplares, recomendando limitar a dos intentos el proceso de extracción en un día.
5. El tamaño de muestra limitado implica incertidumbre en la interpretación de los resultados, especialmente en la comparación entre zonas. Futuros estudios deben ampliar el número de ejemplares para obtener resultados más robustos y representativos de las poblaciones estudiadas.
6. Se destaca la necesidad de complementar la evaluación genotóxica con otros biomarcadores de daño celular, como aberraciones cromosómicas o daño al ADN, para lograr una caracterización más integral del impacto de los MIT en serpientes. Asimismo, se enfatiza la importancia de seguir desarrollando métodos no letales que garanticen la conservación de las especies sin comprometer su bienestar.

## DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio representa la primera evaluación ecotoxicológica en serpientes de montaña, específicamente en *Crotalus aquilus*, consolidándose como una contribución pionera al conocimiento sobre los efectos de los metales de interés toxicológico (MIT) en reptiles del género *Crotalus*. Las características ecológicas, fisiológicas y tróficas de las serpientes las convierten en excelentes organismos centinela, especialmente por su rol como depredadores de segundo y tercer grado y su capacidad para acumular contaminantes a lo largo de su vida, lo que permite detectar procesos de biomagnificación en los ecosistemas que habitan (Hopkins et al., 2001; Grillitsch y Schiesari, 2010; Schneider et al., 2013). El carácter no letal de los biomarcadores utilizados y el enfoque integral de este trabajo refuerzan su potencial metodológico para evaluar el riesgo ecológico y sanitario en zonas contaminadas.

Los resultados del primer capítulo revelaron la presencia de cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) en el suelo de la zona de estudio, incluso cuando las concentraciones estuvieron por debajo de los límites permisibles establecidos por la normatividad. Esta aparente baja concentración no implica ausencia de riesgo, ya que los MIT pueden ser biodisponibles dependiendo de múltiples factores como el pH, contenido de materia orgánica, textura del suelo, y sobre todo el contexto geohistórico y de uso de suelo del sitio. La zona evaluada pertenece a la Comarca Minera de Hidalgo, con un antecedente importante de actividad minera histórica. Diversos estudios han señalado que los suelos de regiones con actividad minera antigua pueden actuar como reservorios de metales pesados que permanecen activos durante décadas (Boening, 2000; Grillitsch y Schiesari, 2010). Asimismo, la presencia de cultivos adyacentes con posible uso de agroquímicos como fertilizantes fosfatados y pesticidas, también se plantea como una fuente relevante de metales como Cd y Pb (Grillitsch y Schiesari, 2010). Estas fuentes combinadas justifican la evaluación del riesgo ecológico, ya que los MIT, aún en concentraciones bajas, pueden generar efectos acumulativos y subletales en la biota expuesta (ATSDR, 2005; Newman, 2015). En este contexto, los resultados obtenidos justificaron plenamente la necesidad de continuar con una evaluación enfocada en la exposición biológica y sus efectos.

En la evaluación de la vulnerabilidad y exposición de *Crotalus aquilus*, se destaca como uno de los principales aportes de este trabajo la generación de información ecológica y morfológica inédita para la especie. Dado que la literatura disponible es escasa, se realizó una revisión documental exhaustiva para establecer parámetros claves como dieta, hábitat, comportamiento y estrategias

reproductivas. Esta información permitió aplicar con rigor metodológico indicadores como el Índice de Vulnerabilidad y el Riesgo de Exposición, los cuales dependen directamente de las características específicas del organismo (Grillitsch y Schiesari, 2010; Hopkins, 2000). Por ejemplo, el comportamiento sedentario, la fidelidad al hábitat y la ectotermia hacen de las serpientes organismos particularmente susceptibles a la bioacumulación de contaminantes, ya que presentan una baja tasa de eliminación y una alta eficiencia de conversión tisular (Hopkins, 2006; Hsu et al., 2006). Adicionalmente, su dieta generalista y su rol trófico alto las expone a contaminantes acumulados en sus presas, favoreciendo el fenómeno de biomagnificación (Campbell y Campbell, 2001). La evidencia compilada hasta este punto justifica el análisis de los biomarcadores no letales, como herramienta esencial para verificar la bioacumulación real en los tejidos expuestos.

La bioacumulación de MIT en tejidos de *C. aquilus* fue evaluada mediante tres biomarcadores no letales: muda de piel, cascabel y veneno. La comparación entre estas matrices mostró diferencias significativas en la acumulación de metales. De manera general, el cascabel registró las concentraciones más altas, posiblemente debido a su crecimiento segmentado y continuo que conserva tejido queratinoso de mudas previas, funcionando como un reservorio acumulativo natural (Fonseca, 2018; Jones y Holladay, 2006). Esta característica es especialmente valiosa, ya que permite evaluar la exposición histórica del organismo sin necesidad de métodos invasivos. El veneno presentó niveles significativamente más altos de MIT (particularmente de Hg y Cd) en comparación con la muda de piel y el cuerpo completo, lo cual es relevante dado que el veneno está compuesto en su mayoría por proteínas con alta afinidad por estos metales (Borja et al., 2016). Aunque se han documentado niveles de Hg en tejidos de serpientes en otras especies (*Nerodia sipedon* y *Agkistrodon piscivorus*), el uso del veneno como biomarcador había sido escasamente explorado. Estudios recientes han comenzado a utilizar matrices no letales como la piel y la sangre para evaluar contaminantes, demostrando su utilidad tanto en serpientes acuáticas como terrestres (Burger et al., 2005; Drewett et al., 2013). Los resultados no solo se alinean con esta tendencia, sino que amplían el conocimiento al introducir nuevas estructuras como el cascabel en el repertorio de biomarcadores. Esta innovación metodológica tiene implicaciones clave para el monitoreo ambiental en especies protegidas o difíciles de estudiar.

Finalmente, la evaluación de daño genotóxico mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica demostró que las serpientes expuestas a MIT presentaron una frecuencia

significativamente mayor de micronúcleos que el grupo control. Este hallazgo confirma que la exposición a MIT puede inducir efectos subletales a nivel celular, aun cuando las concentraciones ambientales no excedan los límites normativos. La prueba de micronúcleos ha sido ampliamente utilizada en organismos acuáticos, mamíferos y aves, pero su aplicación en reptiles es todavía incipiente (Fonseca, 2018). Algunos trabajos han documentado la ruptura de cadenas de ADN en serpientes expuestas a metales pesados, como el realizado por Murray et al. (2010) en *Nerodia taxispilota*, lo que coincide con nuestros resultados y sugiere que el daño genético inducido puede ser una manifestación de estrés oxidativo crónico. Dado que los efectos genotóxicos pueden comprometer la reproducción y la viabilidad poblacional a largo plazo, estos hallazgos subrayan la importancia de incluir este tipo de biomarcadores en los estudios ecotoxicológicos en reptiles.

En conjunto, este trabajo confirma el valor de *Crotalus aquilus* como una especie centinela de contaminación ambiental, gracias a su biología especializada, comportamiento sedentario, longevidad, y posición trófica elevada. Los resultados obtenidos validan el uso de biomarcadores no letales como el cascabel y el veneno, lo cual representa un avance técnico que puede ser replicado en otras especies de serpientes. Asimismo, la detección de efectos genotóxicos respalda la necesidad de una vigilancia ambiental constante, incluso en zonas donde los niveles de contaminantes no exceden los límites regulatorios. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones sobre los efectos subletales de los contaminantes en reptiles, la interacción entre factores ecológicos y exposición a metales, y la estandarización de metodologías en herpetofauna, un grupo tradicionalmente marginado en la evaluación de riesgo ecológico. A largo plazo, se recomienda ampliar el tamaño muestral y explorar con mayor profundidad la capacidad bioacumulativa del cascabel, así como evaluar posibles efectos fisiológicos e inmunológicos que podrían comprometer la salud individual y la resiliencia poblacional de las serpientes.

## CONCLUSIONES FINALES

1. Las muestras de suelo recolectadas en la Comarca Minera de Hidalgo revelaron la presencia de Cd, Pb y Hg en ambas zonas de estudio, aunque en concentraciones por debajo de los límites establecidos por la NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004. A pesar de ello, el análisis del cociente de peligro ambiental (CP), el riesgo ecológico potencial (Er) y el índice de riesgo acumulado (ERI) evidenció que el plomo (Pb) fue el metal con mayor persistencia relativa y mayor contribución al riesgo ecológico. Las propiedades fisicoquímicas del suelo (pH ligeramente ácido, textura franca y materia orgánica intermedia) favorecen una movilidad y biodisponibilidad media para los tres MIT, lo que justifica la necesidad de evaluar su impacto en la biota expuesta, particularmente en especies de hábitos terrestres como *Crotalus aquilus*.
2. El análisis de vulnerabilidad y exposición estimó un alto riesgo ecotoxicológico para *C. aquilus*, resultado de su limitada vagilidad, longevidad y dieta basada en múltiples especies potencialmente contaminadas. La construcción de indicadores integrados como PEC, PNEC, RE y HI demostró que el cadmio (Cd) fue el metal con mayor riesgo ecotoxicológico potencial para la especie. La recopilación y análisis de datos ecológicos y morfológicos de la especie, clave para realizar estos cálculos, también contribuye al conocimiento ecológico de las serpientes de cascabel de montaña, un grupo históricamente poco estudiado. Estos resultados justifican la evaluación posterior del impacto de los MIT a nivel tisular mediante biomarcadores de exposición.
3. Se confirmó la presencia de Cd, Pb y Hg en los biomarcadores analizados (cascabel, veneno, muda de piel y cuerpo completo), siendo el cascabel el tejido con mayores concentraciones de los tres MIT, particularmente de H0067. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los biomarcadores, mostrando al cascabel como un marcador acumulativo a largo plazo, dada su estructura queratinizada segmentada, mientras que el veneno, altamente proteico, reflejó una afinidad marcada por Cd y Pb. Estos resultados validan el uso del cascabel y el veneno como biomarcadores no letales, sensibles y eficaces para detectar bioacumulación, incluso cuando las concentraciones en suelo no rebasan los límites normativos.
4. La frecuencia espontánea de micronúcleos (fMN) en sangre periférica de *C. aquilus* fue significativamente mayor en ejemplares silvestres expuestos a MIT en comparación con el grupo control en cautiverio. Las zonas de bosque y matorral presentaron niveles elevados de fMN (2.01% y 1.35% respectivamente), en contraste con el 0.26% del control, lo que indica un efecto genotóxico

atribuible a la exposición ambiental crónica. Estos hallazgos demuestran la sensibilidad de *C. aquilus* al daño genético inducido por contaminantes ambientales, posicionando a esta especie como un modelo valioso para el monitoreo ecotoxicológico de ecosistemas impactados.

5. *Crotalus aquilus* es un organismo bioindicador valioso. Este estudio establece una línea base para futuras investigaciones ecotoxicológicas en reptiles y refuerza la importancia de métodos no letales en contextos de conservación.

## ANEXOS

### 1. Curvas de calibración para las muestras de bosque

Se realizaron las curvas de calibración para cada metal a determinar en las muestras biológicas. A continuación, se muestran los gráficos correspondientes.

Tabla 21 Curva de calibración para Cd con cinco puntos a partir de una concentración de 1.5 mg/L

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	216.0 ± 0.88
Estándar 1	0.70	6794.5 ± 32.88
Estándar 2	0.90	8813.8 ± 71.79
Estándar 3	1.10	10636.4 ± 120.16
Estándar 4	1.30	12357.9 ± 56.36
Estándar 5	1.50	14257.6 ± 179.10

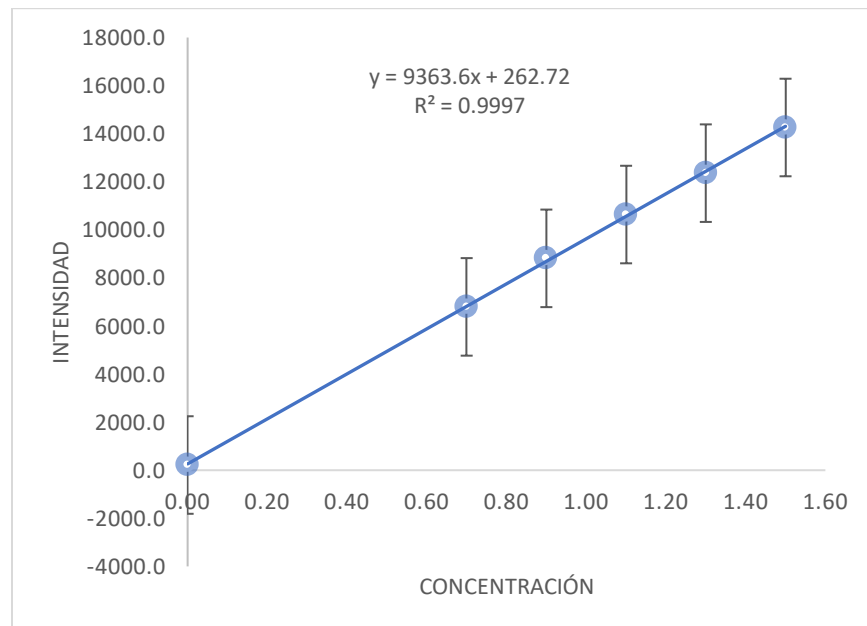


Figura 45 Curva de calibración para Cd.

Tabla 22 Curva de calibración para Hg con cinco puntos a partir de una concentración de 1.5 mg/L

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	30.2 ± 0.54
Estándar 1	0.70	2729.5 ± 40.08
Estándar 2	0.90	3543.5 ± 32.96
Estándar 3	1.10	4301.3 ± 28.87
Estándar 4	1.30	5062.2 ± 71.06
Estándar 5	1.50	5868.0 ± 55.58

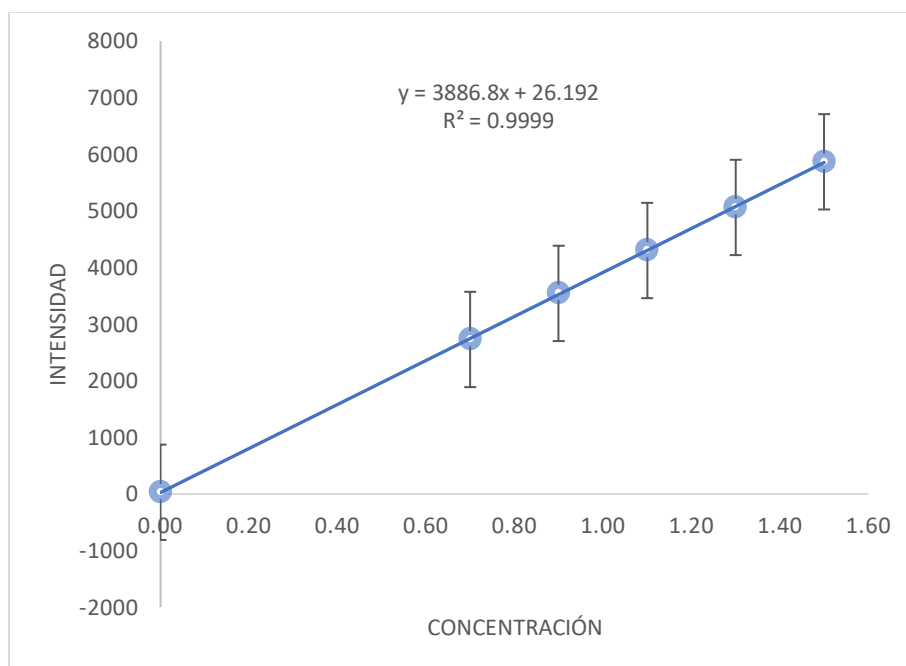


Figura 46 Curva de calibración para Hg.

Tabla 23 Curva de calibración para Pb con cinco puntos a partir de una concentración de 1.00 mg/L.

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	$43.0 \pm 0.29$
Estándar 1	0.70	$2043.0 \pm 4.33$
Estándar 2	0.90	$2629.1 \pm 26.24$
Estándar 3	1.10	$3193.7 \pm 57.99$
Estándar 4	1.30	$3662.3 \pm 45.80$
Estándar 5	1.50	$4031.0 \pm 29.33$

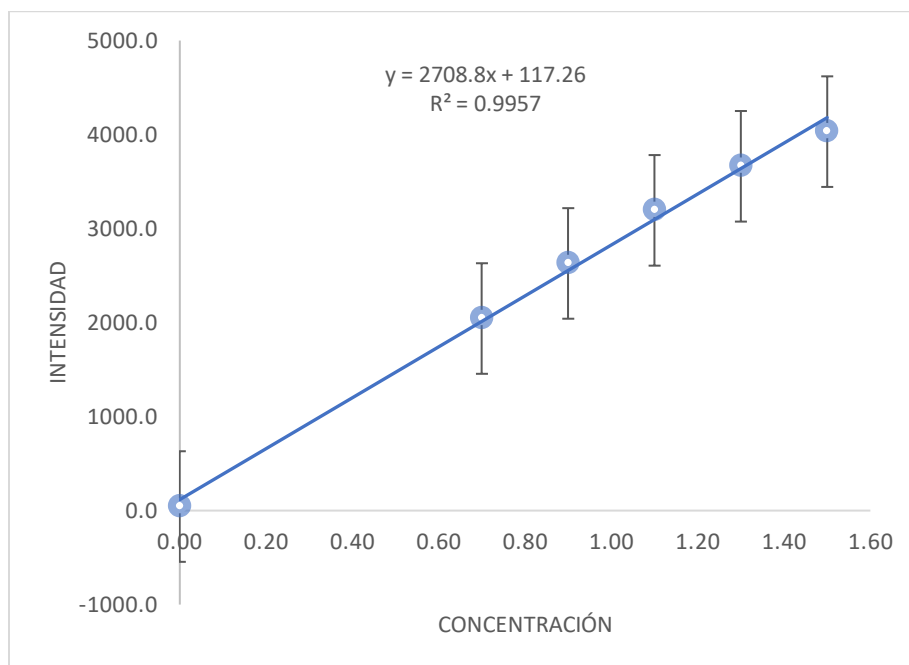


Figura 47 Curva de calibración para Pb.

## 2. Curvas de calibración para las muestras de matorral

Se realizaron las curvas de calibración para cada metal a determinar en las muestras biológicas. A continuación, se muestran los gráficos correspondientes.

Tabla 24 Curva de calibración para Cd con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L.

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	204.1 ± 0.66
Estándar 1	0.70	4312.0 ± 20.83
Estándar 2	0.90	5358.6 ± 46.78
Estándar 3	1.10	6527.9 ± 70.55
Estándar 4	1.30	7463.1 ± 72.25

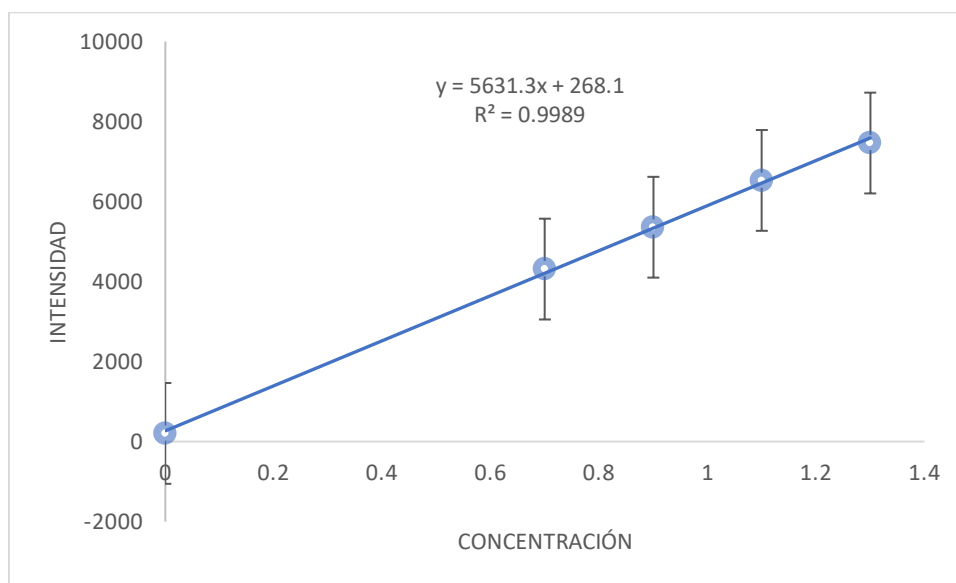


Figura 48 Curva de calibración para Cd.

Tabla 25 Curva de calibración para Hg con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L.

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	$0.00 \pm 0.00$
Estándar 1	0.70	$1850.1 \pm 22.27$
Estándar 2	0.90	$2318.7 \pm 25.82$
Estándar 3	1.10	$2921.7 \pm 21.68$
Estándar 4	1.30	$3331.8 \pm 33.65$

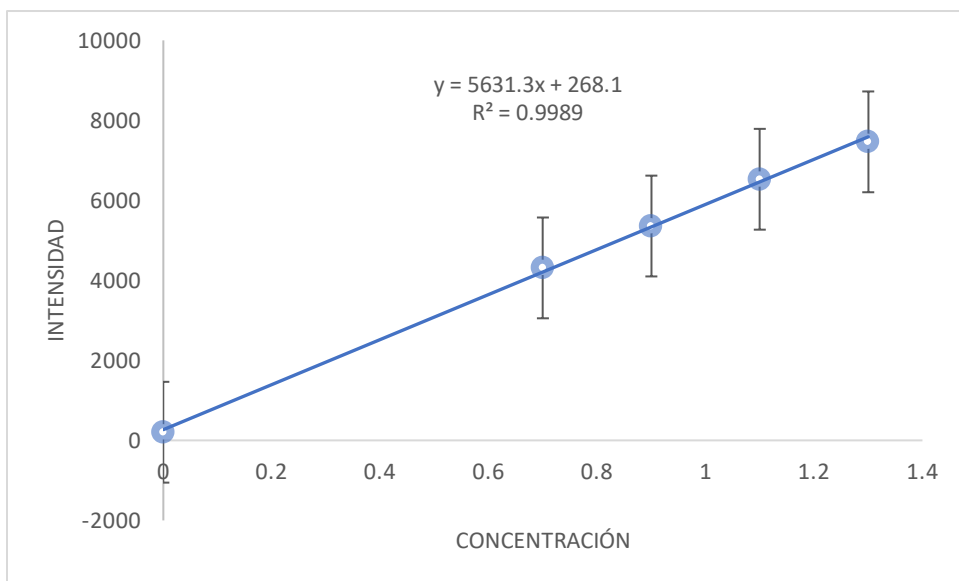


Figura 49 Curva de calibración para Cd.

Tabla 26 Curva de calibración para Pb con cinco puntos a partir de una concentración de 1.3 mg/L.

Muestra	Concentración	Intensidad
Blanco	0.00	$35.4 \pm 0.50$
Estándar 1	0.70	$1115.4 \pm 17.49$
Estándar 2	0.90	$1383.3 \pm 16.90$
Estándar 3	1.10	$1681.0 \pm 23.15$
Estándar 4	1.30	$1917.0 \pm 17.72$

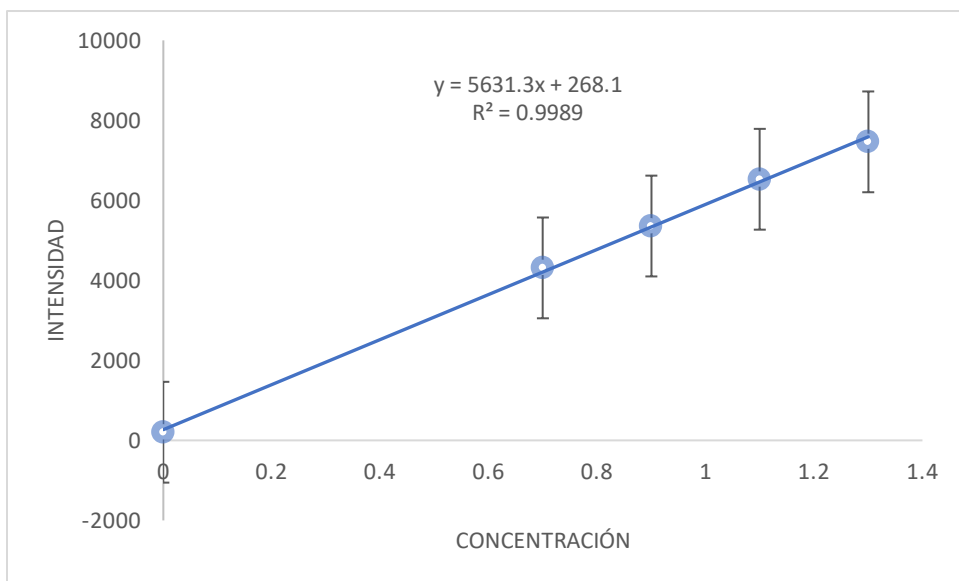


Figura 50 Curva de calibración para Pb.

## Bibliografía

- Acosta, Á. M. (2007). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas del Valle del Mezquital, Hgo (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperada de: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/635/1/Determinacion%20de%20metales%20pesados%20suelos%20agricolas.pdf>[(http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/635/1/Determinacion%20de%20metales%20pesados%20suelos%20agricolas.pdf].
- Adriano, D. C. (1986). Trace elements in terrestrial environments. Springer-Verlag. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1907-9>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2005). Toxicological profiles. <https://www.atsdr.cdc.gov>.
- Aguirre-León, G. (2014). Métodos de estimación, captura y contención de anfibios y reptiles. En S. Gallina-Tessaro y C. López-González (Eds.), Manual de técnicas para el estudio de la fauna (pp. 61–84). INE-SEMARNAT.
- Alloway, B. J. (2013). Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability (3rd ed.). Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>.
- Andrade Linarez, K., Castillo Coaquira, I., y Quispe Riquelme, R. (2020). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas y suelos para cultivo de *Solanum tuberosum* de la bahía interior de Puno. Investigación y Desarrollo, 20(1), 147–153. En: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2518-44312020000100011](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2518-44312020000100011).
- Baker, A. J. M., y Brooks, R. R. (1989). Terrestrial plants that hyperaccumulate metallic elements. The Science of the Total Environment, 87(1), 99–123. DOI: <http://doi.org/10.1002/9783527615919.ch4>.
- Beyer, W. N., Heinz, G. H., y Redmon-Norwood, A. W. (1998). Environmental contaminants in biota: Interpreting tissue concentrations. CRC Press. DOI: <https://doi.org/10.1201/b10598>.
- Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: A review. Chemosphere, 40(12), 1335–1351. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0).

- Borja, M., Castañeda, G., Espinosa, J., Neri, E., Carbajal, A., Clement, H., García, O., y Alagón, A. (2014). Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) with type B venom from Mexico. *Copeia*, 2014(1), 7–13. DOI: <https://doi.org/10.1643/OT-12-041>.
- Burger, J., Campbell, K. R., Campbell, T. S., Shukla, T., Jeitner, C., y Gochfeld, M. (2005). Use of skin and blood as nonlethal indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(2), 232–238. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0098-9>.
- Burger, J., y Gochfeld, M. (2005). Heavy metals in commercial fish in New Jersey: Concentrations and potential health risks. *Environmental Research*, 99(3), 403–411. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.02.001>.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Zappalorti, R., Pittfield, T., y DeVito, E. (2017). Arsenic, cadmium, chromium, lead, mercury and selenium concentrations in pine snakes (*Pituophis melanoleucus*) from the New Jersey Pine Barrens. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4), 586–595. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0398-5>.
- Burger, J., Murray, S., Gaines, K. F., Novak, J. M., Punshon, T., Dixon, C., y Gochfeld, M. (2006). Element levels in snakes in South Carolina: Differences between a control site and exposed site on the Savannah River Site. *Environmental Monitoring and Assessment*, 112(1–3), 35–52. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-006-0695-3>.
- Calao, C. R., y Marrugo, J. L. (2015). Efectos genotóxicos asociados a metales pesados en una población humana de la región de La Mojana, Colombia, 2013. *Biomédica*, 35(2), 139–151. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i0.2392>.
- Campbell, J. A., y Lamar, W. W. (2004). *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Publishing Associates.
- Campbell, K. R., y Campbell, T. S. (2001). The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 70(3), 253–301. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010731409732>.
- Carriquiborde, P. (2021). *Principios de ecotoxicología* (1ª ed.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://www.researchgate.net/profile/Pedro->

[Carriquiriborde/publication/351920003 Principios de Ecotoxicologia/links/60b04a0892851c168e4809d5/Principios-de-Ecotoxicologia.pdf](https://carriquiriborde/publication/351920003/Principios-de-Ecotoxicologia/links/60b04a0892851c168e4809d5/Principios-de-Ecotoxicologia.pdf).

Carlstrom, D., y Edelstam, E. (1946). Methods of marking reptiles for identification after recapture. *Nature*, 158, 748–749. DOI: <https://doi.org/10.1038/158748b0>.

Castellanos, J. Z. (2000). Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas (2.<sup>a</sup> ed.). Intagri, S.C.

Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente / Organización Panamericana de la Salud. (2005). Curso de autoinstrucción: Evaluación del riesgo asociado a contaminantes del aire. CEPIS/OPS. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/21478>.

Clarkson, T. W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34(4), 367–403. DOI: <https://doi.org/10.3109/10408369708998098>.

Coordinación de Estrategias de Biodiversidad y Cooperación-CONABIO. (2021). Resumen de la biodiversidad en Hidalgo. Estudio de estado. CONABIO. Obtenido en: [https://www.biodiversidad.gob.mx/region/eeb/estudios/ee\\_hidalgo](https://www.biodiversidad.gob.mx/region/eeb/estudios/ee_hidalgo).

Covarrubias, S. A., y Peña-Cabriales, J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7–21. DOI: <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp.01.01>.

Delgadillo-Ubaldo, E., y Longar-Blanco, M. D. (2008). Metodología para el análisis de riesgos ambientales. Impacto social en la población del municipio de Ecatepec, Estado de México. México.

Delgado-Mota, O. F. (2014). Cálculo de la permeabilidad de un modelo de membrana celular hacia dos agentes antifúngicos. (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperada de: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/4116>.

De La Peña, D. T., y Herrero-Felipe, O. (2014). Evaluación de la genotoxicidad y mutagenicidad. En Curso Pre-Congreso Experimentación en Toxicología: Modelos tradicionales y alternativos para evaluación de la toxicidad del I Congreso de Toxicología. SOTOX, Santiago de Chile. En: <https://ritsq.org/wp-content/uploads/cd-toxamb/Documentos/07%20Herrero%20FINAL.pdf>.

- Echeverría, F., Velez, A., y Peretti, A. (2016). Ecotoxicological assessment of lead and cadmium bioaccumulation in reptiles. *Journal of Herpetology*, 50(2), 271–280. DOI: <https://doi.org/10.1670/14-126>.
- Egea-Serrano, A., y Ortiz-Santaliestra, M. E. (2013). Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 24(1), 2–34. [http://digital.csic.es/bitstream/10261/132938/1/BAHE24%281%29\\_Invitado.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/132938/1/BAHE24%281%29_Invitado.pdf).
- Fernández-Badillo, L., Morales-Capellán, N., Olvera, C. R., Canales, G. M., y Mayer-Goyenechea, I. (2017). Guía de las serpientes del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Fernández-Badillo, L., Morales-Capellán, N., y Mayer-Goyenechea, I. (2011). Serpientes venenosas del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Fernández-Bremauntz, A., Yarto-Ramírez, M., y Castro-Díaz, J. (2004). Las sustancias tóxicas persistentes. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología.
- Fonseca, L. M. (2018). El tecolote llanero (*Athene cunicularia*) como especie indicadora de contaminación por metales pesados en la ciudad de Pachuca, Hidalgo (Tesis doctoral, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperada de: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/2075>
- Galicia, C. (2023). Una historia ambiental para la “Comarca Minera” en Hidalgo. *Edähi. Boletín Científico de Ciencias Sociales y Humanidades del ICSHu*, 11, 72–83. DOI: <https://doi.org/10.29057/icshu.v.11i22.10091>.
- Gardner, S. C. M., y Oberdörster, E. (2016). *Toxicology of reptiles* (1.<sup>a</sup> ed.). CRC Press. [https://www.researchgate.net/publication/327365619\\_Toxicology\\_of\\_reptiles](https://www.researchgate.net/publication/327365619_Toxicology_of_reptiles).
- Gaytán-Oyarzun, J. C., López-Escamilla, A., López-Herrera, M., Pulido-Flores, G., Monks, S. W., Pérez-Escandón, B., y Villavicencio-Nieto, M. (2012). Evaluación rápida de biodiversidad para estimar prioridad biológica (ERP BIO). En M. L. Sampedro-Rosas y J. González-González (Eds.), *Calidad ambiental y desarrollo sustentable: Indicadores* (Tomo II, pp. s/p). Universidad Autónoma de Guerrero e INDAUTOR.

- Gaytán-Oyarzun, J. C., y López-Herrera, M. (2019). Plaguicidas, uso y potencial de riesgo. En *Sustentabilidad y gestión ambiental* (p. 309). UAZ.
- Gaytán-Oyarzun, J. C., Sánchez-Olivares, M. A., y Cabrera-Cruz, R. B. (2020). Evaluación potencial de riesgo genotóxico de compuestos xenobióticos. En R. Pichardo-Ramírez, R. Tobías-Jaramillo y J. Treviño-Trujillo (Eds.), *Investigaciones actuales para el medio ambiente II* (pp. 85–99). Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- García-Reynoso, J. A., Grutter, M., y Cintora-Juárez, D. (2007). Evaluación del riesgo por contaminantes criterio y formaldehído en la ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, s/n, 169–175. En: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992007000400002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992007000400002&lng=es&tlng=es).
- Giannuzzi, L., Ortega, F., y Ventosi, E. (2018). Principios generales de toxicología. En L. Giannuzzi (Ed.), *Toxicología general y aplicada* (pp. 5–27). Buenos Aires. En: <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/62018giannuzzi-toxicologia-general-y-aplicadaunlp.pdf>.
- González, C., Navedo, J. G., y Casado, F. (2016). Heavy metal accumulation in hair of cattle and its implications in environmental monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(7), 1–11.
- González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., y Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology* (London, England), 19(7), 1238–1248. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0508-x>.
- González-Salazar, I. G., López-Herrera, M., Monks, S., y Pulido-Flores, G. (2015). Presencia de metales pesados en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México. *Estudios en Biodiversidad*, 13. <https://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/13>.
- Gotelli, N. J., y Ellison, A. M. (2004). *A primer of ecological statistics* (479 p.). Sinauer Associates, Inc. DOI: <https://doi.org/10.1198/tas.2005.s32>.

- Goyer, R. A., y Clarkson, T. W. (2001). Toxic effects of metals. En Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons (pp. 811–868). DOI: <https://doi.org/10.12691/jephh-2-3-3>.
- Hakanson, L. (1980). An ecological risk index for aquatic pollution controls: A sedimentological approach. *Water Research*, 14(8), 975–1001. DOI: <https://doi.org/10.1016/0043/1354>.
- Hamid, E., Payandeh, K., Nezhad, M. T., y Saadati, N. (2022). Potential ecological risk assessment of heavy metals (trace elements) in coastal soils of southwest Iran. *Frontiers in Public Health*, 10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.889130>.
- Haskins, D. L., Gogal, R. M., y Tuberville, T. D. (2019). Snakes as novel biomarkers of mercury contamination: A review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 249, 133–152. DOI: [https://doi.org/10.1007/398\\_2019\\_26](https://doi.org/10.1007/398_2019_26).
- Hazrat A., y Ezzat K. (2019) Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs: Concepts and implications for wildlife and human health, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 25:6, 1353-1376, DOI: <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>.
- Heimes, P. (2016). *Herpetofauna Mexicana Vol.1. Snakes of Mexico*. Edition Chimaira. Frankfurt am Main, Alemania.
- Hernández-Acosta, E., Mondragón-Romero, E., Cristóbal-Acevedo, D., Rubiños-Panta, J. E., y Robledo-Santoyo, E. (2009). Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 15(2), 109–114. <http://www.redalyc.org/pdf/629/62912351004.pdf>.
- Hayretdağ, S., Gürkan, M., Yakin, B. Y., y Tok, C. V. (2014). A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey. *Biharean Biologist*, 8(1), 53–55.
- Hernández-Guzmán, J., Arias-Trinidad, A., Islas-Jesús, R. I., Fraire-Vázquez, A., De La Cruz-Izquierdo, R. I., García-Guzmán, N. C., y Ruíz, X. (2015). Cromosomas, lesión del ADN y malformación nuclear en la tortuga dulceacuícola (Testudines: Kinosternidae). *The Biologist*, 13(2), 201–211.

- Hopkins, W. A. (2000). Fertile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(10), 2391–2393. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620191001>.
- Hopkins, W. A., Roe, J. H., y Snodgrass, J. W. (2002). Effects of chronic dietary exposure to trace elements on banded water snakes (*Nerodia fasciata*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(4), 906–911. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210430>.
- Horne, M. T., y Dunson, W. A. (1995). Effects of low pH, metals, and water hardness on larval amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4). DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00208380>.
- IARC. (1993). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 58: Cadmium and Cadmium Compounds*.
- Ibarra-Bautista, A., Gaytán-Oyarzún, J. C., Otazo-Sánchez, E. M., y Marmolejo-Santillán, Y. (2021). Serpientes: un campo no explorado. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 8(16), 69–74. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v8i16.5821>.
- Jones, D. E., y Holladay, S. D. (2006). Excretion of three heavy metals in the shed skin of exposed corn snakes (*Elaphe guttata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 221–225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.018>.
- Kabata-Pendias, A. (2000). *Trace elements in soils and plants* (3.<sup>a</sup> ed.). CRC Press.
- Kaifer, M. J., Aguilar, A., Arana, E., Baleriola, G., Torá, I., Castillo, E., de la Torre, A., Muñoz, M. J., Carballo, M., Roset, J., Aguayo, S., Grønlund, B., Peace, E., y Lud, D. (2004). *Guía de análisis de riesgos para la salud humana y los ecosistemas*. Comunidad de Madrid, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.
- Kazemi, A., Esmaeilbeigi, M., Sahebi, Z., y Ansari, A. (2022). Health risk assessment of total chromium in the QANAT as historical drinking water supplying system. *Science of the Total Environment*, 807, 150795. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150795>.
- Klauber, L. M. (1982). *Rattlesnakes: Their habitats, life histories, and influence on mankind*. University of California Press.

- Klemens, M. (1993). Amphibians and reptiles of Connecticut and adjacent regions. Connecticut Department of Environmental Protection Press.
- Lema, I. I., Zuk, M., y Rojas-Bracho, L. (2010). Introducción al análisis de riesgos ambientales (2ª ed.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.
- Linarez, A. K., Isabel, C. C., y Roger, Q. R. (2020). Determinación de metales pesados en suelos agrícolas y suelos para cultivo de *Solanum tuberosum* de la bahía interior de Puno. Investigación y Desarrollo, 20(1), 147–153. Recuperado el 14 de mayo de 2024, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2518-44312020000100011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2518-44312020000100011&lng=es&tlng=es).
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T., y Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 14(2), 145–153. DOI: <https://doi.org/10.18684/BSAA%2814%29145-153>.
- López-González, E. C., Larriera, A., Siroski, P. A., y Poletta, G. L. (2017). Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. Ecotoxicology and Environmental Safety, 136, 84–91.
- Loyde De La Cruz, L. A., González Méndez, B., Cruz Avalos, A. M., y Loredó Portales, R. (2022). Suelos agrícolas y metales pesados, una relación tóxica que se puede remediar. Epistemos (Sonora), 16(33), 93–98. DOI: <https://doi.org/10.36790/epistemos.v16i33.228>.
- Markert, P. D., Breure, A., y Zechmeister, H. (2003). Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts and applications. Trace Metals and Other Contaminants in the Environment, 6, 15–25.
- Martín-Olmedo, P., Carroquino-Saltó, M. J., Ordoñez-Iriarte, J. M., y Moya, J. (2016). La evaluación de riesgos en salud. Guía metodológica. Aplicaciones prácticas de la metodología de la evaluación de riesgos en salud por exposición a químicos (3ª ed.). Sociedad Española de Sanidad Ambiental (SESA) y Escuela Andaluza de Salud Pública.
- Martínez, M. T. (2017). Propuesta de manual de manejo y traslado de reptiles: Caso Uadyet Exotic's (Tesis de Ingeniería en Transporte, Instituto Politécnico Nacional). Repositorio Dspace. DOI: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/24401>.

- Marín, A. M. S. (2008). Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid.
- McBride, M., Suave, S., y Hendershot, W. (1997). Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*, 48, 337–346.
- Meik, J. M., Pires-daSilva, A. (2009). Evolutionary morphology of the rattlesnake style. *BMC Evol Biol* 9, 35. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-35>.
- Ministerio de Medio Ambiente. (2018). Lineamientos metodológicos para la evaluación de riesgos ambientales. Santiago, Chile: Ministerio del Medio Ambiente.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2015). Guía para la elaboración de estudios de evaluación de riesgos a la salud y el ambiente (ERSA) en sitios contaminados. Dirección General de Calidad Ambiental, Lima, Perú. Consultado de <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wpcontent/uploads/sites/22/20>.
- Mociño-Deloya, M. E. (2015). Ecología trófica de tres especies de serpientes de cascabel en México: *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus* y *Crotalus willardi* (Tesis doctoral, Universidad de Granada).
- Mociño-Deloya, E., Setser, K., Peurach, S. C., y Meik, J. M. (2008). *Crotalus aquilus* in the Mexican state of México consumes a diverse summer diet. *The Herpetological Bulletin*, 105, 10–12. En <http://pubs.er.usgs.gov/publication/5224941>.
- Mociño-Deloya, Estrella, Setser, Kirk, y Pérez-Ramos, Edmundo. (2014). Observations on the diet of *Crotalus triseriatus* (Mexican dusky rattlesnake). *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(4), 1289-1291. <https://doi.org/10.7550/rmb.43908>.
- Molina, E., y Meléndez, G. (2002). Tabla de interpretación de análisis de suelos. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. Mimeo.
- Morales, J. S. (2013). Metales pesados en especies cinegéticas de caza mayor: estudio epidemiológico y riesgo alimentario (Tesis de Maestría). Universidad de Córdoba, España.

- Narwal, R. P., Singh, B. R., y Selbu, B. (1999). Association of cadmium, zinc, copper, and nickel with components in naturally heavy metal-rich soils studied by parallel and sequential extraction. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(9-10), 1209–1230.
- National Wildlife Federation. (2024.). Rattlesnake. Consultado el 11 de abril del 2024, en <https://www.nwf.org/Educational-Resources/Wildlife-Guide/Ertiles/Rattlesnakes>.
- NMX-AA-132-SCFI-2016. (2016). Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones técnicas para la obtención y manejo de muestras que permitan la caracterización de suelos del área de estudio, a través de la identificación y cuantificación de metales y metaloides. Diario Oficial de la Federación. Publicada el 6 de marzo de 2017.
- NOM-018-STPS-2015. (2018). Norma Oficial Mexicana que establece el sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. Diario Oficial de la Federación, pp. 1-3.
- NOM-021-RECNAT-2000. (2002). Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, México, pp. 1–67.
- NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004. (2007). Norma Oficial Mexicana que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por Ag, As, Ba, Br, Cd, Cr (VI), Hg, Ni, Pb, Se, Tl y/o V. Diario Oficial de la Federación, 2da sección, 2/03/2007, México, pp. 1–69.
- Odetti, L. M., Paravani, E. V., Simoniello, M. F., y Poletta, G. L. (2024). Micronucleus test in reptiles: Current and future perspectives. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 897, 503772. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503772>
- Olvera-Olvera, C. R., Fernández-Badillo, L., Callejas-Jiménez, F. J., Iturbe-Morgado, J. C., y Goyenechea, I. (2021). Herpetofauna de la Sierra de las Navajas. En CONABIO (Ed.), *La biodiversidad en Hidalgo. Estudio de Estado* (pp. 276–283). CONABIO.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Herramienta de evaluación de riesgos para la salud humana de la OMS: peligros químicos (Documento n.º 8 del Proyecto de armonización del IPCS). OMS.

- Pacheco, T. C. (2013). Biomonitoring genotóxico en renacuajos de la rana *Lithobates montezumae* y análisis de metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en el Río Tula, estado de Hidalgo, México (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. En <https://repositorio.unam.mx/contenidos/ficha/biomonitoring-genotoxico-en-renacuajos-de-la-rana-lithobates-montezumae-y-analisis-de-metales-pesados-e-hidrocarburo-207415>.
- Peña, C. E., Carter, E. D., y Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Southwest Hazardous Waste Program, Universidad de Arizona.
- Peralta-Videa, J. R., López, M. L., Narayan, M., Saupe, G., y Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41, 1665–1677. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.005>.
- Pereira, M. C., y Maycotte, M. C. (2011). Edafología 1. Espacio Gráfico Comunicaciones S.A.
- Pineda, E. B., y Rodríguez, M. G. (2015). Metales pesados (Cd, Cr y Hg): su impacto en el ambiente y posibles estrategias biotecnológicas para su remediación. *Revista Científica General José María Córdova*, 2(2), 82–112. DOI: <https://doi.org/10.24267/23462329.113>.
- Poletta, G. L. (2011). Monitoreo de daño inducido por plaguicidas en *Caiman latirostris* (yacaré overo) como organismo centinela de los humedales de Argentina (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Quiroz-Herrera, V. H., y Palacio-Baena, J. (2017). Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22(3), 322–330.
- Quiterio-Pérez, M. (2012). Evaluación espacio temporal de pesticidas organoclorados (POs) en aguas y sedimentos de la laguna de Metztitlán, Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Quesada, R. J., McCleary, R. J., Heard, D. J., y Lillywhite, H. B. (2014). Non-lethal sampling of liver tissue for toxicologic evaluation of Florida cottonmouth snakes, *Agkistrodon piscivorus conanti*. *Ecotoxicology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1148-8>.

- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad Médica*, 63(1), 51–64.
- Ramírez-Bautista, A. N., Sánchez-González, A., Sánchez-Rojas, G., y Cuevas-Cardona, C. (2009). Biodiversidad del estado de Hidalgo: Tomo I. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. DOI: <https://doi.org/10.29057/books.32>.
- Ramírez, J. A., y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67–75.
- Rebón-Gallardo, F., Flores-Villela, O., y Ortiz-Ramírez, D. R. (2015). Predation of nestling house finches (*Haemorrhous mexicanus*) by a dusky rattlesnake, *Crotalus aquilus*, in Hidalgo, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(2), 550–552. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.04.001>.
- Repetto-Jiménez, M., y Sanz, P. (1995). Glosarios de términos toxicológicos IUPAC (Duffus y cols., 1993). En Asociación Española de Toxicología.
- Repetto-Jiménez, M., y Eretto-Kuhn, G. (2009). *Toxicología fundamental*. Madrid: Díaz Santos. pp. 616.
- Reichaman, M. S. (2002). The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation, pp. 54.
- Reyes, F. G. R., y Almeida, W. F. (1992). *Toxicología prospectiva y seguridad química*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud.
- Rivera, E., Sánchez, M., y Domínguez, H. (2018). pH como factor de crecimiento de plantas. *Revista de Iniciación Científica*, 101-105.
- Rodríguez-Anaya, A., Gaytán-Oyarzun, J. C., Gordillo-Martínez, J. A., Prieto-García, F., y Marmolejo-Santillán, Y. (2014). Model for estimating the environmental risk potential per presence of drugs nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDS) consumption high. *Ciencia e Técnica Vitivinícola*, 29, 51-76.

- Romero, F. M., y Gutiérrez-Ruiz, M. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 64, 43-53.
- Sánchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzun, J. C., Prieto-García, F., y Cabrera-Cruz, R. B. (2021). Evaluación rápida de potencial de riesgo genotóxico (ERPRG) asociada a metales pesados en agua potable: Caso de estudio Zimapán, Hidalgo, México. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías ICBI*, 114-120.
- Santibáñez, J. A. (2007) Manual para el mantenimiento de ofidios en cautiverio (Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México). Repositorio Institucional UNAM.
- Sauquillo, A., Rigol, A., y Rauret, G. (2003). Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 152-159.
- Secretaría de Cultura del Estado de Hidalgo. (s.f.). Regiones geoculturales del Estado de Hidalgo. <http://cultura.hidalgo.gob.mx/regiones-geoculturales-del-estado-de-hidalgo/>
- Strunjak-Perovic, I., Lisicic, D., Coz-Rakovac, R., Topic-Popovic, N., Jordan, M., Benkovic, V., y Tadic, Z. (2010). Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicology*, 19, 1460–1465.
- Shaumburg, L. G., Poletta, G. L., Siroski, P. A., y Mudry, M. D. (2012). Baseline values of micronuclei and comet assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 99-103.
- Shaumburg, L. G., Poletta, G. L., Siroski, P. A., y Mudry, M. D. (2014). Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): The effect of age. *Mutation Research*, 766, 5-9.
- Schmitt, H. W., y Sticher, H. (1991). Heavy metal compounds in the soil. En Merian, E., y Clarkson, W. T. (Eds.), *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance* (pp. 312-331). New York.

- Schützendübel, A., y Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365. DOI: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351>.
- Schneider, L., Maher, W. A., Green, A., y Vogt, R. C. (2013). Mercury contamination in reptiles: An emerging problem with consequences for wildlife and human health. Nova Science Publishers, 173-232. En, <https://researchprofiles.anu.edu.au/en/publications/mercury-contamination-in-Ertiles-an-emerging-problem-with-conseq>.
- Servicio Geológico Mexicano (SGM). (2018). Panorama minero del estado de Hidalgo. Secretaría de Economía.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., y Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 437-444. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.03.007>.
- Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., y Krest, S. (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles* (2nd ed.). SETAC Press.
- Stankovic, S., Kalaba, P., y Stankovic, A. R. (2013). Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1), 63-84. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0430-6>.
- Terzi, M.H., Kalkan, M. (2024). Evaluation of soil pollution by heavy metal using index calculations and multivariate statistical analysis. *Environ Monit Assess* 196, 443 <https://doi.org/10.1007/s10661-024-12569-3>.
- Torres-Bugarin, O., y Arias-Ruiz, L. (2023). Micronúcleos: Actualización del papel en la inestabilidad genética, inflamación, envejecimiento y cáncer. Revisión panorámica. *Revista Biomédica*, 34(2). DOI: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v34i2.1101>.
- Uetz, P., y Hosek, J. (2023). The Reptile Database. Consultado el 10 mayo de 2022, en, <http://www.ertile-database.org>.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). (2007). Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Method 3051A. USEPA.

- U.S. Department of Agriculture (USDA). (2022). U.S. Department of Agriculture. Consultado el 8 febrero de 2022, en, <https://www.usda.gov/>.
- Vásquez, V. M., Matta, M. B., y Rojas, N. E. (2015). Toxicidad del mercurio y sus efectos en organismos acuáticos y terrestres. *Toxicology Letters*, 238(3), 221-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.005>.
- Vicente-Martoneil, J. J., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., y Granado-Castro, M. D. (2009). Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 823-836. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.106>.
- Villegas, A. H. (2005). Aspectos ecológicos de las serpientes de cascabel de la isla Santa Catalina *Crotalus catalinensis*, Golfo de California México. (Tesis de maestría no publicada). Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C., La Paz, B. C. S.
- West Analítica y Servicios S.A. de C.V. (2021). El pH del suelo: Conceptos fundamentales.
- Wylie, G. D., Hothem, R. L., Bergen, D. R., Martin, L. L., Taylor, R. J., y Brussee, B. E. (2009). Metals and trace elements in giant garter snakes (*Thamnophis gigas*) from the Sacramento Valley, California, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(3), 577-587. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9265-8>.
- Zapata, L. M., Bock, B. C., Orozco, L. Y., y Palacio, J. A. (2016). Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris erythrocytes* as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127, 108-116.
- Zhang, L., Wright, L. P., y Blanchard, P. (2009). A review of current knowledge concerning dry deposition of atmospheric mercury. *Atmospheric Environment*, 43, 5853–5864.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Pérez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Ibarra, M. L., Ramos-Mora, A., Ortiz, G. G., y Gallegos-Arreola, M. P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species: Mammals, reptiles and birds. Part two. *Mutation Research*, 467, 99-103.
- Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Pérez, A., Gómez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, M. L., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A.,

Oliveros-Lira, D., y Gallegos-Arreola, M. P. (2001). Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans: Spontaneous micronuclei in 43 species. *Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 494, 161–167.