



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE METALES
PESADOS A CONCENTRACIONES REPORTADAS EN EL RÍO
TULA, HIDALGO.**

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:
JUAN JESÚS GARCÍA LEÓN**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZUN**

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO



Fecha: 10 de Noviembre de 2020
 Asunto: Autorización de impresión de Tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH
P R E S E N T E

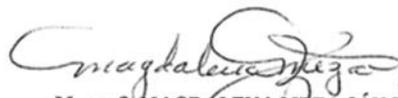
Con base en lo establecido en el artículo 40, Capítulo I del Título Cuarto del Reglamento de Titulación, le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Juan Jesús García León**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado **"Evaluación del efecto genotóxico de metales pesados a concentraciones reportadas en el río Tula Hidalgo."**, ha decidido autorizar la impresión del mismo, después de revisarlo en reunión de sinodales, hechas las correcciones acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dra. Maritza López Herrera	
SECRETARIO	Dr. Pablo Octavio Aguilar	
PRIMER VOCAL:	Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún	
SUPLENTE:	Dra. Sylvia Martínez Hernández	

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

ATENTAMENTE



M. en C. MAGDALENA MEZA SÁNCHEZ
COORDINADOR ADJUNTO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 6640, 6642 Fax 2112
 aab_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A mi mamá Leti

Por su apoyo incondicional y por siempre motivarme a ser mejor persona, te amo mamá.

A mi tía Eva

Que, aunque ya no esté aquí, es parte de este logro.

Al Dr. Gaytán

Por su tiempo, apoyo, paciencia y mentoría durante el desarrollo de cada una de las etapas de este proyecto.

A mis sinodales

Por su apoyo, tiempo, consejos y comentarios que hicieron mejorar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio

Por su amistad, apoyo y por todos los buenos momentos en el laboratorio.

A mi gran familia

Por su gran apoyo, cariño y por motivarme a ser mejor.

A mis compis de la Universidad

Por hacer de la Universidad una de las mejores etapas de mi vida.

A mis amigos

Por todos los momentos, buenos y malos, por su cariño, por creer en mí y por motivarme a ser mejor.

GRACIAS.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
I. Resumen.....	8
II. Abstract.....	9
III. INTRODUCCIÓN	10
3.1 Contaminación.....	10
3.2 Contaminación del agua.	11
3.3 Principales contaminantes de interés toxicológico en cuerpos de agua.	13
3.4 Metales pesados.....	15
IV Antecedentes	17
4.1 Río Tula.....	17
4.2 Evaluación de la calidad ambiental.	19
4.3 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).....	19
4.4 Bioensayos y Biomarcadores.....	20
4.5 Evaluación de genotoxicidad mediante el bioensayo con <i>Vicia faba</i> (Haba).	21
4.6 Micronúcleos (MN).....	22
V. Justificación.....	25
VI. Objetivos.	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.	26
VII. Método.....	27
7.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).....	27
7.1.1 Recopilación de datos.	28
7.1.2 Método de análisis.....	28
7.1.3 Indicadores ambientales y/o biológicos, que determinan la probabilidad de riesgo asociado a la exposición a metales pesados.	30
7.2 Evaluación la citotoxicidad en haba (<i>Vicia faba</i>)	34
7.2.1 Pasos metodológicos para análisis microscópico	34
7.2.2 Determinación del índice mitótico (IM) y Análisis de la citotoxicidad (Gaytán, 2006).	37
7.2.3 Método de análisis de la citotoxicidad con base en el IM.....	37
7.3 Evaluación de la genotoxicidad (<i>Vicia faba</i>).....	38
7.3.1 Determinación de la frecuencia de micronúcleos (fMN).....	38

7.3.2 Método de análisis de micronúcleos y determinación de la genotoxicidad.....	39
VIII. Resultados	41
8.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).....	41
8.2 Citotoxicidad	47
8.3 Genotoxicidad.....	50
IX. Discusión.....	53
9.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).....	53
9.2 Citotoxicidad	54
9.3 Genotoxicidad.....	56
XI. Conclusiones	59
XI. Bibliografía	61

Índice de figuras.

1. Fenómenos de bioacumulación y biomagnificación	13
2. Ilustración de Vicia faba.....	23
3. Formación de micronúcleos (MN)	24
4. Diagrama de Venn propuesto para evaluar “Potencial de Riesgo”	29
5. Criterio de Valoración colorimétrica para indicadores ambientales y biológicos.....	29
6. Bioensayo con Vicia faba para determinar citotoxicidad y genotoxicidad.....	40
7. Etapas mitóticas de células meristemáticas de Vicia faba.....	48
8. índice mitótico (IM) de Cd y Cr.....	49
9. Micronúcleos (MN) observados en células meristemáticas de raíz de Vicia faba (40x) con Cd.....	50
10. Micronúcleos (MN) observados en células meristemáticas de raíz de Vicia faba (40x) con Cr.....	50
11. Frecuencia de Micronúcleos (fMN) observados con Cd	51
12. Frecuencia de Micronúcleos (fMN) observados con Cr	51

Índice de tablas

I.	Adaptación de la clasificación de metales pesados, según su vida media de efectividad propuesta por Ramírez y Lascaña (2001)..	30
II.	Matriz de dos vías de los indicadores ambientales o biológicos.....	34
III.	Matriz comparativa con semejanzas y diferencias ambientales y biológicas de los cuatro principales metales pesados presente en el rio Tula, Hgo.....	42
IV.	Resultados del análisis de los indicadores ambientales y biológicos	46
V.	Porcentaje de muestra del Índice mitótico (IM) con Cd y Cr a diferentes concentraciones.....	48
VI.	Análisis de Varianza Factorial para el índice mitótico (IM).	49
VII.	Frecuencia de micronúcleos (fMN) observada con Cd y Cr	52
VIII.	Análisis de Varianza Factorial para la frecuencia de micronúcleos (fMN)..	52

I. Resumen.

La actual decadencia de la calidad ambiental junto con el gran número de compuestos a los que están expuestos todos los sistemas biológicos del planeta, crea la necesidad de evaluar el impacto biológico, para así poder controlarlo y minimizarlo; entre estos hay varios tipos de compuestos con efectos tóxicos y genotóxicos. Dentro de estos, encontramos a los metales pesados que poseen una gran toxicidad, se bioacumulan, biomagnifican y no pueden ser química ni biológicamente degradables, lo que los hace potencialmente peligrosos.

El agua del río Tula, Hidalgo, presenta un grave problema de contaminación, asociado principalmente a desechos industriales y urbanos; estudios previos evidencian la presencia de metales pesados por encima de la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, es evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de los principales metales pesados de interés toxicológico presentes en el río Tula, Hgo. a través de evaluar el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos en *Vicia faba*. Primeramente, se realizó una Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo de los principales metales pesados de interés toxicológico, para sustentar estudios de efecto biológico, esta evaluación arrojó al Cd y al Cr como los principales metales pesados con un mayor potencial de riesgo en la zona de estudio, por lo tanto, se evaluó su citotoxicidad y genotoxicidad en células meristemáticas de haba (*Vicia faba*) a las concentraciones observadas en el río Tula, Hidalgo.

Los resultados evidenciaron una relación entre el Potencial de riesgo y los daños observados, registrándose un efecto citotóxico a través de la disminución en el índice mitótico en ambos metales evaluados, en cuanto al efecto genotóxico a través de la frecuencia de micronúcleos en células interfásicas, se observó un efecto positivo, por lo que se concluye que para la zona de estudio el Cd y el Cr son potencialmente peligrosos al estar presentes a concentraciones aún por debajo de las normas oficiales, y que a esas concentraciones son capaces de inducir un daño citotóxico y genotóxico en el bioensayo evaluado.

II. Abstract

The current decline in environmental quality, together with the large number of compounds to which all biological systems on the planet are exposed, creates the need to evaluate the biological impact, in order to control and minimize it; among these there are several types of compounds with toxic and genotoxic effects. Among these, we find heavy metals that are highly toxic, bioaccumulate, biomagnify and cannot be chemically or biologically degradable, which makes them potentially dangerous.

The water from the Tula River, Hidalgo, presents a serious pollution problem, mainly associated with industrial and urban waste; previous studies show the presence of heavy metals above NOM-001-SEMARNAT-1996.

Therefore, the objective of this work is to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the main heavy metals of toxicological interest present, by evaluating the mitotic index and the frequency of micronuclei in *Vicia faba*. First, a Rapid Evaluation of the Risk Potential of the main heavy metals of toxicological interest was carried out, to support studies of biological effect, this evaluation showed Cd and Cr as the main heavy metals with a higher risk potential in the area of Therefore, the study evaluated its cytotoxicity and genotoxicity in meristematic cells of broad bean (*Vicia faba*) at the concentrations observed in the Tula river, Hidalgo.

The results showed a relationship between the risk potential and the observed damage, registering a cytotoxic effect through the decrease in the mitotic index in both metals evaluated, in terms of the genotoxic effect through the frequency of micronuclei in interphase cells, it was observed a positive effect, which is why it is concluded that for the study area Cd and Cr are potentially dangerous as they are present at concentrations still below official norms, and that at these concentrations they are capable of inducing cytotoxic damage and genotoxic in the evaluated bioassay.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Contaminación

Las actividades humanas se han convertido en un factor de perturbación profunda de la naturaleza y de los procesos ecológicos. La modificación de los ecosistemas por el hombre para obtener un beneficio social conlleva un costo ambiental que pocas veces es valorado. Esta alteración ha degradado al ambiente de tal manera que actualmente las emisiones de contaminantes derivados de procesos antropogénicos están presentes en todos los ecosistemas del planeta y son un importante factor de degradación del aire, agua, suelo y daña severamente a la flora y fauna, incluido el ser humano (Sarukhán, 2006).

A partir de 1900, en buena medida debido al crecimiento poblacional exponencial, la industrialización y las pautas de consumo, se ha intensificado la extracción y el uso de los recursos sin que se haya avanzado en la misma magnitud en el manejo de los desechos producidos. Los residuos de las diferentes actividades humanas se han descargado al ambiente con la idea de que los ecosistemas tendrán la capacidad de absorberlos o "limpiarlos" sin que se generen problemas. El resultado es que hoy en día las huellas de la actividad humana son evidentes en prácticamente cualquier lugar del planeta, por más alejado que se encuentre (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Colegio de Postgraduados, 2003).

Los residuos, principalmente de las actividades antropogénicas, en el ambiente, los definimos como contaminantes, por ende, entendemos que la contaminación es considerada como la presencia o incorporación en el ambiente de cualquier agente, físico, químico o biológico en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la biota. Estos agentes contaminantes se pueden clasificar de diferentes maneras, siendo los principales de interés de estudio aquellos que se encuentran en el agua, aire y suelo, y que representan un peligro para la biota, incluyendo el ser humano (Ballester, 2015; Contreras-Vigil *et al.*, 2013).

3.2 Contaminación del agua.

El agua está compuesta por dos elementos, hidrógeno y oxígeno; es el único elemento que existe en la naturaleza en sus tres estados: sólido, líquido y gaseoso (Dávila-Rodríguez y Guzmán-García, 2015), cubre más del 70% de la superficie del planeta, es la fuente y sustento de la vida, contribuye a regular el clima y posee propiedades únicas que la hacen esencial para la vida (Fernández, 2012). El crecimiento poblacional, la contaminación, la urbanización, la deforestación y la sobreexplotación de los sistemas de agua superficial y subterránea para el abastecimiento representan una clara amenaza a este recurso (Jiménez, 2016).

La calidad del agua se ve afectada tanto por fenómenos naturales como por actividades humanas y depende también de que se empleen tratamientos efectivos a las aguas residuales que se vierten a los cuerpos de agua, para eliminar o reducir las sustancias contaminantes (Instituto Nacional de Ecología, 2004). La contaminación de este compartimento ambiental ocurre principalmente al verter directamente descargas de aguas residuales, crudas o tratadas, en los cuerpos receptores superficiales, que en su mayoría proceden de la industria y el uso doméstico (Cortés-Muñoz y Calderón-Mólgora, 2011).

Los contaminantes procedentes de actividades humanas que se encuentran en cuerpos de agua se han convertido en un problema ambiental mundial. Estos pueden ser agentes (físicos, químicos y/o biológicos) y una de las principales razones por las cuales estos contaminantes llegan a los cuerpos de agua (ríos, lagunas, mares, etc.), es por la falta de tratamiento de las aguas residuales.

Los contaminantes antropogénicos más analizados en cuerpos de agua proceden de cinco grupos:

1. **Farmacéuticos:** ej. Paracetamol, aciclovir, aspirina, ofloxacina, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, etc.
2. **Agroquímicos:** ej. Atrazina, carbendazim, diuron, fipronil, glifosato, etc.
3. **Narcóticos:** ej. Cocaína, codeína, metadona, nicotina, etc.
4. **Industrial:** ej. Bisfenol A, metales pesados, etc.

5. **Productos de cuidado personal:** ej. DEET, parabenos, triclosán, triclocarbán, protectores solares, etc.

El mal uso, manejo y disposición de los diferentes contaminantes ha provocado que los seres humanos convivan, en mayor o menor medida, con diversos compuestos sintéticos y naturales presentes en el agua, esto representa una amenaza a la salud pública, debido a que estos agentes pueden presentar una cinética ambiental y desplazarse a otros compartimentos ambientales (suelo, aire y biota), además, algunos tienen la capacidad de biomagnificarse y bioacumularse (Fig. 1) en tejidos animales y vegetales de uso alimenticio y con esto llegar a incorporarse a la dieta de las personas.

La bioacumulación la podemos definir como la cantidad total de un contaminante que es absorbida y retenida por los organismos en un periodo de tiempo (horas, días, años), es el resultado de la asimilación de agentes de diferentes fuentes, ya sea agua, aire o sólidos (alimentación); y los procesos de pérdida (difusión pasiva, metabolismo, crecimiento), mientras que la biomagnificación se define como el incremento en la concentración de un contaminante de un nivel trófico inferior a uno mayor, donde los depredadores presentan mayores concentraciones que sus presas. Este proceso se debe a la transferencia del contaminante través de las redes tróficas y la acumulación de los contaminantes adquiridos por la dieta (Albert y Jacott, 2015; Newman, 2015; Jorgensen, 2016).

Estos compuestos han afectado, afectan y afectarán la salud de diversos grupos de población, en distintas formas, principalmente de grupos vulnerables como lo son niños, embarazadas y adultos mayores que, por sus características fisiológicas, suelen ser más sensibles a los contaminantes (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Colegio de Postgraduados, 2003; Albert y Jacott, 2015).

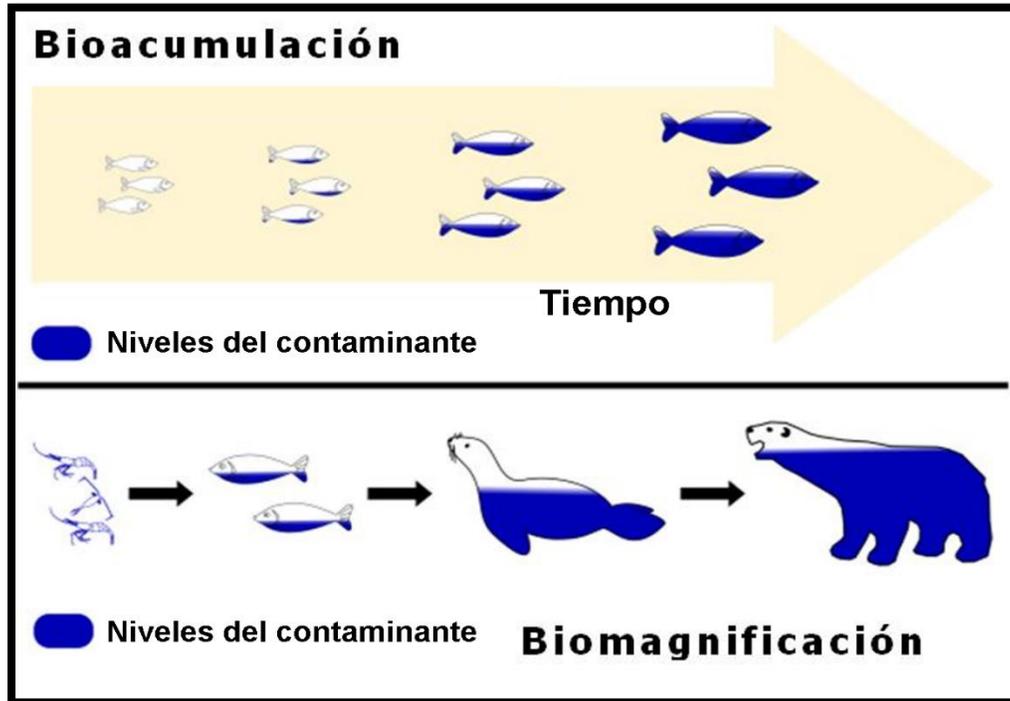


Figura 1. Fenómenos de bioacumulación y biomagnificación (González *et al.*, 2018).

3.3 Principales contaminantes de interés toxicológico en cuerpos de agua.

De toda la gran cantidad de contaminantes que se generan en el mundo existe un grupo de particular interés de estudio debido a su toxicidad para la biota, los cuales se conocen como xenobióticos de interés toxicológico, entendiéndose a la toxicidad como el cambio biológico que es producido en un organismo como resultado de la exposición a un agente xenobiótico (Gutiérrez y Fortuol, 1997). Esta posible acción tóxica significa que la exposición a los contaminantes presupone un riesgo, el cual se puede definir como la probabilidad de que se produzcan efectos adversos, después de una exposición (Sánchez, 1984).

Los efectos adversos de un agente sobre un sistema biológico no se producen a menos de que el agente, o los productos de su biotransformación, sean biodisponibles y alcancen las células, tejido u órgano blanco, a una concentración y por un tiempo suficiente, que le permita producir manifestaciones tóxicas en el organismo. Además

los efectos nocivos dependen de las propiedades físicas y químicas del agente xenobiótico, la susceptibilidad del sistema biológico y las características temporales y/o situacionales, de la exposición (Gutiérrez y Fortuol, 1997), así como los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación (Fig. 1), los cuales son importantes, porque a través de ellos los agentes tóxicos presentes en el ambiente se acumulan a través de las cadenas tróficas, pudiendo llegar a afectar a los seres humanos.

En términos generales, según Albert y Jacott (2015), se considera que una sustancia es tóxica si causa:

- Daño funcional o anatómico en los organismos expuestos.
- Cambios irreversibles en el equilibrio fisiológico (homeostasis) del organismo.
- Aumento en la sensibilidad a otros agentes químicos, físicos o biológicos, o bien
- Si su presencia es incompatible con la vida.

Dentro de los principales contaminantes químicos de interés toxicológico de origen inorgánico presentes en cuerpos de agua se encuentran los metales pesados, cuya presencia en el agua puede causar graves daños a los ecosistemas acuáticos, reduciendo la biodiversidad.

De manera particular, los metales pesados son de gran interés toxicológico por sus propiedades fisicoquímicas propias, pueden resultar potencialmente nocivos para la salud de la población, así como para el ambiente. Algunos de estos contaminantes pueden estar presentes en el ambiente de manera natural o por actividades antropogénicas, que los liberan a los cuerpos de agua, como residuos y vertidos domésticos, agrícolas e industriales. La contaminación química también puede repercutir negativamente en el rendimiento de actividades productivas como la agricultura o la ganadería, en las que el agua es un elemento esencial (Volke *et al.*, 2005; Ferré-Huguet *et al.*, 2007).

3.4 Metales pesados

Debido a su movilidad en el agua y a su toxicidad para las formas superiores de vida, a los iones de metales pesados presentes en los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente desde un punto de vista toxicológico y ecológico. Aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas. Debido a que pueden bioacumularse y/o biomagnificarse, además tienen una alta persistencia en el ambiente al no ser biodegradados o destruidos, pueden ser lixiviados y disueltos por agentes físicos y químicos (Cañizares-Villanueva, 2000; Duffus, 2002).

Se define a los metales pesados como elementos de elevado peso atómico, potencialmente tóxicos, algunos forman complejos solubles y son transportados y distribuidos a los ecosistemas hasta incorporarse en la cadena trófica. Están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general debido a su efecto tóxico, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas, además su toxicidad se agrava por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción, el proceso se agrava durante el paso por las distintas cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes, además pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años (Cañizares-Villanueva, 2000; Navarro-Aviñó *et al.*, 2007; Romero, 2009).

La exposición a algunos metales pesados ha sido asociada a una gran variedad de efectos adversos sobre la salud, estos dependen de una variedad de condiciones como las características de la exposición y la cantidad del xenobiótico en el sistema. Generalmente podemos clasificar los efectos en tóxicos, teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos, con daños en órganos específicos (neurotóxicos, nefrotóxicos, etc.) (Cañizares-Villanueva, 2000).

La contaminación por metales pesados es un problema que ha ido en aumento debido principalmente a actividades antrópicas. Entre las principales fuentes de emisión

se encuentra la minería, la metalúrgica y la agricultura. Actualmente en México y en el mundo existen reportes de la presencia de metales pesados en ríos, lagos, cultivos, suelos y alimentos vegetales y animales de zonas urbanas y rurales, así como en ambientes costeros y marinos, donde se ha detectado la acumulación de metales pesados en tejidos animales y vegetales de consumo humano, lo cual representa un peligro a la salud de la población, debido a que a través de los alimentos pueden estar llegando pequeñas cantidades de estos metales y con el paso del tiempo generar efectos nocivos (Covarrubias y Peña-Cabriales, 2017).

IV Antecedentes

4.1 Río Tula

El río Tula toma su nombre de la ciudad de Tula de Allende Hidalgo, localidad que atraviesa en su recorrido; originalmente este río nacía en el Valle de Tula, sin embargo, con la construcción de los sistemas de desagüe de la Ciudad de México y su zona metropolitana, recibe sus aportaciones de aguas negras. La cuenca del río Tula se localiza en su mayor parte dentro del estado de Hidalgo, aunque una pequeña parte se ubica al norte del estado de México, tiene una extensión de 6,551 km², este cuerpo de agua cuenta con una disponibilidad hídrica aproximada de 327 millones de metros cúbicos de agua anuales, durante su recorrido atraviesa 11 municipios pertenecientes al estado de México y 22 pertenecientes al estado de Hidalgo (Montelongo *et al.*, 2008; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2013).

El agua de este río presenta un grave problema de contaminación asociada a la descarga de desechos industriales y urbanos, principalmente de aguas residuales industriales y domésticas sin tratar, provenientes de la Ciudad de México y su zona metropolitana (Salinas-Chávez *et al.*, 2001). Además, en su recorrido existen 204 sitios de descarga, reportados, siendo un 52% de ese volumen correspondiente al público-urbano y el resto al industrial (42%), de servicios (6%), agroindustrial (0.03%) y pecuario (0.01%) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2013).

En la ciudad de Tula de Allende, Hidalgo la actividad industrial es muy diversa presentándose con giros que van desde alimentos y artículos de vestir hasta la industria metálica básica, refinación del petróleo, la manufactura de químicos, textiles, carbón, caucho, productos plásticos y productos minerales no metálicos (Cabrera-Cruz *et al.*, 2003). Los giros que mayores cantidades de contaminantes descargan al río Tula son la manufactura de textiles, artículos de vestir, la industria del cuero y la manufactura de productos fabricados de metal (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2013).

Una evaluación realizada en 1995 y 1996 para conocer la calidad del agua en las seis cuencas del estado de Hidalgo y sobre la base del análisis de 38 parámetros físicos, químicos y bacteriológicos, determinaron que la cuenca del río Tula es la más contaminada desde sus inicios en los límites del Estado de México hasta su confluencia con el río Moctezuma, la contaminación predominante es: materia orgánica, cobre, zinc, detergentes y fenoles disueltos. Las fuentes principales de contaminación provienen de la descarga de aguas negras de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y del estado de México, las descargas municipales de Hidalgo y las descargas industriales, lo que ocasiona afectaciones a la salud, la agricultura y la acuacultura principalmente (Salinas-Chávez *et al.*, 2001).

En 2008 Montelongo y colaboradores realizaron un estudio de monitoreo de la calidad del agua durante dos años, registrando la presencia de Cd, Pb, Fe, Mn y Zn por encima de los límites permisibles, también registraron la presencia de Hg y Cr, por lo que se concluye que los recursos hídricos del río Tula han sufrido un deterioro en su calidad con motivo de las constantes descargas de aguas residuales provenientes de la Ciudad de México y del Valle de México, tanto industriales como domésticas (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2013).

El agua de este río ha sido utilizada por más de 100 años para la irrigación de cultivos agrícolas, aproximadamente 38,000 hectáreas (distrito de riego 003), lo cual constituye una seria amenaza para la salud pública debido a que algunos contaminantes tienden a acumularse en los cultivos que posteriormente son ingeridos por animales, incluyendo el ser humano. Dentro de dichos cultivos con reportes de presencia de metales pesados encontramos el maíz, alfalfa, trigo, avena, frijol, nopal, jitomate, chile, betabel, lechuga, col, cilantro, rábano, zanahoria, espinacas y perejil (Prieto-García *et al.*, 2007; Dávila-Rodríguez y Guzmán-García, 2015; Hernández *et al.*, 2017).

4.2 Evaluación de la calidad ambiental.

Los organismos vivos pueden ser herramientas esenciales para la evaluación de la calidad ambiental, con base en el supuesto de que son sensibles a contaminantes presentes en el ambiente, siendo factible establecer una correlación causal entre el tipo y grado de contaminación y sus respuestas mediante variables biológicas seleccionadas, que comprenden una amplia gama de efectos, agudos y crónicos en distintos niveles de organización, desde el molecular al poblacional (Ferrari, 2015).

Actualmente contamos con diversas técnicas y métodos que nos permiten conocer la concentración de xenobióticos en una muestra, básicamente nos permiten saber que hay y en qué cantidad. Sin embargo, la concentración por sí sola no dice nada de su efecto, por lo que en las últimas décadas se ha desarrollado nuevos enfoques metodológicos integrales basados en respuestas bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en un organismo y sean reflejadas frente a un peligro potencial por uno o más xenobióticos (Toro-Restrepo, 2011).

4.3 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).

La evaluación de riesgo nos permite hacer una estimación de la probabilidad que tiene la población, o un sector, de sufrir daños en la salud debido una exposición (Goldman y Koduru, 2000; Oldring *et al.*, 2014), permite examinar un peligro a fin de evitarlo o reducirlo, se requiere información de una variedad de disciplinas como son la toxicología, epidemiología y la ecología, así como de la química, la física y las matemáticas (Lema, 2003).

Las Técnicas de Evaluación Rápida (TER) adquirieron relevancia como primera aproximación en la valoración de ciertas problemáticas, con miras a iniciar intervenciones, en función de la positiva utilidad que muestran en tiempos mínimos y con recursos escasos (Llanes, 2005). Su importancia estriba en que es una metodología capaz de brindar información contextual, aspecto que los métodos cuantitativos no pueden brindar. Sus finalidades y objetivos tienen que ver con las

necesidades del entorno, pero su utilidad mayor es la de permitir disponer, en forma sencilla, rápida y flexible del conocimiento de las características de un fenómeno (Llanes, 2005).

Se trata de un método cuyo principal interés es hacer estimaciones sobre la magnitud, extensión y características del problema en forma confiable y oportuna, principalmente de fuentes bibliográficas (Llanes, 2005). Su aplicación es muy útil, sobre todo en matrices ambientales donde existe una gran cantidad de contaminantes, donde se requiere de una toma de decisiones rápida y confiable sobre el o los contaminantes a priorizar para una evaluación de efecto biológico, debido a que muchas veces resulta costoso y difícil monitorear todos los contaminantes presentes en un ambiente.

La Evaluación del Potencial de Riesgo (ERPR) contempla una evaluación integral de variables ambientales o situacionales, variables del agente químico y variables de la población expuesta, así como sus interrelaciones; que mediante búsquedas bibliográficas sistemáticas y dirigidas (revisión rápida) determina la probabilidad de que se exprese un daño nocivo a la salud. La ERPR integra estas variables a través de un diagrama de Venn (Fig. 4) con sus dimensiones e interrelaciones, para un análisis rápido, confiable e integral de la problemática (Quiterio-Pérez 2012; Rodríguez-Anaya *et al.* 2014; Gaytán *et al.* 2020),

4.4 Bioensayos y Biomarcadores

Una herramienta fundamental para la evaluación de los efectos de un agente es el uso de bioensayos y biomarcadores que evalúan efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos de diferentes contaminantes ambientales.

En la fase experimental de una evaluación de daño se requiere del uso de bioensayos, los cuales se definen como el uso de un organismo vivo, como agente de prueba, para detectar el efecto de xenobióticos en condiciones controladas de laboratorio, su utilidad recae primordialmente en ser un método de detección relativamente simple que permite evaluar experimentalmente el efecto biológico de los

agentes sobre los organismos, las ventajas de su uso son la rapidez, facilidad, bajo costo y una mejor perspectiva del efecto de los contaminantes (Contero y Felicita, 2006; Correa-Díaz, 2006).

En un organismo la respuesta biológica se puede generar a concentraciones menores a los límites de detección de los principales métodos analíticos y aunque, un método analítico sea lo suficientemente fino para evaluar un nivel o concentración de un compuesto, sus datos no nos indican el efecto biológico, el cual se puede observar en los organismos, aun cuando la exposición a los compuestos ha finalizado (Correa-Díaz, 2006). A la respuesta biológica inducida en los organismos por los contaminantes ambientales se le denomina biomarcador (Camacho, 2011).

El término biomarcador se utiliza para medir una interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional que ocurre a nivel celular, genético, molecular, fisiológico, etológico o poblacional y se clasifican por lo general en tres tipos concretos de acuerdo a Silbergeld, (1998) y Arango, (2012).

- **De exposición:** evalúan en el organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos) y una molécula o célula diana.
- **De efecto:** evalúan la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede ser asociada con una enfermedad.
- **De susceptibilidad:** son indicadores de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica.

4.5 Evaluación de genotoxicidad mediante el bioensayo con *Vicia faba* (Haba).

Para poder determinar los efectos genotóxicos se han desarrollado varios bioensayos con diferentes especies que son sensibles, mostrando alteraciones en su fisiología (Bedregal-Flores, 2010).

Dentro de estos, los bioensayos con plantas han sido ampliamente utilizados para estudiar los efectos de diferentes agentes. Con el creciente interés sobre el efecto citotóxico (daño de las células) y genotóxico (daño del material genético) de los contaminantes, diferentes pruebas, como la de micronúcleos y alteraciones en el índice mitótico en sistemas vegetales han sido ampliamente implementadas para detectar el efecto genotóxico. Estas técnicas han sido llevadas a cabo en diferentes organismos vegetales como *Tradescantia paludosa*, *Allium cepa* y *Vicia faba* (Fig.2). Entre éstas, *Vicia faba* ha sido la más frecuentemente utilizada como modelo biológico para la determinación de citotoxicidad y genotoxicidad, provocada por diversos agentes en sus meristemas radiculares en cortos tiempos (Valencia-Quintana *et al.*, 2005; Beltrán y Beltrán, 2016).

Los bioensayos con *Vicia faba* presentan diferentes ventajas como lo son; versatilidad, relativo bajo costo, pueden ser mantenidos en espacios pequeños, relativamente fáciles de trabajar para la observación de células en división, posee un genoma diploide de sólo 12 cromosomas ($2n=12$) metacéntricos y acrocéntricos de gran tamaño y alta sensibilidad lo que permite una fácil lectura y estudio de su ciclo celular. Estas cualidades del vegetal lo han convertido en uno de los bioindicadores de citotoxicidad y genotoxicidad ante agentes físicos y químicos más importantes, por lo cual muchas instituciones lo han adoptado para sus programas de seguridad y protección ambiental (Valencia-Quintana *et al.*, 2005; Beltrán y Beltrán, 2016; Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019). Dentro de los principales biomarcadores relacionados con la evaluación genotóxica en plantas, destaca la cuantificación e inducción de micronúcleos, así como el análisis del índice mitótico (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

4.6 Micronúcleos (MN)

Uno de los biomarcadores de efecto genotóxico relacionado a la exposición a agentes xenobióticos son los micronúcleos (MN), los cuales se conciben como fragmentos o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la mitosis

(Fig. 3); debido a errores en las rutas anabólicas y de expresión de DNA y/o por agentes genotóxicos endógenos o exógenos como radiaciones o agentes químicos (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).



Figura 2. Ilustración de *Vicia faba* (Santamaría-Monsoríu, 2016).

Mediante su estudio se pueden evaluar los efectos genotóxicos de xenobióticos ambientales, es un biomarcador ampliamente utilizado debido a que es una alternativa eficaz, sencilla, económica y confiable para detectar la pérdida de material genético. Los MN se forman durante la transición de metafase–anafase, ocasionado por un daño al uso mitótico (efecto anaugénico) o bien, fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico); que en ambos casos; no lograron incorporarse al núcleo de las células hijas, lo que permite, diferenciarlos. Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente en una baja frecuencia, sin embargo, en presencia de ciertos agentes exógenos, la frecuencia de micronúcleos (fMN) incrementa; convirtiéndose estos, en indicadores del efecto de agentes mutágenos, genotóxicos o teratógenos (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra, 2013).

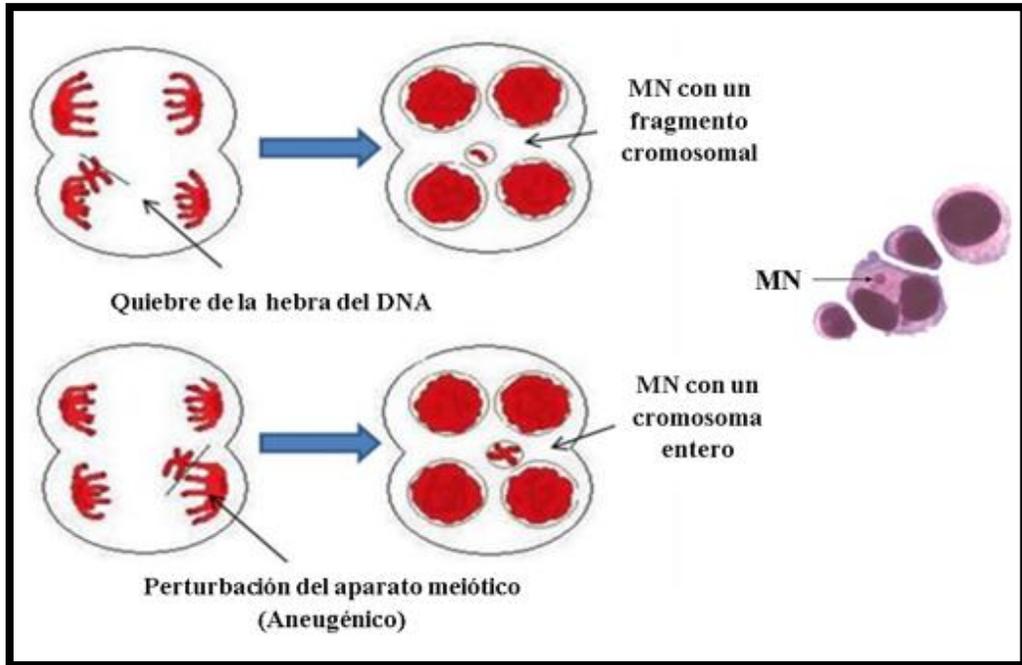


Figura 3. Formación de micronúcleos (MN) (modificado de Bedregal-Flores, 2010).

V. Justificación.

La actual contaminación ambiental representa un riesgo potencial para la biota en general, debido a la gran cantidad de xenobióticos que son liberados a las diferentes matrices ambientales (agua, aire y suelo) y que posteriormente son incorporados a las cadenas tróficas, pudiendo llegar de manera directa o indirecta a los seres humanos.

Dentro de los contaminantes más peligrosos presentes en el agua, encontramos a los metales pesados que, debido a sus características fisicoquímicas, toxicológicas y su capacidad de bioacumulación y biomagnificación representan un riesgo para la salud pública de sectores expuestos, principalmente de grupos vulnerables, debido a que se ha evidenciado en estos agentes, no solo sus efectos tóxicos, sino también la capacidad teratogénica, mutagénica y carcinogénica en diversos modelos biológicos, incluyendo al ser humano.

El río Tula es uno de los cuerpos de agua más contaminados del país, principalmente derivado del vertido de contaminantes de tipo industrial-urbano, diversos estudios evidencian la presencia de metales pesados (Montelongo *et al.*, 2007; Prieto-García *et al.*, 2007; Montelongo *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2017), como uno de los principales grupos de contaminantes de interés toxicológico, lo que representa un riesgo potencial a la salud pública y a la biota en general debido al uso que se le da a este cuerpo de agua, donde aproximadamente 38,000 hectáreas de diferentes cultivos son irrigadas en la ciudad de Tula de Allende (distrito de riego 03) (Dávila-Rodríguez y Guzmán-García, 2015), con lo cual diversos sectores de la población se encuentran expuestos a dichos contaminantes.

Con base en lo anterior, se hace primordial evaluar los posibles efectos a la salud, relacionados con la exposición directa e indirecta de la población humana a los principales metales pesados de interés toxicológico que han sido reportados en el río Tula, con el fin de contribuir al conocimiento del “Potencial de riesgo” asociado y sus posibles efectos a la salud.

VI. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

- Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de los principales metales pesados de interés toxicológico presentes en el río Tula, Hidalgo, a través de la prueba de micronúcleos en *Vicia Faba*, para conocer el potencial de riesgo y los efectos a la salud, asociados a la exposición con este cuerpo de agua.

6.2 Objetivos específicos.

- Identificar los dos principales metales pesados de interés toxicológico a través de una Evaluación Rápida de Potencial de Riesgo (ERPR) en las aguas del río Tula, para sustentar estudios de efecto biológico.
- Evaluar el efecto citotóxico de los dos principales metales pesados con mayor potencial de riesgo presentes en aguas del río Tula, Hidalgo, mediante el análisis y evaluación del índice mitótico en células meristemáticas de *Vicia faba*, para contribuir al conocimiento de sus efectos.
- Evaluar el efecto genotóxico de los dos principales metales pesados con mayor potencial de riesgo presentes en el río Tula, Hidalgo, mediante el bioensayo de micronúcleos en células meristemáticas de *Vicia faba* para contribuir al conocimiento de sus efectos.

VII. Método.

Para evaluar la probabilidad de daño genotóxico de los principales metales pesados de interés toxicológico reportados en aguas de río Tula, Hidalgo, se realizó una Evaluación Rápida de Potencial de Riesgo (ERPR), que permita identificar los principales metales pesados de interés toxicológico a partir de las interrelaciones de las variables ambientales y/o situacionales, del tipo de compuesto químico a evaluar y del sector o subsectores expuestos (Peligro, Exposición y Efecto).

7.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).

La ERPR, pertenece a las Técnicas de Evaluación Rápida (TER), que consisten en un método basado en reportes bibliográficos, a través de una revisión sistémica y dirigida para identificar las variables ambientales, del sector expuesto y del agente a analizar, que pueden probabilísticamente inducir un efecto perjudicial en un sector expuesto asociado a una exposición bajo ciertas condiciones situacionales y espacio temporales.

Para ello, el presente trabajo se basa en la técnica de Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR) utilizada por Rodríguez-Anaya (2014), la cual parte de una revisión bibliográfica sistemática y exhaustiva, a partir reportes técnicos y publicaciones científicas que generen información particular del sitio de estudio, de la población o de los sectores expuestos y del compuesto a evaluar.

La información recopilada se analizará a través de la evaluación de 12 indicadores ambientales y/o biológicos (Peligro, Exposición y Efecto) y posteriormente se ponderará en una matriz de dos vías, basado en las propuestas de Quiterio-Pérez (2012) con pesticidas y la de Rodríguez-Anaya (2014) con analgésicos no esteroideos, pero alineada a metales pesados.

Para la revisión bibliográficas se establecieron criterios de búsqueda, lo cuales consistieron en datos de no más de 15 años preferentemente de los siguientes

indicadores. Río Tula, Contaminación, Metales pesados y Efectos reportados (Toxicológicos, Mutagénicos, Carcinogénicos y Teratogénicos), así mismo también se incluyó en la búsqueda propiedades fisicoquímicas de estos compuestos que favorezcan permanencia en el ambiente, cinética ambiental, biodisponibilidad, bioacumulación y biomagnificación que por ende se relacionan con una mayor probabilidad de exposición y de riesgo a la población.

7.1.1 Recopilación de datos.

Se procedió a la recopilación de datos, a partir de reportes bibliográficos de no más de 15 años, desde un nivel técnico a científico, de manera sistémica y exhaustiva, en esta recopilación de datos se identificaron, similitudes y diferencias entre los compuestos a evaluar basados en los ejes de peligro, exposición y efectos potenciales, dichas áreas son resultado de la interacción de las variables ambientales, situacionales, variables del compuesto químico y variables de la población o sector expuesto; basadas en el diagrama de Venn propuesto por Rodríguez-Anaya y colaboradores, 2014, así como por Gaytán y colaboradores, 2020 (Fig. 4).

7.1.2 Método de análisis

Para evaluar los aspectos anteriores se analizaron 12 indicadores ambientales y/o biológicos, que determinan la probabilidad de riesgo asociada a la exposición a metales pesados, cada uno de los indicadores se analizó con 3 a 5 variables con valores numéricos asignados de 1 a 5, donde 5 representaría el mayor riesgo y 1 en caso de menor riesgo, aunque este último, se reserva para los casos en donde no existe un dato bibliográfico reportado y se le asigna como un factor de incertidumbre. La suma total de los valores asignados corresponde a aquel compuesto con una mayor probabilidad de ejercer daño en la población, para el análisis de los compuestos, como para la suma de las dimensiones, además de numérica, se utiliza una clasificación colorimétrica (Fig. 5),

que facilita su análisis e interpretación, lo que permite un análisis visual y numérico simultaneo (Rodríguez-Anaya *et al.*, 2014; Quiterio-Pérez, 2012).

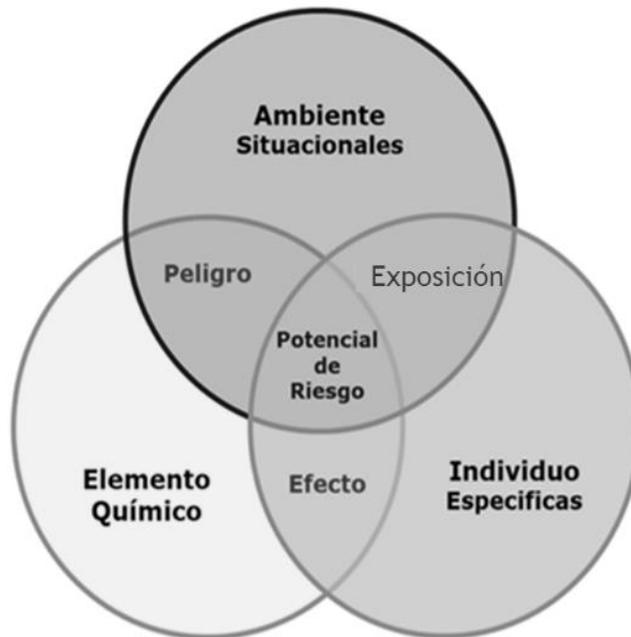


Figura 4. Diagrama de Venn propuesto para evaluar “Potencial de Riesgo” (Rodríguez-Anaya *et al.*, 2014).



Figura 5. Criterio de Valoración colorimétrica para indicadores ambientales y biológicos

7.1.3 Indicadores ambientales y/o biológicos, que determinan la probabilidad de riesgo asociado a la exposición a metales pesados.

1. Origen del compuesto. Es el indicador permite establecer la peligrosidad con base en la fuente de contaminación.

- A. Mixto **(5)**
- B. Antropogénico **(4)**
- C. Natural **(3)**
- D. Desconocido **(1)**

2.- Permanencia. Es el indicador que permite establecer la peligrosidad con base en la duración de un compuesto xenobiótico en el ambiente y se basa en su vida media (Tabla I).

- A. Permanente (indefinidamente) **(5)**
- B. Persistente (de varios meses a 20 años) **(4)**
- C. Moderadamente persistente (de 4 a 18 meses) **(3)**
- D. No persistente (de días hasta 12 semanas) **(2)**
- E. No se cuenta con el dato **(1)**

Tabla I. Adaptación de la clasificación de los metales pesados, según su vida media de efectividad propuesta por (Ramírez y Lacasaña, 2001).

PERSISTENCIA	VIDA MEDIA
No persistente	<2 semanas
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses
Persistente	19 meses hasta 20 años
Permanente	>20 a tiempo indefinido

3.- Frecuencia de entrada. Es el indicador que permite establecer la peligrosidad con base en la duración de un compuesto xenobiótico en el ambiente por un periodo determinado y se basa en si esta permanente a lo largo de un año, temporal por periodos definidos o de manera esporádica o aleatoria.

- A. Permanente **(5)**
- B. Temporal **(3)**
- C. Aleatorio o esporádico **(1)**

4.- Cociente de peligro. Este indicador permite establecer la peligrosidad con base en el cociente de peligro establecido por González-Mille *et al.*, (2010), el cual se refiere a la relación entre la concentración de metales pesados observada y la establecida como límite permisible de la norma NOM-127-SSA1-1994, si el coeficiente de peligro es menor a 1 es aceptable.

- A. 2 **(5)**
- B. 1 **(4)**
- C. >1 **(3)**
- D. No se cuenta con el dato **(1)**

5.- Escenarios de exposición. Este indicador permite establecer la probabilidad de una exposición entre el compuesto xenobiótico y los seres humanos, sustentado en el medio o medios en donde se encuentre disperso en el ecosistema y/o por una posible exposición laboral o accidental, incluyendo exposiciones consientes e inconscientes debido a la complejidad del ser humano. La cual se debe determinar por el número de veces de contactos y de sectores poblacionales expuestos.

- A. Posibilidad de exposición alta (múltiples contactos y sectores expuestos) **(5)**
- B. Posibilidad de exposición media (pocos contactos con varios sectores expuestos) **(4)**
- C. Posibilidad de exposición baja (múltiples contactos con un sector expuesto) **(3)**
- D. Posibilidad de exposición desconocida **(1)**

6.- Sectores Expuestos. Este indicador trata de establecer la probabilidad de una exposición de una sustancia con base en el número de sectores poblacionales posiblemente expuestos.

- A. Alta peligrosidad (dos o más sectores expuestos) **(5)**

- B. Media peligrosidad (un sector expuesto) **(3)**
- C. No se cuenta con el dato **(1)**

7.- Biodisponibilidad. Este indicador permite establecer la probabilidad de una exposición o contacto físico entre el compuesto xenobiótico y los seres humanos, sustentado en la posibilidad de que un compuesto ingrese a los sistemas biológicos, con base en las vías de exposición.

- A. Alta biodisponibilidad (más de una vía de ingreso a sistemas biológicos) **(5)**
- B. Media biodisponibilidad (una vía de ingreso a sistemas biológicos) **(4)**
- C. Baja Biodisponibilidad (por factores especiales o eventuales) **(2)**
- D. No se cuenta con el dato **(1)**

8.- Vías de exposición. Este indicador permite establecer la probabilidad de una exposición o contacto físico entre el compuesto xenobiótico y los seres humanos, sustentado en número de vías de exposición

- A. Alta peligrosidad, exposición directa e indirecta **(5)**
- B. Media peligrosidad contacto físico **(3)**
- C. Baja peligrosidad un solo contacto **(2)**
- D. No se cuenta con el dato **(1)**

9.- Biomagnificación. Este indicador permite de establecer la probabilidad de que se exprese un efecto nocivo a la salud con base en su capacidad de ejercer efecto por si sola o a través de sus metabolitos y por la capacidad de acumularse en sistemas biológicos e incluso por su biomagnificación a través de cadenas tróficas.

- A. Alta peligrosidad (biomagnifica y es agente directo e indirecto) **(5)**
- B. Media peligrosidad (bioacumula y es agente directo e indirecto) **(4)**
- C. Baja peligrosidad (no se bioacumula y es agente directo e indirecto) **(3)**
- D. Ligera peligrosidad (no se bioacumula y solo es agente directo) **(2)**
- E. No se cuenta con el dato **(1)**

10.- Toxicidad. Este indicador permite de establecer la probabilidad de que se exprese un efecto nocivo a la salud basado en su dosis letal 50 oral en rata, basándose en el supuesto que a menor DL50 mayor toxicidad aguda (Silbergeld, 1998).

- A. De 0 a 100 mg/kg **(5)**
- B. De 101 a 200 mg/kg **(4)**
- C. De 201 a 300 mg/kg **(3)**
- D. Más de 300 mg/kg **(2)**
- E. No se cuenta con el dato **(1)**

11.- Efecto biológico en sistemas mamíferos. Este indicador permite de establecer la probabilidad de que se exprese un efecto nocivo a la salud basado en reportes científicos que los relacionen con un efecto tóxico, genético, carcinogénico y/o teratogénico en sistemas mamíferos incluyendo al humano.

- A. Alta peligrosidad (efecto toxico, genético, carcinogénico y teratogénico) **(5)**
- B. Media peligrosidad (de los cuatro efectos mencionados, al menos dos) **(3)**
- C. Baja peligrosidad (de los cuatro efectos mencionados al menos uno) **(2)**
- D. No se cuenta con el dato **(1)**

12.- Efecto biológico en sistemas no mamíferos. Este indicador permite de establecer la probabilidad de que se exprese un efecto nocivo a la salud con base en reportes científicos que los relacionen con un efecto tóxico, genético, carcinogénico y/o reproductivo en sistemas no mamíferos.

- A. Alta peligrosidad (en dos o más sistemas en diferente escala evolutiva) **(5)**
- B. Media peligrosidad (solo en sistemas animales) **(4)**
- C. Baja peligrosidad (solo en sistemas vegetales) **(3)**
- D. Poca peligrosidad (solo en sistemas procariontes) **(1)**

Su análisis es a través de una matriz de dos vías (Tabla II) y basándose en los valores obtenidos por el análisis de indicadores y en la colorimetría mencionada en la figura 5, está dos herramientas permiten visualizar que indicadores son los principales

que contribuyen al potencial de riesgo, de manera individual (por elemento o por indicador) o colectiva, de una manera impersonal y de fácil interpretación.

Tabla II. Matriz de dos vías de los indicadores ambientales o biológicos.

Indicador ambiental o biológico		Cd	Cr	Hg	Pb
Peligro	1. Origen del compuesto.				
	2. Permanencia.				
	3. Frecuencia de entrada.				
	4. Cociente de peligro.				
Exposición	5. Escenarios de exposición				
	6. Sectores expuestos.				
	7. Biodisponibilidad.				
	8. Vías de exposición				
Efecto	9. Biomagnificación.				
	10. Efecto tóxico.				
	11. Efecto biológico en sistemas mamíferos.				
	12. Efecto biológico en sistemas no mamíferos.				
Total					

7.2 Evaluación la citotoxicidad en haba (*Vicia faba*)

Para evaluar la posibilidad de efectos tóxicos a nivel celular a través del índice mitótico en células meristemáticas de *Vicia faba* a diferentes concentraciones reportadas de los metales pesados con mayor potencial de riesgo en el río Tula, Hidalgo, se montó y calibro el bioensayo (Fig. 6) asegurando la viabilidad y germinación de las semillas, así como la división celular a nivel de las células meristemáticas de acuerdo a lo reportado (Gaytán, 2006; Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019).

7.2.1 Pasos metodológicos para análisis microscópico

La observación de la frecuencia y etapas de la división celular, así como de la frecuencia de micronúcleos, se requiere de montar los meristemas apicales en

laminillas para su observación en microscopía óptica a un aumento de 40X con los siguientes pasos. Germinación, Tratamiento (en el caso de un experimento), Fijación, Macerado, Tinción, Montaje para observación en microscopio y análisis (Fig. 6) (Gaytán, 2006; Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019).

Germinación

Las semillas de habas previamente se lavaron e hidrataron, colocándolas durante una hora en agua corriente y dejándolas reposar durante 24 horas en oscuridad (Fig. 6, A), posteriormente se trasladaron a una charola de disección y se colocaron entre dos capas de algodón humedecido y se mantuvieron nuevamente en oscuridad a 21°C hasta que aparecieron las radículas (Fig. 6, B). Cuando las raíces alcanzaron de 4 a 5 cm de longitud se separaron en lotes de 5 plántulas.

Tratamiento

Para cada tratamiento un grupo de raíces fueron expuestas a solución salina al 5% (control negativo) y un segundo y tercer grupo de plántulas se expusieron a los dos principales metales pesados con mayor potencial de riesgo, las concentraciones experimentales fueron elegidas con base en lo reportado por Montelongo y colaboradores (2008) para el sitio de estudio (Fig. 6, C).

Cada lote experimental o compuesto a evaluar tendrá:

- 1) Control negativo
- 2) Concentración reportada
- 3) Doble de la concentración reportada
- 4) Cuádruple de la concentración reportada

En el caso de los lotes 2-4, para determinar el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos se dividirá en dos sub lotes, para evaluar daño S-dependiente y S-independiente; cada uno con al menos 5 semillas germinadas por lote o tratamiento, para asegura tamaño de muestra (réplicas independientes).

- A.** Cuatro horas de exposición y dos de recuperación para evaluar el daño provocado en G2, el cual se expresa como aberraciones cromatídicas y solamente son inducidas por agentes S-independientes.
- B.** Cuatro horas de exposición con 14 horas de recuperación para evaluar el daño inducido en G1, el cual se manifiesta como una aberración cromosómica (se produce por agentes S-independientes) o cromatídica (se induce por un agente S-dependiente).

Dando un total de 4 lotes experimentales por elemento a evaluar (1 control negativo y tres lotes experimentales) cada uno con cinco plántulas tratadas, todos los lotes experimentales se mantuvieron con aireación constante a 20°C en oscuridad absoluta para favorecer la división celular (Fig. 7, D).

Fijación.

Al término del tratamiento, tanto las raíces tratadas, así como a los testigos se les cortaron de 2-3 milímetros del meristemo apical y se fijaron con etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas en refrigeración (Fig. 6, E).

Macerado.

Posterior a la fijación se colocaron los meristemas en etanol al 70% durante 15 minutos (Fig. 6, F), posteriormente se hidrolizaron con ácido clorhídrico 5 N a 28°C durante 25 minutos con agitación continua, se decantó el excedente de ácido clorhídrico y se lavaron los meristemas 3 veces con NaCl al 5% (Fig. 6, G).

Tinción.

Una vez macerados y enjuagados los meristemas se añadieron 2 gotas de acetoorceína al 2% durante 20 minutos en oscuridad absoluta (Fig. 6, H).

Montaje para observación al microscopio

Después de la tinción, se hicieron dos lavados con ácido acético al 45% para eliminar el exceso de colorante, posteriormente se colocó un cubre objetos y se realizó el aplastamiento en monocapa denominado “squash” (Fig. 6, I).

Análisis microscópico.

Antes de dar inicio a este análisis, se re-etiquetaron las preparaciones para realizar un análisis ciego, las preparaciones se observaron en un microscopio óptico a un aumento de 40X, cuantificando y analizándose 500 células en total por tratamiento (Control negativo y experimentales), en cada una se cuantificó el número de células en división, así como el número micronúcleos presentes (Fig. 6, J).

7.2.2 Determinación del índice mitótico (IM) y Análisis de la citotoxicidad (Gaytán, 2006).

El índice mitótico es la frecuencia de divisiones celulares entre el total (500 células) y se usa como indicador de citotoxicidad si esta frecuencia disminuye (Gaytán, 2006), se calculó a partir de la siguiente formula:

$$IM = \text{Número de células en división} / \text{Número de células totales}$$

7.2.3 Método de análisis de la citotoxicidad con base en el IM

La citotoxicidad se usa como referencia para evaluar daños secundarios como la genotoxicidad, la concentración más alta que se utiliza en un experimento para evaluar efectos genotóxicos es la de equivalente a un (IM) de 0.5 que equivale a que el 50% de las células dejaron de dividirse por algún efecto toxico, a partir de esta se pueden usar otras concentraciones experimentales menores denominadas “Concentraciones subtóxicas”.

Las 500 células evaluadas por tratamiento, se contabilizaron en cinco réplicas independientes (100 en cada una) para evitar sesgos de probabilidad y sensibilidad individual.

Posteriormente se probó la normalidad para cada tratamiento, previa transformación del porcentaje de división celular (Arco Seno de la raíz cuadrada del porcentaje en coeficiente) ($z = [(x - \mu) / \sigma]$). Ambas transformaciones permiten ajustar las variables a una distribución normal ortogonal, la cual fue corroborada por una prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilks para cada tratamiento (SW:0.916 ± 0.043; $p > 0.05$).

Los datos fueron contrastados mediante ANOVA factoriales independientes, donde se consideraron como variables independientes al contaminante, la concentración y el tiempo.

7.3 Evaluación de la genotoxicidad (*Vicia faba*)

La genotoxicidad se refiere a cualquier daño ocurrido al ADN por alguna agente xenobiótico, en esta caso se evaluó con la frecuencia de aparición de micronúcleos en interface de la células meristemáticas (Sánchez-Zepeda et al., 2019).

7.3.1 Determinación de la frecuencia de micronúcleos (fMN)

Para evaluar el efecto genotóxico en *Vicia faba* a través del análisis de la frecuencia de micronúcleos, se estableció la siguiente formula de acuerdo a lo recomendado por (Sánchez-Zepeda et al., 2019).

$$fMN = nMN / (nMN + nCM)$$

Donde:

- fMN: Frecuencia de micronúcleos en células meristemáticas.
- nMN: número de micronúcleos en células meristemáticas.
- nCM: número de células meristemáticas.

Los criterios de inclusión de micronúcleos, se basan en lo recomendado en la bibliografía, en donde se indica que un MN debe presentar las características necesarias para que el recuento sea fiable y objetivo, las cuales se enlistan a continuación (Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019):

- Diámetro menor a 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal
- No refractarios
- Intensidad de tinción similar a los núcleos principales o superior
- Forma similar al núcleo principal
- No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
- Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada, pero no solaparse con ellos

7.3.2 Método de análisis de micronúcleos y determinación de la genotoxicidad.

Al igual que el índice mitótico, la frecuencia de micronúcleos (fMN) se determinó con 500 células por tratamiento (Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019), separadas en cinco réplicas independientes para evitar sesgos de probabilidad y sensibilidad individual (100 en cada una). La frecuencia de estos se usa como indicador de daño genotóxico ya sea por un daño al uso mitótico (efecto anaugénico) o bien, fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico).

Posteriormente se probó la normalidad para cada tratamiento, previa transformación del porcentaje de división celular (Arco Seno de la raíz cuadrada del porcentaje en coeficiente) y de la frecuencia de micronúcleos ($z = \frac{(x_I - \mu)}{\sigma}$). Ambas transformaciones permiten ajustar las variables a una distribución normal ortogonal, la cual fue corroborada por una prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilks para cada tratamiento (SW:0.916 ± 0.043; p > 0.05).

Los datos fueron contrastados mediante ANOVA factoriales independientes para la frecuencia de micronúcleos. Donde se consideró como variables independientes al contaminante, la concentración y el tiempo.

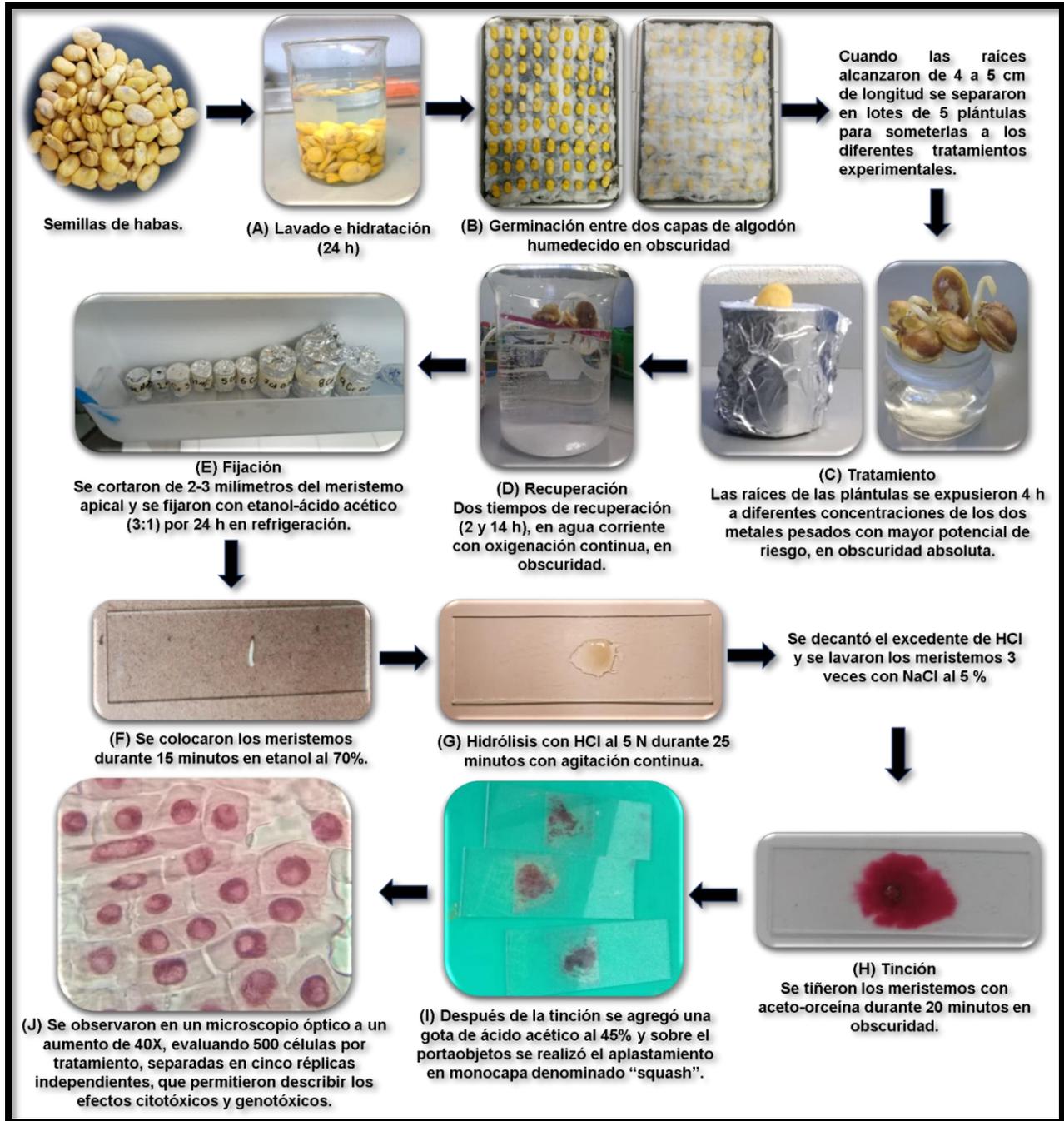


Figura 6. Bioensayo con *Vicia faba* para determinar citotoxicidad y genotoxicidad.

VIII. Resultados

8.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR)

Los resultados de la recopilación bibliográfica de las semejanzas y diferencias de nuestros cuatro compuestos a evaluar, basados en el reporte más reciente de Montelongo y colaboradores, 2008, se encuentran concentrados en la tabla III, en donde observamos las diferentes características fisicoquímicas propias del compuesto, así como las características de la población expuesta, las cuales son; origen del compuesto en la matriz a evaluar, vida media del compuesto en el ambiente y dentro del organismo, cinética ambiental, frecuencia de entrada a la matriz ambiental, relación entre las concentraciones reportadas, límites máximos permisibles, reportes técnicos y científicos de efectos nocivos a la salud, vías de exposición, ingreso a la biota, biodisponibilidad y las permisibles (cociente de peligro); que en conjunto permitan determinar el potencial de riesgo asociado a una exposición.

En la tabla III se observan que una de las principales semejanzas y diferencias es que los compuestos pueden tener alta permanencia en el ambiente desde un año, hasta 300 años, de los cuatro compuestos evaluados, siendo el más persistente el Cd; aunque no todos tiene la misma frecuencia de entrada a la matriz ambiental siendo permanentes el Cd y el Cr y esporádicos el Hg y Pb; los más peligros con base a la concentración reportada y los límites permisibles establecidos por las NOMS son el Cd y Pb; todos tienen un origen antropogénico (Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019).

Por otra parte, hay evidencia de que los cuatro elementos son biodisponibles ya que se han reportado dentro de diversas plantas y animales de consumo alimenticio (Montelongo *et al.*, 2008; Lara-Viveros *et al.*, 2015), además los cuatro manifiestan uno u otro efecto biológico, tienen capacidad de biomagnificación, cinética ambiental, genotoxicidad y carcinogénesis en diferentes grados, aunado a que debido a que este cuerpo de agua recorre varios kilómetros del estado de México y del estado de Hidalgo. hay muchos sectores expuestos incluyendo sectores de riesgo como son niños, adultos mayores y mujeres embarazadas (Ayuntamiento de Tula de Allende, 2016).

Otro de los elementos que se pueden observar en esta tabla III, es que en cuanto a la exposición los cuatro elementos pueden estar en contacto con la biota e incluso con el ser humano por la vía de contacto, ingesta y área lo cual según la ATSR (2009) los hace extremadamente peligrosos y con alto potencial de riesgo a la salud; de manera más particular se puede observar en cuanto al efecto teratogénico del cadmio, mercurio y plomo hay evidencias de daño durante el desarrollo embrionario mientras que para el Cr casi no hay estudios que lo demuestren.

En cuanto a los efectos carcinogénicos observados se puede decir que el Cd, Cr y Hg son los que tiene mayor probabilidad de ejercer un efecto positivo en cuanto a la inducción de algún proceso cancerígeno asociado a una exposición.

Finalmente se evidencia que para el potencial de riesgo se contemplan muchas variables que sin una metodología de análisis es muy difícil establecer un orden en cuanto a que elemento es más o menos peligroso para la población humana expuesta a las aguas del río Tula de manera directa e indirecta.

Tabla III. Matriz comparativa con semejanzas y diferencias ambientales y biológicas de los cuatro principales metales pesados presente en el río Tula, Hgo.

Origen	Cadmio	Cromo	Mercurio	Plomo	Referencia
	Antropogénico	Antropogénico	Antropogénico	Antropogénico	Montelongo <i>et al.</i> , 2008
Vida media en el ambiente	(1) 300 años (2) Permanente	(1)50 años (2) Permanente	(1) 1 año (2)Moderadamente persistente	(1)80 años (2) Permanente	(1)Jarup, 2003 (2) Ramírez y Lacasaña, 2001
Vida media en el organismo	De 10 a 30 años (3)	27 años (1)	40 días (4)	De 25 a 30 años (2)	(1) Rossman, 2007 (2) Nordberg, 1998 (3) Sánchez, 2016 (4) Carmona, 2009
Frecuencia de entrada	Permanente	Permanente	Esporádico	Esporádico	Montelongo <i>et al.</i> , 2008
Cociente de peligro	2	1	0.9	2	NOM-127-SSA1-1994

Concentración ambiental reportada	0.01 mg/l	0.05 mg/l	0.001 mg/l	0.025 mg/l	Montelongo <i>et al.</i> , 2008
Límite máximo permisible	0.2 mg/l	0.05 mg/l	0.009 mg/l	0.05	NOM-127-SSA1-1994
Reportes en	Maíz, trigo, alfalfa, agua y suelo (1) Maíz, alfalfa, frijol, maguey, haba, nopal y calabaza (2) Agua (3) Maíz, alfalfa y suelo (4)	Maíz, trigo, alfalfa, frijol, maguey, haba, nopal, calabaza y cebada (2) Agua (3)	Maíz, maguey, haba, nopal (2) Agua (3)	Agua, trigo y alfalfa (1) Maíz, trigo, alfalfa, frijol, maguey, haba, nopal, calabaza y cebada (2) Agua (3) Maíz y suelo (4)	(1) Vázquez-Alarcón <i>et al.</i> , 2001 (2) Prieto-García <i>et al.</i> , 2007 (3) Montelongo <i>et al.</i> , 2008 (4) Lara-Viveros <i>et al.</i> , 2015
Sectores expuestos	La población del municipio de Tula de Allende es de 109,093 habitantes, de los cuales: Infantes de 0 a 4 años 8,615 (7.5%) Niños de 5 a 14 años 19,143 (16.7%) Jóvenes de 15 a 24 años 18,262 (16.1%) Adultos de 25 a 59 años 51,237 (48.6%) Adultos mayores 60 y más años 11,711 (10.9%) No especificado 125 (0.1%)				Ayuntamiento de Tula de Allende, 2016
DL50	Ratas de 225 mg/kg(1)	Ratas mg/kg (2)	180 Ratas (3)	Ratas 37 mg/kg	Ratas de 100 a 825 mg/kg (4)
Vías de ingreso	Aérea, oral y cutánea (3)	Aérea, oral y cutánea (2)	Aérea y oral (1)	Aérea, oral y cutánea (3)	(1)ATSDR, 1999 (2)Nordberg, 1998 (3)Sánchez, 2016
Efectos genotóxicos	Positivo en bajas concentraciones (0.112, 0.056 y 0.028 ppm) (2)	Positivo a bajas concentraciones (0,2, 0,4 y 0,8 ppm) (1)	Metilmercurio mostro una actividad genotóxica positiva en el ensayo cometa in vivo en hemocitos de <i>D. melanogaster</i> (3)	Nitrato de plomo mostro una actividad genotóxica positiva en el ensayo cometa in vivo en hemocitos de <i>D. melanogaster</i> (3)	(1)Prieto <i>et al.</i> , 2008 (2)Sánchez-Zepeda <i>et al.</i> , 2019 (3)Carmona, 2009
Efectos teratogénicos	Positivo: Reducción de peso en los recién nacidos, aumento de abortos espontáneos y alteraciones en el desarrollo gonadal (4)	No hay estudios que demuestre daño teratogéno en humanos, sin embargo, estudios en animales han demostrado que la exposición a dosis altas durante la	Positivo: aumento de abortos espontáneos y crías nacidas muertas, además causa daño en el sistema reproductivo, hepático, intestinal y	Positivo: atraviesa la barrera placentaria, aumento de abortos espontáneos, aumento de morbilidad perinatal, en exposición	(1)ATSDR, 1999 (2)Ramírez, 2005 (3)ATSDR, 2012 (4)Tirado <i>et al.</i> , 2015

		preñez puede producir abortos, bajo peso y alteraciones en el desarrollo del esqueleto y del sistema reproductivo (3)	circulatorio de las crías (1)	paterna causa hipospermia (2)	
Efecto carcinogénico	Positivo: diversos estudios demuestran relación dosis respuesta con cáncer pulmonar (3)	Positivo: diversos estudios han descrito un aumento en la incidencia de cáncer de pulmón. Los cromatos de zinc y calcio parecen ser los más cancerígenos y se cuentan entre los cancerígenos más potentes en humanos (3)	En humanos no existen estudios que demuestren efecto carcinogénico. En ratas expuestas a mercurio orgánico mostraron un aumento en la tasa de cáncer de riñón, sin embargo, estos estudios no proveen información suficiente para determinar si el mercurio produce cáncer en seres humanos (1)	Experimentalmente puede causar cáncer en animales, estudios en humanos han encontrado aumento significativo de varios tipos de cáncer (estómago, pulmón y vejiga), pero aún no hay evidencia respecto a eventuales acciones carcinógenas (2) La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado al plomo inorgánico y los compuestos de plomo inorgánico en el Grupo 2B como posibles cancerígenos para el hombre (3)	(1)ATSDR, 1999 (2)Ramírez, 2005 (3)Nordberg, 1998
Biomagnificación	Alto factor de biomagnificación en Invertebrados, plantas, peces, algas y mamíferos (1).	Bajo factor de biomagnificación, debido a que presenta alta toxicidad a bajas concentraciones, impidiendo la biomagnificación, ya que el organismo muere antes de ser asimilado por el siguiente nivel trófico, con lo que el Cr pasaría de nuevo al sedimento que se comporta	Alto factor de biomagnificación en Invertebrados, plantas, peces, algas y mamíferos (1).	Muy bajo factor de biomagnificación, diversos autores mencionan un decremento en la concentración a lo largo de la cadena trófica (1)	(1) Molina <i>et al.</i> , 2012 (2)Montoya-Palomino <i>et al.</i> , 2015

Cinética ambiental	En agua, aire y suelo (1)	como sumidero (2) En agua, aire y suelo (2)	En agua, aire y suelo (3)	En agua, aire y suelo (4)	(1)ATSDR, 2012 a (2)ATSDR, 2012 b (3)ATSDR, 1999 (4)ATSDR, 2020
Vía de absorción	Digestiva, cutánea y respiratoria (3)	Digestiva, cutánea y respiratoria (1)	Digestiva, cutánea y respiratoria (2)	Digestiva, cutánea y respiratoria (2)	(1)ATSDR, 2012 b (2)Nordberg, 1998 (3)Sánchez, 2016

De acuerdo a la aplicación de los indicadores ambientales y/o biológicos, para determinar la probabilidad de riesgo asociada a la exposición a metales pesados propuesta en el presente trabajo, se analizaron a través de una matriz de dos vías, 12 variables (4 de peligro, 4 de exposición y 4 de efecto), de los cuatro principales metales pesados de interés toxicológico (Cd, Cr, Hg y Pb) reportados en la zona de estudio (Tabla IV).

Basado en la suma de los valores obtenidos y en la colorimetría propuesta el cadmio y el cromo se encuentran dentro de la categoría de Potencial de Riesgo Alto identificado con el color rojo, en este caso, cadmio con un valor de 59 puntos y el cromo con un valor de 53 puntos; así mismo, se puede observar que el plomo y mercurio, cuentan con 46 y 44 puntos respectivamente, lo cual los ubica a ambos en un rango de Potencial de Riesgo Medio (color amarillo).

En cuanto al peligro, se puede observar todos los elementos presenta el mismo valor en cuanto origen, pero en cuanto permanencia, frecuencia de entrada a la matriz ambiental, y cociente de peligro se pueden observar claramente diferencias, siendo le elemento más peligroso el Cd con un valor acumulado de 19/20 seguido por el Cr 18/20 y el menos peligroso es el Hg con un valor d 11/20, principalmente por valores tan bajos en la frecuencia de entrada a la matriz al igual que el Pb (Tabla IV).

En cuanto a la probabilidad de exposición (Tabla IV), se puede observar que nuevamente el Cd es el que tiene el valor más alto 20/20, mismo valor registrado por el

Pb; mientras que las diferencias entre Cr y Hg son insignificantes variando entre las posibles “Vías de exposición” y los “Escenarios de exposición” con valores de 18/20 para Cr y 16/20 para Hg.

Finalmente, en cuanto a la tabla IV, en lo que se refiere a los posibles efectos nocivos a la salud por estos cuatro elementos, se nuevamente el de mayor valor fue el Cd (20/20) seguido de manera cronológica por Cr (17/20), Hg (16/20) y Pb (11/20) sobre todo porque no ejercen los mismo efecto tóxicos y biológicos en sistemas mamíferos como es el caso del ser humano, lo cual finalmente permite nuevamente determinar que el Cd y el Cr son los dos elementos que presentan mayor “Potencial de riesgo”.

Tabla IV. Resultados del análisis de los indicadores ambientales y biológicos.

		<i>Indicador ambiental</i>			
		Cd	Cr	Hg	Pb
<i>Peligro</i>	1. Origen del compuesto.	4	4	4	4
	2. Permanencia.	5	5	3	5
	3. Frecuencia de entrada.	5	5	1	1
	4. Cociente de peligro.	5	4	3	5
<i>Exposición</i>	5. Escenarios de exposición	5	5	3	5
	6. Sectores expuestos.	5	5	5	5
	7. Biodisponibilidad.	5	5	3	5
	8. Vías de exposición	5	3	5	5
	9. Biomagnificación.	5	4	5	2
<i>Efecto</i>	10. Efecto tóxico.	5	3	4	2
	11. Efecto biológico en sistemas mamíferos.	5	5	2	2
	12. Efecto biológico en sistemas no mamíferos.	5	5	5	5
Total		59	53	43	46

8.2 Citotoxicidad

Una vez determinado que el Cd y el Cr presentan en el presente trabajo el mayor Potencial de Riesgo, se decidió trabajar las siguientes concentraciones para evaluar sus efectos biológicos:

Cadmio (Cd):

- Control negativo (NaCl 5%)
- Concentración reportada (0.01 mg/L)
- Concentraciones subtóxicas (0.02 mg/L y 0.04mg/L).

Cromo (Cr):

- Control negativo (NaCl 5%)
- Concentración reportada (0.05 mg/L)
- Concentraciones subtóxicas (0.1 mg/L y 0.2 mg/L).

Las concentraciones experimentales fueron elegidas con base en las cantidades (mg/L) reportadas de Cd y Cr por Montelongo y colaboradores en 2008 para el sitio de estudio, adicionalmente se duplicaron las concentraciones para ambos elementos sin que sobrepasaran el límite máximo permisible según la NOM-001-ECOL-1996.

En general se observa que el índice mitótico y las diferentes etapas del ciclo celular (Fig. 7) fue inhibido por efecto de ambos metales (Fig. 8), tanto Cd como Cr en las tres concentraciones experimentales muestran una disminución en el IM, con respecto al testigo (NaCl 5%) (Tabla V). El Cd su valor más bajo de IM se obtuvo a la concentración de 0.02 mg/L con 2h de recuperación, mientras que el Cr el nivel más bajo se encontró a la concentración de 0.1 mg/L con 2h de recuperación.

Además, el análisis estadístico de Varianza Factorial (Tabla VI) indica que las interacciones metal*tiempo y concentración*tiempo son significativas por lo consiguiente el valor de índice mitótico que presentan las células está en dependencia del metal y el tiempo de recuperación. Tanto la triple interacción

(metal*concentración*tiempo) como la interacción del metal con la concentración no resultaron significativas (Tabla VI). Los resultados de las pruebas pareadas de Tukey para los ANOVAS factoriales (Tabla V) nos indica que la inhibición del IM en todos los experimentos, a excepción de los testigos (NaCl 5%), no son estadísticamente significativos entre sí.

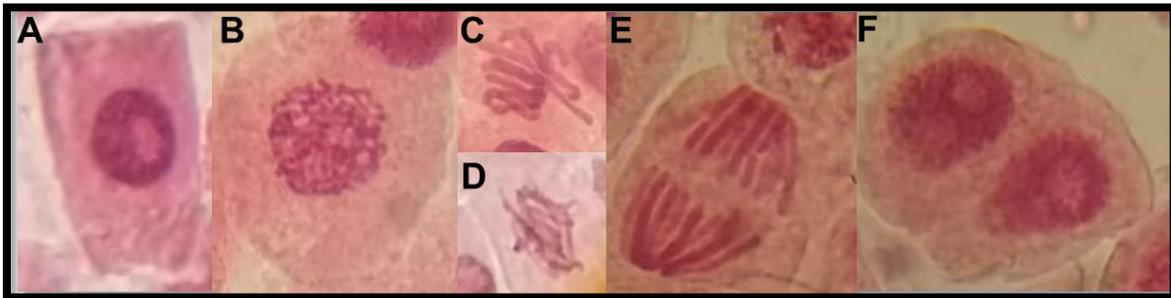


Figura 7. Etapas mitóticas de células meristemáticas de *Vicia faba*.

(A) Interfase (B) Profase (C) y (D) Metafase (E) Anafase y (F) Telofase.

Tabla V. Porcentaje de muestra del Índice mitótico (IM) con Cd y Cr a diferentes concentraciones.

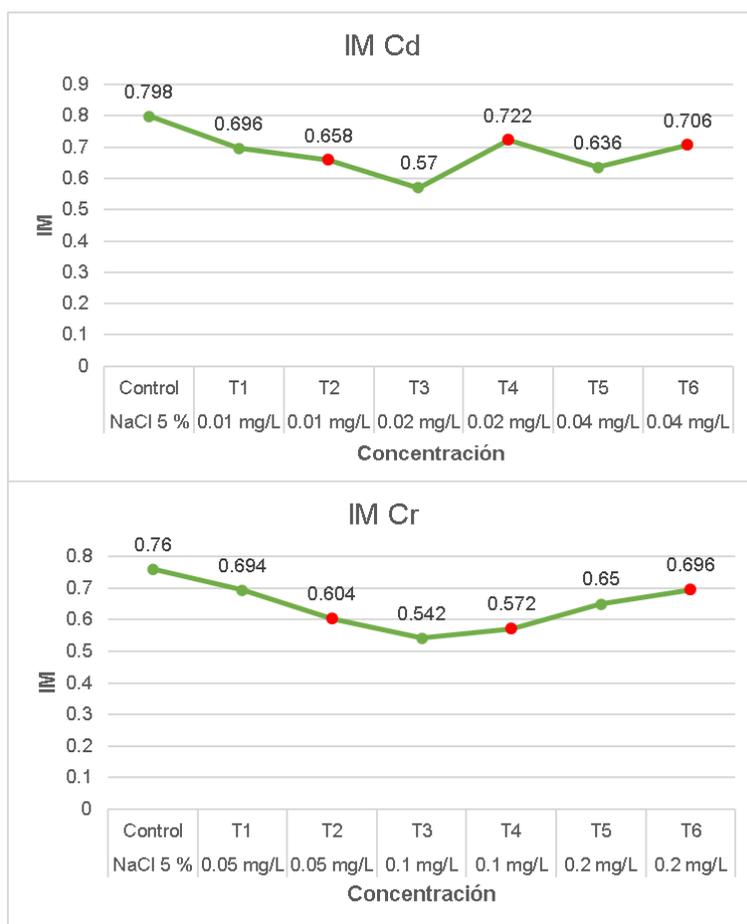
Metal pesado	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	IM ($\mu \pm \sigma$)
Cadmio	Control NaCl 5%	2 h	79.8 \pm 8.52 a
	0.01 mg/L	2 h	69.6 \pm 5.68 cd
		14 h	65.8 \pm 7.05 bcd
	0.02 mg/L	2 h	57 \pm 6.36 bcd
		14 h	72.2 \pm 4.15 cd
	0.04 mg/L	2 h	63.6 \pm 3.5 d
14 h		70.6 \pm 5.55 ac	
Cromo	Control NaCl 5%	2 h	76 \pm 7.81 ac
	0.05 mg/L	2 h	69.4 \pm 6.77 bcd
		14 h	60.4 \pm 13.13 bd
	0.1 mg/L	2 h	54.2 \pm 8.17 bcd
		14 h	57.2 \pm 5.26 bcd
	0.2 mg/L	2 h	65 \pm 4.18 bd
		14 h	69.6 \pm 3.84 bd

*Las letras representan las pruebas pareadas de Tukey para los ANOVAS factoriales.

*Los niveles máximos de inhibición mitótica se señalan en rojo, niveles intermedios se muestran en amarillo y niveles bajos de inhibición en verde.

Tabla VI. Análisis de Varianza Factorial para el índice mitótico (IM).

FACTOR	Suma de Cuadrados	Grados de Libertar	Cuadrado Medio	F	p
Metal	0.03153	1	0.03153	6.36	0.014649
Concentración	0.29039	3	0.09680	19.53	0.000000
Tiempo	0.04882	1	0.04882	9.85	0.002754
Metal*concentración	0.02417	3	0.00806	1.63	0.194275
Metal*tiempo	0.02254	1	0.02254	4.55	0.037534
Concentración*tiempo	0.09601	3	0.03200	6.46	0.000815
Metal*concentración*tiempo	0.00743	3	0.00248	0.50	0.683946



*Todos los tratamientos se expusieron 4 h al metal, los marcadores rojos corresponden a los tratamientos con 14 h de recuperación, los demás corresponden a una recuperación de 2 h.

Figura 8. índice mitótico (IM) de Cd y Cr

8.3 Genotoxicidad

Ambos metales presentaron un aumento en la frecuencia de micronúcleos (fMN) en comparación con el testigo (NaCl 5%) (Fig. 11 y 12). Para el Cd la mayor frecuencia de micronúcleos se observó en la concentración 0.01 mg/L en el tratamiento corto (2h de recuperación) (Fig. 11). En el caso del Cr la mayor frecuencia se encontró en la concentración 0.2 mg/L, tratamiento corto (2h de recuperación).

En cuanto al Análisis de Varianza Factorial para la frecuencia de micronúcleos (Tabla VIII) solo se observó un efecto significativo debido a la concentración de los contaminantes.

La prueba pareada de Tukey (Tabla VII) nos indica que la fMN de todos los experimentos, a excepción de los testigos (NaCl 5%), no son estadísticamente significativos entre sí.

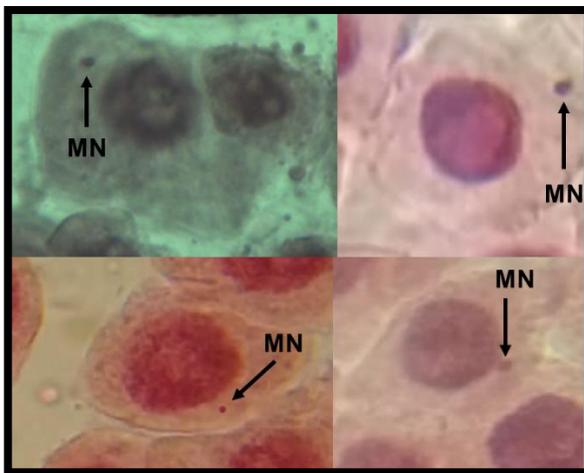


Figura 9. MN observados en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba* (40x) con Cd.

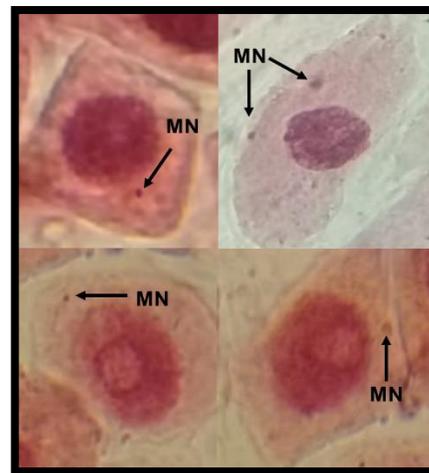
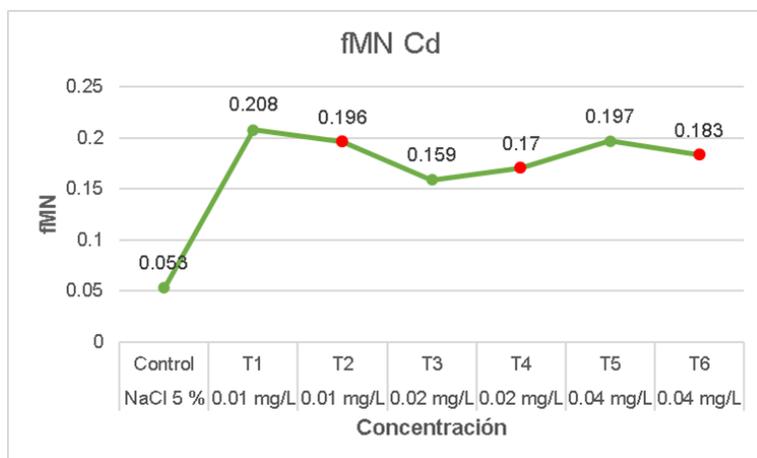
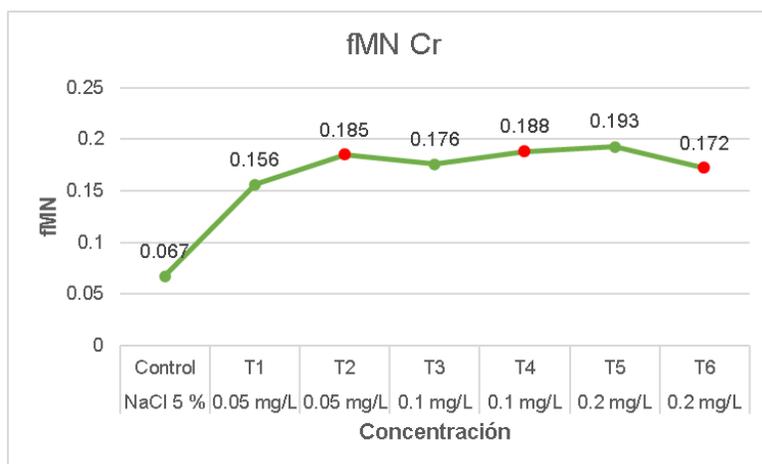


Figura 10. MN observados en células meristemáticas de raíz de *Vicia faba* (40x) con Cr.



*Todos los tratamientos se expusieron 4 h al metal, los marcadores rojos corresponden a los tratamientos con 14 h de recuperación, los demás corresponden a una recuperación de 2 h

Figura 11. Frecuencia de Micronúcleos (fMN) observados con Cd



*Todos los tratamientos se expusieron 4 h al metal, los marcadores rojos corresponden a los tratamientos con 14 h de recuperación, los demás corresponden a una recuperación de 2 h

Figura 12. Frecuencia de Micronúcleos (fMN) observada con Cr

Tabla VII. Frecuencia de micronúcleos (fMN) observada con Cd y Cr.

Contaminante	Concentración	Tiempo	fMN ($\mu \pm \sigma$)
Cadmio	NaCl 5%	2 h	5.6 ± 1.67 a
	0.01 mg/L	2 h	26.4 ± 9.6 b
		14 h	24.4 ± 4.16 b
	0.02 mg/L	2 h	19 ± 4.47 b
		14 h	20.6 ± 2.4 b
	0.04 mg/L	2 h	24.6 ± 2.6 b
		14 h	22.4 ± 3.13 b
	Cromo	NaCl 5%	2 h
0.05 mg/L		2 h	18.6 ± 9.9 b
		14 h	22.8 ± 4.66 b
0.1 mg/L		2 h	21.4 ± 3.78 b
		14 h	23.2 ± 3.83 b
0.2 mg/L		2 h	24 ± 4.47 b
		14 h	20.8 ± 3.83 b

Las letras representan las pruebas pareadas de Tukey para los ANOVAS factoriales. Los niveles más altos en la fMN se señalan en rojo, niveles intermedios se muestran en amarillo y niveles bajos de inhibición en verde. *500 células evaluadas por tratamiento.

Tabla VIII. Análisis de Varianza Factorial para la frecuencia de micronúcleos (fMN).

FACTOR	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Contaminante	0.01296	1	0.01296	0.02971	0.863784
Concentración	43.09322	3	14.36441	32.92271	0.000000
Tiempo	0.00678	1	0.00678	0.01554	0.901250
Contaminante y concentración	2.15892	3	0.71964	1.64939	0.188825
Contaminante y tiempo	0.21173	1	0.21173	0.48527	0.489034
Concentración tiempo	1.08406	3	0.36135	0.82821	0.484141
Contaminante, concentración y tiempo	0.66419	3	0.22140	0.50744	0.678811

IX. Discusión

9.1 Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo (ERPR).

La ERPR es una metodología alternativa para la toma de decisiones rápidas, en este caso adecuada a los metales pesados reportados para el río Tula, Hidalgo, la cual es una herramienta que permite identificar situaciones de potencial de riesgo biológico y ambiental, basado en el análisis sistemático de reportes bibliográficos, para determinar el impacto de las variables ambientales, biológicas y situacionales de manera clara, rápida y resumida. Esta evaluación está basada en diferentes metodologías que la sustentan (Tambutti *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2007; Gaytán-Oyarzun, 2012; Quiterio-Pérez, 2012, Rodríguez-Anaya, *et al.*, 2014; Gaytán *et al.* 2020), pero con diferencias tangibles en la elección y aplicación de los indicadores ambientales y/o biológicos. La ERPR tiene la ventaja de la flexibilidad de adecuarse a otros contaminantes en cualquier tipo de ambiente y brindarnos una visión integral de la problemática.

En cuanto a los resultados del Potencial de riesgo por intersección de las dimensiones evaluadas (Peligro, Exposición y Efecto) (Tabla IV). Los valores más homogéneos para los metales evaluados los encontramos en el eje de “Exposición”, esto tiene sentido debido a que se trata de la misma población para todos los agentes, existiendo la misma probabilidad de que el sector o sectores expuesto estén en contacto con los cuatro metales pesados elegidos, ya que todos ellos comparten presencia, entrada, solubilidad en agua, vía de ingreso a sistemas biológicos y persistencia de más de un año.

Por el contrario las mayores diferencias las podemos observar en los indicadores que se encuentran dentro de los ejes “Peligro y Efecto”, debido a que los cuatro metales presentan características intrínsecas de capacidad de daño variables, tanto el Hg como el Pb presentan en algunos indicadores ambientales valores bajos debido a diferentes circunstancias como la frecuencia con la que han sido reportados (esporádicos), así como por la relación entre su concentración reporta y las normas oficiales que los regulan (cociente de peligro), en donde el Cd y Cr presentaron valores más altos y el

Hg el más bajo; en cuanto a su efecto tóxico y DL50, también se observó alta variabilidad, siendo más tóxico el Hg y el menos tóxico el Pb, mientras que para estos mismos indicadores el Cd y Cr se encuentran en valores intermedios, así como con los mayores efectos tóxicos; por lo tanto, se puede observar que la metodología permite tener una visión integral de los tres ejes por lo tanto al hacer la sumatoria del valor de los diferentes indicadores no arroja los agentes que tienen una probabilidad mayor de que un efecto negativo se manifieste en la población expuesta (Quiterio-Pérez, 2012; Rodríguez-Anaya, *et al.*, 2014).

En cuanto al eje de efectos potenciales, el que presenta mayor posibilidad de expresar un daño nocivo a la salud en los sectores expuestos es el Cr, mientras que el que presenta menos probabilidad es el Pb, lo cual es lógico porque el primero presenta reportes que lo relacionan con efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Tabla III).

9.2 Citotoxicidad

En lo que respecta a la evaluación de los efectos citotóxicos, se puede observar en la tabla V, que ambos metales en todas las concentraciones presentan una disminución en el índice mitótico. La causa primaria de la citotoxicidad a nivel bioquímico es que ambos metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. Los efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y estos ligandos están, a su vez, presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones o como moléculas aisladas. En este sentido, cabe destacar la gran afinidad que muestran los metales pesados, como principales ligandos, por grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo (Navarro-Aviño, 2007).

El resultado de las uniones ligando-metal es muy perjudicial para la célula, inhibiendo y/o disminuyendo su división, destacando en este aspecto sobre otros fenómenos, (1) La acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por interrupción en la estructura de las mismas, (2) El desplazamiento de elementos esenciales de su

metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y (3) La catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Navarro-Aviño, 2007).

Según Causil *et al.* (2017) y Sánchez-Zepeda *et al.*, (2019), las variaciones en el IM son un criterio aceptable de citotoxicidad para todos los sistemas biológicos. Los valores en el IM por debajo del testigo negativo pueden indicar que el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos ha sido afectado por el agente evaluado. Una disminución de más del 50% usualmente tiene efectos subletales; si el IM disminuye a menos del 22% del valor presentado en el testigo negativo, significa que se están provocando efectos letales en los organismos expuestos. Por el contrario, los IM por sobre los valores del testigo negativo, son el resultado de la estimulación de la división celular, lo cual puede caracterizar un evento dañino para las células, que conlleva a una proliferación descontrolada (Béraud *et al.*, 2007; Valencia-Quintana *et al.*, 2013; Causil *et al.*, 2017). En el presente estudio ninguna de las concentraciones experimentales disminuyó más del 30% el IM con respecto a los testigos.

El cadmio (Cd) mostró una disminución en el IM en todas las concentraciones experimentales, siendo en las concentraciones de 0.02 y 0.04 mg/L, ambos en el tratamiento corto (2 h de recuperación), en donde se observó el IM más bajo, por el contrario, el más alto se encontró en los testigos (NaCl 5%), resultados similares fueron obtenidos por Sánchez-Zepeda *et al.* (2019), en donde reportaron una disminución del IM en presencia de Cd en las tres concentraciones experimentales evaluadas (0.112, 0.056 y 0.028 mg/L), además mencionan que el Cd produce efectos tóxicos en concentraciones muy pequeñas, aún por debajo de los límites máximos permisibles en agua, propuestos en la NOM-001-ECOL-1996.

Por otra parte, el cromo (Cr) también mostro una disminución del índice mitótico en nivel más bajo se observó en la concentración de 0.1 mg/L en el tratamiento corto (2 h de recuperación) y el más alto en el testigo (Tabla V), Aurazo y de Esparza (1995) reportaron que es posible observar una disminución en el IM en concentraciones bajas de Cr (0.5 mg/L), también demostraron que el efecto citotóxico está en relación directa

con la concentración de cromo, encontrando una inhibición del 50% o más de la mitosis en concentraciones superiores a 5 mg/l.

En general se observó un efecto positivo en cuanto a la inhibición del Índice mitótico tanto de Cd y Cr, además los análisis estadísticos nos indican que las interacciones metal*tiempo y concentración*tiempo son significativas. En cuanto a los resultados de la prueba pareada de Tukey la concentración, tiempo y metal no son estadísticamente significativos entre sí, por lo cual se recomienda, incrementar los tiempos de tratamiento, así como probar otras concentraciones.

9.3 Genotoxicidad

Ambos metales resultaron ocasionar efecto genotóxico, tal como lo menciona Hernández-Franco y colaboradores (2009) la mayoría de los metales pueden inducir genotoxicidad generando daño al ADN, sin embargo, no todos los metales actúan mediante el mismo mecanismo de acción, por lo que es importante tomar en cuenta el metal involucrado, la dosis, duración y vía de exposición.

La fMN más alta para el Cd se encontró en la concentración de 0.01 mg/L y para el Cr 0.2 mg/L, dichas concentraciones no fueron las más altas. En los tratamientos con concentraciones más altas de ambos metales se observó una ligera disminución en la fMN, esto se explica según lo reportado por Gaytán (2006) y Sánchez-Zepeda y colaboradores (2019) donde mencionan que la disminución de la fMN en los tratamientos con concentraciones más altas se debe a que el efecto citotóxico aumenta y puede encubrir al efecto genotóxico, debido a que las células simplemente no se dividen, es decir hay menos células por unidad de área en ambos metales, lo que se traduce en una baja en la división celular disminuyendo con esto la aparición de micronúcleos, debido a que para que se manifiesten tiene que haber división celular (Gaytán, 2006; Sánchez-Zepeda *et al.*, 2019).

En cuanto al Cd resultados similares reporto Sánchez-Zepeda (2019), en donde utilizaron el bioensayo con *Vicia faba* a tres concentraciones (0.112 mg/L, 0.56 mg/L y 0.028 mg/L), reportando un incremento, en la fMN en las tres concentraciones

evaluadas, observando que dicho aumento está relacionado con la concentración de Cd, además también mencionan que el daño al genoma se produce aún en el control, sin embargo en presencia de concentraciones bajas de Cr puede aumentar.

Los estudios genotóxicos de Cr en modelos vegetales son escasos, sin embargo su efecto en células animales ha sido descrito, Prieto y colaboradores (2008) reportaron en un bioensayo animal, donde expusieron individuos de *Oreochromis niloticus* “tilapia” a diferentes concentraciones de Cr (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/L), reportando un incremento en la fMN en eritrocitos, en todas las concentraciones experimentales, por lo cual el Cr posee la capacidad de incrementar la fMN en concentraciones bajas.

En cuanto al Análisis de Varianza Factorial para la frecuencia de micronúcleos solo se observó un efecto significativo debido a la concentración de los contaminantes, mientras que la prueba pareada de Tukey nos indica que las fMN no son estadísticamente significativas, por lo que al igual que para la citotoxicidad, se recomienda, incrementar los tiempos de tratamiento, así como probar otras concentraciones.

Si conjuntamos los efectos citotóxicos y los efectos genotóxicos del cromo (Cr) y de cadmio (Cd), que se generan a concentraciones menores, así como la probabilidad de que una gran cantidad de personas sean expuestas de manera directa e indirecta a este cuerpo de agua contaminado, incluyendo varios sectores de riesgo, sustenta los resultados obtenidos de análisis de “Potencial de riesgo” en donde existe una alta probabilidad de que al exponerse a esta fuente de contaminación se pueda expresar un daño nocivo a la salud.

Lo anterior, junto con lo que ya se sabe de efectos nocivos a la salud por el cadmio y el cromo los hace aún más peligrosos; por su parte el cadmio además de los efectos tóxicos y genotóxicos induce otros efectos colaterales como diarreas, dolor de estómago y vómitos severos, debilidad de huesos, problemas en la capacidad reproductiva e incluso con la posibilidad de generar infertilidad, y daños al sistema nervioso central. En cuanto al cromo, este además es capaz de inducir erupciones cutáneas, malestar de estómago, úlceras, problemas respiratorios, debilitamiento del

sistema inmune y daño en los riñones e hígado (Cañizares-Villanueva, 2000; Duffus, 2002).

XI. Conclusiones

Los resultados de la Evaluación Rápida del Potencial de Riesgo resaltan que de los cuatro metales pesados de interés toxicológico (Cd, Cr, Hg, y Pb) reportados por Montelongo y colaboradores en el 2008 en el río Tula, Hidalgo, el Cadmio (Cr) y el cromo (Cd) presentaron un mayor potencial de riesgo (Nivel 3: Alto potencial de riesgo), principalmente por sus efectos potenciales, la probabilidad de exposición y por su alta concentración que se refleja como un cociente de peligro alto.

Respecto a la citotoxicidad, se observó que a las concentraciones probadas en el bioensayo de Haba (*Vicia faba*), hay un efecto positivo en cuanto a la inhibición del Índice mitótico para ambos metales (Cd y Cr), los tiempos de recuperación no mostraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que los daños de estos metales son de tipo cromátidico y subcromátidico.

En cuanto a la genotoxicidad ambos metales en todas las concentraciones evaluadas, promueven un incremento en la frecuencia de micronúcleos (fMN), pudiendo ser por un daño por un daño al uso mitótico (efecto anaugénico) o bien, fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico).

Por otra parte, el análisis estadístico, permitió evidenciar que para la citotoxicidad el tipo de contaminante y el tiempo resultaron relevantes, mientras que la para la genotoxicidad únicamente la concentración fue relevante, independientemente del tiempo o del tipo de metal.

Considerando que las concentraciones evaluadas son las reportadas en el sitio de estudio, y que estas generan un daño genotóxico y citotóxico, se puede afirmar que existe un alto potencial de riesgo y peligrosidad para la población que tiene contacto con este recurso hídrico, sin considerar que la presente investigación no contempla las relaciones sinérgicas y aditivas que pueden existir entre los diferentes contaminantes presentes en este cuerpo de agua, lo cual pudiera aumentar más el potencial de riesgo y sus efectos; lo cual abre nuevas líneas de investigación.

Finalmente, los resultados del presente trabajo en conjunto con el conocimiento de que las variables fisicoquímicas del área de estudio pueden variar con respecto al tiempo, se abren líneas de investigación obligadas, que requieren de una continua evaluación de la calidad de este recurso hídrico y de sus efectos potenciales en la población.

XI. Bibliografía.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1999). Toxicological profile for mercury. U.S. Department of Health and Human Services, 676 p. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp46.pdf> (Consultado Junio 2019).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012 a). Toxicological profile for cadmium. U.S. Department of Health and Human Services, 487 p. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5.pdf> (Consultado: mayo 2019).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012 b). Toxicological profile for chromium. U.S. Department of Health and Human Services, 592 p. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf>(Consultado: mayo 2019).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2020). Toxicological profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services, 583 p. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf> (Consultado: septiembre 2020).

Albert, L. A., y Jacott, M. (2015). México tóxico: Emergencias Químicas. Ed. *Siglo veintiuno*. 310 p. ISBN-13: 978-6070306983.

Alborghetti, G., Casanova, M., Graziela, de O., Laís, F., Nádia, L., y Gatti, P. (2014). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 65(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.bjanes.2013.07.008>

Arango, S. (2012). Cardiovascular issues. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30, 75–82. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0986-5_19

Aurazo, M., y Esparza, M. L. (1995) Toxicidad aguda del cromo usando *Allium cepa* L. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. (CEPIS). División de Salud y Ambiente. Organización Panamericana de la salud. (OPS), p. 95-25.

Ayuntamiento de Tula de Allende. (2016). Plan Municipal de desarrollo, municipio de Tula de Allende. Ed. Gobierno Del Estado de Hidalgo.

http://planestataldedesarrollo.hidalgo.gob.mx/pdf/PMD/076-TULA_DE_ALLENDE/PMD_Tula_de_Allende.pdf

- Ballester, F. (2015). Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *The Lancet Oncology*, 16(6), 159–175. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70238-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70238-X)
- Bedregal-Flores, S. K. (2010). Estandarización del método Trad-MCN en *Tradescantia cerinthoides* y prueba con biomonitoreo activo en la ciudad de La Paz, Bolivia. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Andrés. 102 p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25357.03047>
- Beltrán, R. A., y Beltrán, P. M. (2016). Regulation of the cell cycle (CC) of *Vicia faba* L by the alcoholic extract of *Annona cherimola* Mill “cherimoya.”. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 245–251. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.12>
- Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P. y Férard, J.F. (2007). Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research.*, 633, 112–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.05.013>.
- Cabrera-Cruz, R. B. E., Gordillo Martínez, A. J., y Cerón-Beltrán, Á. (2003). Inventario de contaminación emitida a suelo, agua y aire en 14 municipios del estado Hidalgo, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 19(4), 171–181.
- Camacho, Á. (2011). Uso racional de los biomarcadores en toxicología laboral. Ed. Eneas. 116 p. ISBN 8493845019, 9788493845018.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143.
- Carmona, E. (2009). Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos SMART de alas y Cometa. Tesis de Doctorado en ciencias ambientales. Universidad Autónoma de Barcelona. 169 p. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2009/tdx-0406110-152259/eco1de1.pdf>
- Causil, V.L.A., Coronado, G.J.L., Verbel, M.L.F., Vega, J.M.F., Donado, E.K.A. y Pacheco, G.C. (2017). Efecto citotóxico del hipoclorito de sodio (NaClO), en células

apicales de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11 (1), 97-104. Doi: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>

Contero, R. y Felicita, O. (2006). Utilización de bioensayos para la determinación de contaminación en agua de riego en la cuenca del río Granobles. *La Granja, revista de ciencias de la vida*, 4(1), 38. <https://doi.org/10.17163/lgr.n4.2005.05>

Contreras-Vigil, A. M., García Santiago, G. y Icaza Hernández, B. (2013). Calidad del aire: una práctica de vida. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 28 p.

Correa-Díaz, F. (2006). Manual de laboratorio de bioensayos. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas, 285 p. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26819.04646>

Cortés-Muñoz, J. E. y Calderón-Mólgora, C. G. (2011). Uso potable del agua de acuíferos en contacto con zonas de riego que usan agua residual. *Retos de la investigación del agua en México*, 293–302. <https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2017/06/retos-de-la-investigación-del-agua-en-mexico.pdf>

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. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>

Dávila-Rodríguez, A. G. y Guzmán-García, E. (2015). Caracterización del agua utilizada para irrigación de tierras de cultivo en el distrito 003-Tula. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional, 102 p.

Doadrio-Villarejo, A. (2004). Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 70, 933–959.

Duffus, J. H. (2002). “heavy metals” - A meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>

Fernández, A. (2012). El agua: un recurso esencial. *Química Viva*, 11(3), 147–170.

- Ferrari, L. (2015). La ecotoxicología aplicada a la evaluación de la contaminación de los ríos: el caso del río Reconquista. *Revista Ciencia e Investigación*, 2, 17–35. <http://aargentina.ciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCel/tomo65-2/3-Ferrari-cei65-2-3.pdf>
- Ferré-Huguet, N., Schuhmacher, M., Llobet, J. M. y Domingo, J. L. (2007). Metales pesados y salud: diseño de un software para evaluar los riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelos y aire. *Mapfre Seguridad*, 27(108), 50–58. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2508799%0Ahttps://www.mapfre.com/ccm/content/documentos/fundacion/prev-ma/revista-seguridad/n108-programa-hra-metales-pesados.pdf>
- Gaytán, J. C. (2006). Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera. Tesis de Doctorado en Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 82 p.
- Gaytán-Oyarzun, J. C., Pulido-Flores, G., Monks, S., López-Escamilla, A., López-Herrera, M., Romero-Bautista, L., Villavicencio-Nieto, M., y Pérez-Escandón B. (2012) Evaluación Rápida de Biodiversidad para Estimar Prioridad Biológica (ERBIO), 107-124. En [Sampedro-Rosas, M. L. y González-González, J., 2012]. Calidad ambiental y desarrollo sustentable. Tomo II. Universidad Autónoma de Guerrero e INDAUTOR, 314 p.
- Gaytán, J. C., Sánchez, M. A. y Cabrera, R. B. E. (2020). Evaluación potencial de riesgo genotóxico de compuestos xenobióticos, capítulo 6, 87-100. En [Pichardo, R., Tobías, R y Treviño, J., 2020]. Investigaciones actuales para el medio ambiente II. Ed. Colofón, 211 p.
- Goldman, L. R. y Koduru, S. (2000). Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: A public health and policy perspective. *Environmental Health Perspectives*, 108, 443–448. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3443>
- González, M., Barrientos, M. y Juárez, A. (2018). Comemos lo que vertimos. Consultoría y Tecnología Ambiental S. A. <https://cta-consultoria.com/comemos-lo-que-vertimos>.

- González-Mille, D.J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinoza-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I. y Mejía-Savedra, J. (2010). Exposure to Persistent Organic Pollutans (POPs) and DNA damage as an indicator of enviromental stress in fish or different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, *Mexico.Ecototoxicology*, 19,1238-1248.
- Gutiérrez, M.C. y Fortuol, T. (1997). Conceptos básicos de toxicología ambiental. Cap. 5, 53-79 En [Albert, L. A., 1997]. Introducción a la toxicología ambiental. Gobierno del Estado de México, 471 p.
- Hernández-Franco, P., Valverde, M. y Rojas, E. (2009). Los metales como inhibidores del sistema de reparación del ADN. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 12(2), 75-82.
- Hernández, I., Kampfner, O., Rodríguez, F., y Meneses, J. (2017). Uso múltiple del agua en las cuencas del Valle de México y Río Tula. *Revista de Ingeniería Civil*, 1(1), 1–11.
- Instituto Nacional de Ecología. (2004). Perspectivas del medio ambiente en México GEO México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 322 p.
- Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68,167-182.
- Jiménez, B. (2016). Ecosistema de aguas continentales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 21 p.
- Jorgensen, S. E. (2016). Ecotoxicology and chemistry applications in environmental management. *Ed. CRC Press*, 312 p. ISBN: 9781498716529.
- Lara-Viveros, F. M., Ventura-Maza, A., Ehsan, M., Rodríguez-Ortega, A., Vargas-Monter, J. y Landero-Valenzuela, N. (2015). Contenido de Cd y Pb en suelo y plantas de diferentes cultivos irrigados con aguas residuales en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(2), 127–132.

- Lema, I. I. (2003). La evaluación de riesgo por sustancias tóxicas. *Gaceta Ecológica*, 45–56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53906903>
- Llanes, J. (2005). Métodos de evaluación rápida. *Liberaddictus*, 86, 69-72.
- Molina, C., Ibañez, C. y Gibon, F. M. (2012). Proceso de biomagnificación de metales pesados en un lago hiperhalino (Poopó, Oruro, Bolivia): posible riesgo en la salud de consumidores. *Ecología en Bolivia*, 47(2), 99–118.
- Montelongo, C. R., Gordillo, M. A. J., María, O. E., Villagómez, I. J. R., Acevedo, S. O. A. y Prieto, G. F. (2008). Modelación de la calidad del agua Río Tula del estado de Hidalgo, México. *Dyna*, 75(154), 5–18. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/1709>
- Montelongo Casanova, R., Prieto García, F., Gordillo Martínez, A. J., Otazo Sánchez, E. y Villagómez Ibarra, J. R. (2007). Estudio Preliminar de clasificación del Río Tula en el estado de Hidalgo. Parte 2. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 88, 66–72.
- Montoya-Palomino, W., Peña-Salamanca, E. J. y Torres-Rodríguez, G. A. (2015). Variaciones ultraestructurales inducidas por Cromo (VI) en hojas de jacinto acuático (*Eichhornia crassipes*). *Limnetica*, 34(1), 85–94. <https://doi.org/10.23818/limn.34.08>
- National Research Council. (1983). Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process. The National Academies Press, 191 p. <https://doi.org/10.17226/366>
- Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar Alonso, I. y López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 1–9. <https://doi.org/10.7818/re.2014.16-2.00>
- Newman, M. C. (2015). Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution. Ed. CRC Press/Taylor y Francis, 663 p. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996). Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

<https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/60197.pdf>

Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994). Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>

Nordberg, G. (1998). Metales: propiedades químicas y toxicidad. Cap. 63, 76 p. En (Stellman, J. M., 1998). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Tomo II. Ed. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. <https://www.insst.es/tomo-ii>

Oldring, P. K. T., O'Mahony, C., Dixon, J., Vints, M., Mehegan, J., Dequatre, C., & Castle, L. (2014). Development of a new modelling tool (FACET) to assess exposure to chemical migrants from food packaging. *Food Additives and Contaminants - Part A*, 31(3), 465 p. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.862348>

Paz, M., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., y Moretton, J. (2008). Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 24(2), 79–87.

Prieto-García, F., Méndez-Marzo, M., Martínez-Pezina, F. y Prieto-Méndez, J. (2007). Presencia de metales pesados en cultivos del Valle del Mezquital, México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 3(2), 100–110.

Prieto, Z., León-incio, J., Quijano-jara, C., Fernández, R., Polo-Benites, E., Vallejo-Rodríguez, R. y Villegas-Sanchez, L. (2008). Eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (TILAPIA). *Revista Peruana de Medicina Experimental*, 25(1), 51–58. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n1/a08v25n1.pdf>

Quiterio-Pérez, M. (2012). Evaluación del efecto biológico de los principales pesticidas organoclorados (POs) residuales presentes en el agua y sedimento de la laguna de Metztitlán, Hidalgo, México con base a su “Potencial de Riesgo”. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 73 p.

- Ramírez, J., y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67–75.
- Ramírez, A. V. (2005). El cuadro clínico de la intoxicación ocupacional por plomo Occupational lead poisoning. *Anales de La Facultad de Medicina*, 66(1), 57–70. <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v66n1/a09v66n1>
- Robles-Camacho, J. y Armienta, M. A. (2000). Natural chromium contamination of groundwater at Leon Valley, Mexico. *Journal of Geochemical Exploration*, 68(3), 167–181. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(99\)00083-7](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(99)00083-7)
- Rodríguez-Anaya, A., Octavio-Aguilar, P. y Gaytán-Oyarzún, J. C. (2014). Potencial de riesgo y efectos biológicos en *Danio rerio* por presencia en el ambiente de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 194 p.
- Romero, K. (2009). Contaminación por metales. *Revista Científica de Ciencia Médica*, 12(1), 45–46. http://www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v12n1/v12n1_a13.pdf
- Rossmann, T. (2007). Arsenic. In: Rom W and Markowitz S. Ed. Environmental and Occupational Medicine 4th edition, Hagerstown, MD. Lippincott Williams y Wilkins, 1017 p.
- Salinas-Chávez, E., González-Sousa, R., Quintela-Fernández, J., Montiel-Rodríguez, S., Domínguez-Tapia, J. J., Escalante-Richards, V., Conde-Asiain, A., Chávez-Ávila, F., Serrano-Pardo, L., Cuevas-Martínez, A., Rodríguez-Gómez, A., García-Martínez, H., Camarillo, J. P., Romo-Nájera, J., Damián-García, F. A. y Damián-García, Á. de J. (2001). Ordenamiento ecológico y territorial del estado de Hidalgo. Gobierno del estado de Hidalgo, 307 p.
- Sánchez, G. (2016). Ecotoxicología del cadmio: riesgo para la salud de la utilización de suelos ricos en cadmio. Tesis de Licenciatura en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, 21 p. http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/GARA_SANCHEZ_BARRON.pdf

- Sánchez, J. B. (1984). Criterios toxicológicos generales para los contaminantes químicos. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), 5 p. <https://doi.org/2342-38373>
- Sánchez, O., Medellín, R., Aldama, A., Goettsch, B., Soberón, J. y Tambutti, M. (2007). Método de valuación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología, México, DF, 170 pp.
- Sánchez-Zepeda, M. Y., López-Herrera, M., Gordillo-Martínez, A. J., Gaytán-Oyarzún, J. C., Prieto-García, F. y Octavio-Aguilar, P. (2019). micronúcleos, índice mitótico y aberraciones cromosómicas como biomarcadores de genotoxicidad en haba (*Vicia faba* L.) por efecto de cadmio. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 10(1), 27–40. http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/27
- Santamaría-Monsoríu, J. V. (2016). Ilustración de *Vicia Faba*. *Ilustra Ciencia*. <http://www.blog.illustraciencia.info/2016/03/vicia-faba-jose-vicente-santamaria.html>
- Sarukhán, J. (CONABIO). (2006). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 71 p. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2013). Programa de ordenamiento ecológico de la región Tula-Tepeji. Universidad Autónoma Metropolitana, 71 p.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y Colegio de Postgraduados. (2003). Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, escala 1:250,000. Memoria Nacional, 68 p.
- Silbergeld, E. (1998). Toxicología. Cap. 33, 84 p. En [Stellman, J. M., 1998]. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Tomo I. Ed. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. <https://www.insst.es/tomo-i>

- Tambutti., M., Aldama, A., Sánchez, O., Medellín, R. y Soberón J. (2001). “La determinación del riesgo de extinción de especies silvestres en México.” *Gaceta Ecológica* 61, 11-21.
- Tirado, L. R., González-Martínez, F. D., Martínez, L. J., Wilches, L. A. y Celedón-Suárez, J. N. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Revista Nacional de Odontología*, 11(21), 83–99. <https://doi.org/10.1007/BF00789163>
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso De Los Biomarcadores En La Evaluación De La Contaminación. *Luna Azul*, 32, 121–127. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742011000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Torres-Bugarín, O. y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650–657. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022013000200050>
- Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Gómez-Arroyo, S., Cortés-Eslava, J., Waliszewski, S.M. y Fernández, S. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29, 133-157. <http://www.redalyc.org/html/370/37028958008/index.html>
- Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Gómez-Olivares, J., Juárez-Santacruz, L., García-Gallegos, E., Montiel-González, J., García-Nieto, E., y Waliszewski, S. (2005). VYDATE L-24, un plaguicida carbámico que induce aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de *Vicia faba*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(1), 63–70.
- Vázquez-Alarcón, A., Justin-Cajuste, L., Siebe-Grabach, C., Alcántar-González, G. y De La Isla De Bauer, M. D. L. (2001). Cadmio, Níquel y Plomo en agua residual, suelo y cultivos en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Agrocencia*, 35(3), 267–274.

Volke, T., Velasco, J. y Pérez, D. la R. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, 144 p. ISBN: 9688174920
<https://books.google.com.ec/books?isbn=9688174920>