



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

I z t a p a l a p a

**EL COCODRILO DE PANTANO (*Crocodylus moreletii*) COMO ORGANISMO
BIOINDICADOR DE EXPOSICIÓN A PLOMO Y CADMIO EN UNA LAGUNA URBANA
DEL ESTADO DE TABASCO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología

PRESENTA

Selene Karinna Trujillo Vázquez

Dr. Jose Luis Gómez Olivares

Dra Patricia Ramírez Romero

M. en C. Marco Antonio López Luna

Diciembre de 2016

La Maestría en Biología de la
Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de
Postgrados de Calidad del CONACyT.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

SELENE KARINNA TRUJILLO VÁZQUEZ

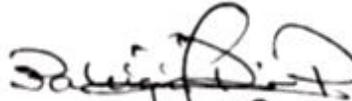
El día 12 de Diciembre del año 2016.

Comité Tutorial

Director: Dr. Jose Luis Gómez Olivares



Codirectora: Dra Patricia Ramírez Romero



Asesor externo: M. en C. Marco Antonio López Luna



Jurado

Presidente: M. en C. Marco Antonio López Luna



Secretario: Dra. Martha Anahí Gúizado Rodríguez



Vocal: Dr. Pedro Rafael Valencia Quintana



Vocal: Dr. Noe Salinas Arreourta



AGRADECIMIENTOS

A los chicos cocodrileros, en especial Jorge y Zurita, quienes me apoyaron en todas mis salidas y que sin su ayuda no hubiese logrado capturar tantos cocodrilos y divertirme en el proceso.

Al M. en C. Marcos, por permitirme una vez más trabajar con él, además de procurar que no nos faltase nada en campo y estar al pendiente siempre.

Al Dr. Olivares, quien ha sido una excelente persona y gran asesor, aconsejándome sabiamente en materia de mi tesis, así como de mi vida cotidiana, su honestidad y forma de pensar me animaron en todo momento para continuar.

A la Dra. Paty, quien amplió mi visión y logró mostrarme que existen personas que trabajan con lo que me interesa, además de que el límite lo impone uno mismo.

A Maritza, quien no sólo me apoyó muchísimo con estadística (jajaja) sino que también es una muy buena persona que me enseñó a ser un poco más relajada.

A Iliana, mi hermana postiza, que ha estado muchos años a mi lado, mi roca y una fuente de inspiración para estudiar toxicología.

Al Dr. Armella, quien ha sido un excelente coordinador de posgrado, siempre al pendiente de nosotros y ayudándonos lo más que puede para que no suframos tanto.

A la persona más importante de mi vida, la inspiración para luchar por mis sueños, quien me ha dado la vida y un apoyo incondicional. Quien ha aguantado mis locuras y que, aunque alguna cosa no le parezca, siempre ha respetado mi decisión, siempre ha estado allí para mí, física o espiritualmente. Quien sabe que mi mayor anhelo es superarme, esperando algún día ser una persona tan grande como ella, a ti mamá sobre todas las cosas GRACIAS, te dedico especialmente este trabajo.

RESUMEN

Los cocodrilos, están expuestos a una gran cantidad de compuestos tóxicos, los cuales producen efectos nocivos para la fauna silvestre. Acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) son indicadores cuya inhibición ha sido asociada con la exposición a diversos xenobióticos. Las Transaminasas como GOT, GPT, GGT y FA son de gran importancia al momento de evaluar daño en tejidos colinérgicos, reforzando así el diagnóstico del individuo. Además, los metales pesados como plomo (Pb) y cadmio (Cd) tienen la capacidad de producir daños irreversibles en el hígado que podrían afectar a los organismos. Los trabajos sobre parámetros bioquímicos en *C. moreletii* son escasos, razón por la cual este estudio evalúa la modificación de parámetros enzimáticos en organismos provenientes de la Laguna de las Ilusiones, evaluando así el estado de salud de dichos organismos en este cuerpo de agua.

Se realizaron capturas de ejemplares de *C. moreletii* de dos poblaciones, una silvestre y una en cautiverio (CICEA). Se obtuvieron muestras sanguíneas por punción en seno occipital, depositando y manteniendo las muestras en Vacutainers heparinizados a 4°C. Las muestras de agua se tomaron en recipientes plásticos y se conservaron en congelación hasta su análisis. Se estimó la actividad de Transaminasas por tiras Reflotron, actividad colinesterásica por el método de Ellman (1961), albúmina por verde de bromocresol, proteínas totales por método de Biuret, concentración de Pb y Cd en sangre, así como muestras de agua por espectrofotometría en cámara de Grafito

En organismos silvestres los niveles de Albúmina fueron menores que en el CICEA, siendo este índice relacionado con estados nutricionales deficientes, disfunción renal o hepatitis. Hembras de la Laguna presentaron el menor conteo de proteína cuantificada, lo que suele estar íntimamente relacionado a inmunodeficiencias, así como enfermedades hepáticas en humanos. La actividad de AChE fue mayor en adultos y crías de la Laguna, no así en juveniles. En BuChE se encontraron valores menores que AChE en ambos grupos. En organismos silvestres, GOT y GPT, se encuentran mucho más elevadas que en organismos del CICEA, seguido por FA, que fue mayor en juveniles y adultos en cautiverio, GGT se encuentra en niveles similares en todos los organismos tanto silvestres como del CICEA. GOT es la más relacionada a daños necróticos en hígado. El ANDEVA mostró que la actividad de enzimas como AChE, BuChE, GPT y GOT es diferente entre CICEA y Laguna, mientras que GGT y FA no lo son. Los niveles de Pb en sangre y agua fueron mayores que Cd y presentaron una relación significativa con los cambios en actividad enzimática observados en los organismos. Dichas diferencias no se presentaron en relación al sexo de los organismos, por tanto, los organismos de la Laguna están siendo expuestos a contaminantes que pueden provocar un daño hepático crónico en la población de cocodrilos de éste cuerpo de agua.

ABSTRACT

Crocodiles are exposed to a large number of toxic compounds, which produce effects harmful to wildlife. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are indicators whose inhibition has been associated with exposure to various xenobiotics. Transaminases such as GOT, GPT, GGT and FA are of great importance when assessing damage in cholinergic tissues, thus reinforcing the diagnosis of the individual. In addition, heavy metals like lead (Pb) and cadmium (Cd) have the ability to produce irreversible damage to the liver that could affect organisms. The work on biochemical parameters in *C. moreletii* is scarce, which is why this study evaluates the modification of enzymatic parameters organisms from Laguna de las Ilusiones, thus evaluating the health status of these organisms in this body of water.

Catches of *C. moreletii* were taken from two populations, one wild and one in captivity (CICEA). Blood samples were obtained by puncture in the occipital sinus, depositing and maintaining the samples in heparinized Vacutainers at 4 ° C. The water samples were taken in plastic containers and were kept freezing until analysis. Transaminase activity was estimated by Reflotron strips, cholinesterase activity by Ellman's method (1961), albumin with bromocresol green, total proteins by Biuret's method, Pb and Cd concentration in blood of individuals, as well as water samples by graphite chamber spectrophotometry

In wild organisms Albumin levels were lower than in CICEA, this index being related to poor nutritional status, renal dysfunction or hepatitis. Laguna females presented the lowest quantified protein count, which is usually closely related to immunodeficiencies, as well as liver diseases in humans. AChE activity was higher in adults and offspring of the Laguna, but not in juveniles. BuChE values were lower than AChE in both groups. In wild organisms, GOT and GPT, are much higher than in CICEA organisms, followed by AF, which was higher in juveniles and adults in captivity, GGT is found at similar levels in all wild and CICEA organisms. GOT is the most related to necrotic liver damage. ANDEVA showed that the activity of enzymes such as AChE, BuChE, GPT and GOT is different between CICEA and Laguna, whereas GGT and FA are not. Pb levels in blood and water were higher than Cd and showed a significant relationship with changes in enzyme activity observed in organisms. These differences were not presented in relation to the sex of the organisms, therefore the organisms of the Lagoon are being exposed to contaminants that can cause a chronic liver damage in the population of crocodiles of this body of water.

| | | |
|----|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 9 |
| 2. | ANTECEDENTES | 10 |
| | a. Plomo | 10 |
| | I. Fuentes de contaminación | 11 |
| | II. Metabolismo | 12 |
| | III. Intoxicación aguda y crónica | 13 |
| | b. Cadmio | 14 |
| | I. Fuentes de contaminación del cadmio | 14 |
| | II. Metabolismo | 14 |
| | III. Intoxicación aguda y crónica | 16 |
| | c. Indicadores Biológicos de Calidad Ambiental | 18 |
| | I. Bioindicadores | 18 |
| | II. Biomarcadores | 18 |
| | III. Importancia de los Biomarcadores | 19 |
| | IV. Proteínas totales en suero | 20 |
| | V. Colinesterasas | 21 |
| | VI. Funciones de las colinesterasas | 23 |
| | VII. Transaminasas | 24 |
| | d. <i>Crocodylus moreletii</i> | 25 |
| | I. Características generales | 25 |
| | II. Distribución | 26 |
| | III. Alimentación | 26 |
| | e. Estudios sobre contaminantes en cocodrilos | 26 |
| 3. | JUSTIFICACIÓN | 31 |

| | | |
|----|---|----|
| 4. | PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 32 |
| 5. | HIPÓTESIS | 32 |
| 6. | OBJETIVOS | 32 |
| | a. General | 32 |
| | b. Específicos | 32 |
| 7. | ÁREAS DE ESTUDIO | 33 |
| | a. Laguna de las Ilusiones | 33 |
| | b. Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas (CICEA) | 34 |
| 8. | MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| | a. Trabajo de campo | 34 |
| | I. Obtención de muestras sanguíneas | 34 |
| | II. Localización de ejemplares | 35 |
| | III. Toma de muestras del medio | 36 |
| | b. Trabajo de laboratorio | 37 |
| | I. Análisis de plasma y agua | 37 |
| | i. Determinación del contenido de plomo y cadmio por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS) | |
| | 37 | |
| | ii. Estimación de las actividades: gama glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), alanina aminotransferasa (ALT/GPT) y aspartato aminotransferasa (AST/GOT) por tiras de reflotron | 39 |
| | iii. Cuantificación de la albúmina sérica por el método de cresolsulfonftaleína (verde de bromocresol) | 39 |
| | iv. Cuantificación del contenido total de proteínas por método de Bradford | 40 |

| | | | |
|-----|-----|--|----|
| | v. | Identificación de proteínas mediante la reacción el Biuret | 41 |
| | vi. | Estimación de la actividad colinesterásica | 41 |
| | c. | Análisis estadístico | 42 |
| 9. | | RESULTADOS | 43 |
| | a. | Muestreo de organismos | 43 |
| | b. | Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua | 44 |
| | a. | Actividad enzimática en plasma de cocodrilos reproductores | 49 |
| | c. | Actividad enzimática en juveniles y crías | 53 |
| | | En cocodrilos juveniles y crías los niveles promedio por individuo de albúmina fueron de 1.008 a 2.9 g/dL. Las crías tuvieron un promedio de albúmina cuantificada de 2.038 g/dL (CICEA) y 1.37 g/dL (Laguna). Mientras, que los juveniles presentaron 3.858 g/dL (CICEA) y 1.850 g/dL (Laguna) (Figuras 6 y 7). | 53 |
| | | En cocodrilos juveniles de la Laguna, el contenido de albúmina fue menor ($x = 1.850172$) que aquellos del CICEA ($x=3.858326$) (Figura 6), en crías la diferencia fue menos notoria (Figura 7), sin embargo, en los organismos silvestres los niveles de albúmina siempre fueron menores que en el grupo en cautiverio. | 54 |
| | d. | Metales pesados | 59 |
| | a. | Análisis global | 61 |
| 11. | | DISCUSION | 66 |
| 12. | | CONCLUSIONES | 78 |
| 13. | | REFERENCIAS | 79 |

**El cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) como organismo
bioindicador de exposición a plomo y cadmio en una laguna urbana del
Estado de Tabasco**

1. INTRODUCCIÓN

El cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) es una especie de agua dulce que se distribuye en México, Guatemala y Belice (Groombridge, 1987; Thorbjarnarson, 1992), es una de las tres especies de cocodrilos protegidas por la NOM-059-SEMARNAT-2010; asimismo es considerada de menor preocupación por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés), estando enlistada en el apéndice II de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES) (Groombridge, 1987).

Los cocodrilos en su ambiente, como cualquier otro ser vivo, están expuestos a una gran cantidad de elementos y compuestos tóxicos, entre ellos los metales pesados, los cuales se acumulan en los organismos, produciendo efectos nocivos en la fauna silvestre (Maduabuchi *et al.*, 2006).

Las fuentes de procedencia de los distintos contaminantes son diversas y las rutas seguidas escapan al control necesario, provocando diversos problemas que podrían afectar la reproducción de los organismos expuestos (Hall *et al.*, 1979; Guillete *et al.*, 1994; Rainwater *et al.*, 2002; Milnes *et al.*, 2004; Pepper *et al.*, 2004).

Las actividades humanas han supuesto un aumento en la redistribución de los metales en los distintos compartimentos del medio (Fyfe, 1998) y desde el punto de vista toxicológico, el plomo (Pb) y el cadmio (Cd) son dos de los metales con los

efectos más peligrosos sobre la salud (Scheuhammer, 1987, García-Fernández y María-Mojica, 2000).

En los últimos años, se han informado diversos problemas relacionados con la reproducción de cocodrilianos en la Laguna de las Ilusiones, Tabasco, por razones aún desconocidas (López-Luna, 2010; Trujillo-Vázquez, 2011). Se ha observado una marcada diferencia en el éxito reproductivo en comparación con los ejemplares en cautiverio (Casas-Andreu *et al.*, 2011). Por otra parte, diversos aspectos biológicos de *C. moreletii* aún no han sido ampliamente estudiados. Los trabajos de esta naturaleza son escasos, razón por la cual este estudio evalúa la modificación de parámetros enzimáticos en hembras y machos reproductores, juveniles y crías provenientes de la Laguna de las Ilusiones, estableciendo la posibilidad de emplear a éstos organismos como bioindicadores de exposición a compuestos hepatotóxicos en este cuerpo de agua.

2. ANTECEDENTES

a. Plomo

El Pb es uno de los metales más usados por los humanos, es detectable en prácticamente todas los compartimentos del ambiente y los sistemas biológicos. Los niveles ambientales de Pb han sido incrementados más de 1,000 veces en los últimos tres siglos como resultado de la actividad humana, el mayor incremento ocurrió entre 1950 y 2000 (Doadrio-Villarejo, 2006). El Pb es un elemento natural que se encuentra en el grupo 14 (IV A) de la tabla periódica, con

un peso atómico de 207.2, es de color gris-azulado usualmente combinado con dos o más elementos para formar componentes de Pb.

I. Fuentes de contaminación

Las fuentes de contaminación pueden ser naturales o antropogénicas, como es habitual en estos metales tóxicos. El aporte natural de Pb es debido fundamentalmente al proceso de biomovilización a partir de sus depósitos naturales, al propio proceso de erosión de las rocas y al vulcanismo.

Por otra parte, se pueden distinguir tres tipos de fuentes antropogénicas del Pb:

- i. **Estacionarias.** Debidas a la minería, la refinación y fundición de metales y a otros procesos industriales.
- ii. **Móviles.** Uso de las gasolinas con Pb en vehículos a motor.
- iii. **Químicas.** Por contaminación con fertilizantes, plaguicidas y desechos orgánicos.

También, se pueden clasificar las fuentes antropogénicas según su uso en:

- *Uso industrial.* Fábricas de baterías, de vidrio, de pinturas y barnices; imprentas; minería; vertidos y desechos.
- *Uso doméstico.* Pinturas; conservas (soldaduras de Pb); red doméstica de cañerías; revestimientos vitrificados (PbO); baterías de coches; combustión de gasolinas y humo de tabaco.
- *Uso agrícola.* Fungicidas, herbicidas y pesticidas (Pb₃(AsO₄)₂).

El Pb está muy presente en las cadenas tróficas, siendo probablemente el metal de mayor interés toxicológico. Su uso intensivo en la fabricación de contenedores de alimentos, como aditivo de vinos, pinturas y barnices, en la fabricación de vidrio, baterías o como antidetonante de gasolinas, entre otras muchas aplicaciones, junto a los peligros que supone su manufactura y fundición, así como su presencia en la red doméstica de agua potable, han convertido al Pb en un metal de alto riesgo tóxico (Doadrio-Villarejo, 2006).

II. Metabolismo

Se ha observado que el Pb se comporta de manera similar en aves, humanos y otros mamíferos, siendo las vías respiratoria y digestiva los principales medios de absorción (García-Fernández, 1994). Las especies inorgánicas son bastante absorbibles vía digestiva debido a su mayor solubilidad. Por vía respiratoria, la absorción debe ser en polvo y en forma soluble; por su parte, los compuestos orgánicos liposolubles se absorben por las tres vías, lo que les hace potencialmente más peligrosos (Doadrio-Villarejo, 2006).

La mayor parte del Pb se distribuye en el torrente sanguíneo unido a los eritrocitos, a través de la hemoglobina (Lumeij, 1985). El hígado y el riñón son los órganos donde se dan los niveles más altos durante las exposiciones agudas (García-Fernández *et al.*, 1995). Los niveles de Pb en sangre disminuyen progresivamente como consecuencia de su acumulación en el tejido óseo, que es donde se hallan las concentraciones más elevadas en las exposiciones crónicas (Stendell, 1980).

La absorción media por vía oral es de un 10%, mientras que la respiratoria puede llegar hasta el 50%, lo que la hace hasta cinco veces más eficaz. El Pb se almacena principalmente en huesos, sustituyendo al calcio en la hidroxiapatita, donde se almacena en forma no tóxica. El contenido de Pb en tejidos depende en gran medida de la dieta (Doadrio-Villarejo, 2006).

III. Intoxicación aguda y crónica

La intoxicación aguda es poco frecuente, se produce por ingestión de sales solubles o inhalación de vapores o polvos. Es un cuadro que evoluciona con lentitud, ya que el Pb no es cáustico. Produce vómitos con sialorrea de sabor metálico y dolores de vientre con estreñimiento, para después desarrollar el saturnismo.

La intoxicación crónica de Pb o saturnismo presenta un cuadro clínico caracterizado por alteraciones orales, con pigmentaciones en las encías; gastrointestinales (cólico saturnino); hematológicas con anemia microcítica, alteración en la biosíntesis de la hemoglobina; parálisis motora, que afecta principalmente a los miembros y que se recuperan muy lentamente; alteraciones renales, que son muy intensas, con lesiones tubulares por acumulación de Pb en el glomérulo, que actualmente son reversibles, la formación de la pseudogota saturnina con dolores en articulaciones, sólo en casos muy graves; perturbación del sistema nervioso, así como disminución de la fertilidad del hombre a través del daño al esperma. Además, el Pb es abortivo y provoca malformaciones fetales, ya que atraviesa la barrera placentaria (Doadrio-Villarejo, 2006).

b. Cadmio

El Cd es un metal que forma parte del grupo IIB de la tabla periódica, con un peso atómico de 112.41. Su forma iónica (Cd^{2+}) esta usualmente combinada con formas iónicas del oxígeno [óxidos (CdO_2), cloruros (CdCl_2) o sulfuros (CdSO_4), se ha estimado que 300,000 toneladas de Cd son liberadas al ambiente cada año de las cuales, la gran mayoría son derivadas de las actividades humanas (Ramírez, 2002).

I. Fuentes de contaminación del cadmio

Las vías antropogénicas de contaminación por Cd incluyen emisiones industriales, así como la aplicación de fertilizantes y aguas negras en sembradíos (Ramírez, 2002). El Cd suele considerarse como un subproducto de la obtención de zinc, Pb y cobre, siendo el polvo y humo emitidos en las fundiciones, los productos de incineración de combustibles fósiles, la aplicación de fertilizantes fosfatados artificiales y las aguas residuales, las principales fuentes de contaminación antropogénica. Sus derivados se utilizan en pigmentos y pinturas, baterías, como estabilizadores del cloruro de polivinilo (PVC), como recubrimiento de otros metales, en procesos de galvanoplastia, electroplateado, en aleaciones, en acumuladores, en soldaduras, en reactores nucleares, en joyería, entre otros.

A diferencia del Pb, el Cd se ha utilizado por un período relativamente corto y su uso extensivo ha aumentado durante el presente siglo (Ramírez, 2002).

II. Metabolismo

El Cd es absorbido principalmente por vía oral (ingestión de agua y alimentos), ya que los compuestos de Cd iónico son altamente solubles en agua.

En la sangre, el transporte de Cd se produce principalmente en el interior de linfocitos y eritrocitos (Szadkowski, 1972; Wilden, 1973; Bernard y Lauwerys, 1984). La mayor parte del Cd se almacena unido a metalotioneínas, lo que impide el desarrollo de sus efectos tóxicos, pero favorece la acumulación durante la vida del animal, siendo el riñón y el hígado los órganos más afectados (Goyer, 1996). La acumulación de Cd en riñón e hígado depende de la concentración ambiental, del tiempo de exposición y del estado óptimo de la función de excreción renal. En ambos casos se ha encontrado incremento con la edad. Después de una sobreexposición se alcanzan concentraciones elevadas en el hígado; pero con el tiempo el metal se localiza en el riñón. Se ha descrito también que las concentraciones renales de zinc se incrementan al aumentar las de Cd (Rentscheler *et al.*, 2014).

Diversos factores como la edad, sexo, forma ingerida, el estado nutricional, la época del año, la localización geográfica y la posición en la cadena trófica, afectan la toxicocinética del Cd (García-Fernández *et al.*, 1996, Buerger *et al.*, 2003).

Los mecanismos moleculares de la toxicidad de Cd no son completamente conocidos, pero resultados obtenidos en animales han mostrado que puede interactuar con transportadores de membrana involucrados en la captura de metales esenciales tales como hierro y zinc en el tracto gastrointestinal, logrando desplazar a estos metales e ingresando al citoplasma celular (esto ocurre debido a que el Cd es capaz de mimetizar a estos cationes divalentes en el sitio de unión de uno o más acarreadores de proteínas y/o canales que transportan estos

metales), ocasionando que el Cd^{2+} pueda formar un complejo coordinado covalente con ciertas biomoléculas que contienen grupos sulfhidrilo tales como el glutatión o cisteína.

La alteración en la homeostasis del calcio intracelular lleva a la célula a una liberación del calcio mitocondrial y del retículo endoplásmico, produciendo alteraciones en el metabolismo al interferir con vías de señalización dependientes de calcio, como señales de transducción entre las células, daño a las membranas, bloqueo de canales dependientes de voltaje, regulación génica y bloqueo de la liberación de neurotransmisores. Uno de los mecanismos de toxicidad más reportado por el Cd es el incremento de la lipoperoxidación (LPO) y la generación de radicales libres en cerebro y otros órganos. El Cd reemplaza al hierro o cobre en diferentes proteínas, por lo que estos iones al quedar libres ingresan al ciclo de Haber Weiss, catalizando la reacción de Fenton, causando un incremento en el estrés oxidativo. La actividad de los sistemas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), son disminuidas en presencia de Cd, por lo que existe incremento significativo en la LPO (Ramírez, 2002).

III. Intoxicación aguda y crónica

Galvao y Corey (1987), así como Ramírez (2002), explican que en exposiciones ocupacionales se ha encontrado que primero aparece disfunción glomerular y luego de un período de latencia, entre 10 y 20 años, se manifiesta la clásica microproteinuria. El síndrome renal clásico de exposición a Cd se caracteriza por:

- Proteinuria de peso molecular bajo, constituida principalmente por proteínas de tipo tubular, pero con predominio de proteínas específicas, como B2M, proteínas unidas al retinol, inmunoglobulinas de cadena corta o pos-w-proteínas, además de enzimas como lisozima, N-acetil-b-D-glucosaminidasa, ribonucleasa y pGST.

- Aumento en la eliminación de la enzima lisosoma-b-galactosidasa, lo que sugiere daño a nivel de algunas células epiteliales de vías urinarias.

Otros efectos producidos por el Cd son: Daño al sistema nervioso central, daño al sistema inmune, posible daño en el ADN, así como fallos en la reproducción y posibilidad incluso de infertilidad.

En humanos, los efectos por exposición ambiental ocurren principalmente en sujetos con metabolismo de hueso osteoporótico, como mujeres multíparas o, en ambos sexos, en personas sedentarias mayores de 50 años y también en algunos casos de trastornos del metabolismo del calcio o ingesta baja de proteínas y de vitamina D.

Entre las manifestaciones generales se tienen anosmia, pérdida de peso, decaimiento general, coloración amarilla de los dientes e incremento de frecuencia de caries dental, además de síntomas gastrointestinales variados.

- Anemia moderada, por alteración en el transporte del Fe dentro de las células eritropoyéticas, similar a la producida por el Pb.

En exposición ambiental prolongada hay daño en la reabsorción tubular, lo que trae alteración del metabolismo del calcio con calciuria y formación de cálculos. Incremento de los niveles de urea, creatinina y ácido úrico en suero, por

falla en el aclaramiento renal. En la exposición aguda se describe un síndrome de irritación de vías respiratorias y, en exposición crónica, síndromes obstructivos y restrictivos e inclusive fibrosis pulmonar.

- Leucocitosis y linfocitosis.
- Daño hepático moderado y, por tanto, disminución de la capacidad metabólica del hígado en general y en particular para los xenobióticos.
- Atrofia testicular primaria en exposiciones a altos niveles de Cd.

c. Indicadores Biológicos de Calidad Ambiental

I. Bioindicadores

Un bioindicador es un organismo o un conjunto de organismos, que tienen la propiedad de responder a la variación de un determinado factor abiótico o biótico del ecosistema, de tal manera que esta respuesta quede reflejada en el cambio de valor en una o más variables de cualquier nivel de dicho organismo; estas variables o características, o sus cambios, pueden llamarse también bioindicadores o variables bioindicadoras (Schlenk, 1999).

II. Biomarcadores

Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles (bioquímicos, fisiológicos o morfológicos) que se asocian con la exposición a un tóxico; éstos se utilizan para detectar la presencia de un xenobiótico, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de

una población, así como para fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Schlenk, 1999).

III. Importancia de los Biomarcadores

Los efectos de distintos contaminantes pueden persistir durante algún tiempo. En estudios toxicológicos, un análisis físico-químico puntual nos muestra el estado de un ecosistema, sin embargo, debe realizarse un seguimiento continuo para obtener una visión más amplia de la calidad ambiental; en estos casos, el análisis bioquímico nos permite realizar un seguimiento puntual en distintos momentos en la vida de un organismo para darnos una idea de lo que ha sucedido a lo largo de cierto tiempo, el impacto de distintos procesos de contaminación son detectados de manera más eficaz por un seguimiento biológico (Rueda *et al.*, 2002).

La alteración en los biomarcadores nos indica la exposición de los organismos bioindicadores a contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos para los ecosistemas. Los biomarcadores funcionan a nivel molecular, celular, histológico, organismo, población, de comunidad o ecosistema. Los moleculares son alertas tempranas, pues se alteran antes que los ecosistemas sufran daños irreversibles. Aquellos a nivel de población, comunidad o ecosistema tienen mayor relevancia toxicológica, pero responden de forma más lenta (Peakall, 1994; Lopez-Barea, 1995).

Para realizar un análisis completo es necesario emplear una serie de biomarcadores cuyos resultados se complementen para explicar una respuesta

integrada a episodios de estrés ambiental (Livingstone, 1993). Por su significado, los biomarcadores se clasifican en tres tipos (Livingstone, 1993; Walker *et al.*, 1997):

- i) De exposición, que indican la presencia de contaminantes, metabolitos derivados de su biotransformación o productos de su reacción con biomoléculas.
- ii) De efecto que, muestran cambios bioquímicos tras la exposición.
- iii) De susceptibilidad, que predicen la posibilidad de una alteración grave a nivel de población, comunidad o ecosistema.

La estacionalidad de los procesos fisiológicos (reproducción, desarrollo, etc.) y factores ambientales (nutrientes, temperatura, etc.) condiciona las respuestas de los distintos biomarcadores (Sheehan & Power, 1999). Para facilitar la interpretación de los datos, los programas de biomonitorio deben realizarse en distintas épocas del año, haciendo uso de organismos control o referencia.

IV. Proteínas totales en suero

Las proteínas son biomoléculas formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio, cobre, entre otros elementos. Son polímeros formados a partir de 50 o más enlaces peptídicos entre aminoácidos (Lehninger & Cox, 2006).

El estudio de las proteínas se utiliza para el seguimiento de las enfermedades, se trata una medición aproximada de todas las proteínas

presentes en la parte líquida de la sangre. Este examen a menudo se hace para diagnosticar problemas nutricionales, enfermedades renales o hepáticas. Si los niveles de proteínas son anormales, es necesario realizar exámenes adicionales con el fin de identificar el problema específico. Generalmente la comprobación de las proteínas se realiza junto con otras pruebas como los niveles de albúmina, así como de enzimas hepáticas (Díaz-Portillo *et al.*, 1997). En humanos, la hipoproteïnemia es asociada a un defecto en la realización de la síntesis proteica, catabolismo proteico excesivo o pérdidas excesivas (hemorragias), el descenso en los niveles de proteínas totales es propio del fallo hepático terminal y de la enfermedad renal. El rango normal de proteínas totales en una persona saludable es de 6.0 a 8.3 gm/dl (gramos por decilitro), dicho valor puede variar ligeramente entre individuos (Díaz-Portillo *et al.*, 1997).

La albúmina es la proteína más abundante del plasma, representa el 50% de las mismas. Transporta numerosas sustancias (aminoácidos, ácidos grasos, enzimas, hormonas tiroideas y productos tóxicos). También es responsable de mantener la presión osmótica del plasma. En humanos, la disminución de dicha proteína suele relacionarse a enfermedades renales, hepáticas, infecciones crónicas, hemorragias, inanición, así como desnutrición (Díaz-Portillo *et al.*, 1997).

V. Colinesterasas

Desde el punto de vista bioquímico, las esterasas son enzimas con una baja especificidad de sustrato y comprenden a cientos de enzimas diferentes que se

distribuyen en subgrupos. El primero de ellos corresponde a las hidrolasas de los ésteres carboxílicos, que, entre otras enzimas, incluye a la carboxilesterasa, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2008).

En la familia de las colinesterasas (ChEs) se pueden distinguir dos grupos, los cuales a su vez pueden presentar variantes. Uno de ellos está representado por la AChE, también denominada como colinesterasa verdadera, genuina, tipo I o eritrocitaria. Esta enzima se encuentra principalmente en neuronas colinérgicas periféricas y centrales; además, también se ha detectado en otros territorios orgánicos como eritrocitos, hígado y riñón; esta esterasa es un punto clave en la producción de reacciones adversas, cuando se ven afectadas en el organismo.

El otro grupo corresponde a la BuChE, también conocida con los nombres de pseudocolinesterasa, colinesterasa sérica, plasmática, falsa o tipo II. La BChE aparece en cantidades pequeñas en células gliales o satélites, pero prácticamente no se detecta en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico. Se expresa principalmente en plasma e hígado; además también se encuentra en músculo liso, intestino, páncreas, corazón y sustancia blanca del encéfalo. Esta enzima es una herramienta clave en la detección de exposición a contaminantes, ya que la variación en su actividad está íntimamente ligado a éstos (Arvelález & Eblen-Zajjur, 2013; Picco, 2009).

VI. Funciones de las colinesterasas

Aunque la función biológica de la AChE en el mecanismo de transmisión nerviosa ha estado perfectamente establecida desde su descubrimiento, se ha demostrado que también se encuentra en tejidos no nerviosos y en neuronas no colinérgicas, por lo que se deducen funciones adicionales, incluso independientes de sus actividades catalíticas, así como efectos no colinérgicos de sus inhibidores; también se la ha relacionado a nivel eritrocitario con el transporte iónico y la regulación de la eritropoyesis (Picco, 2009).

Por otra parte, durante mucho tiempo las funciones de BuChE fueron un interrogante, pero actualmente se sugiere que además de participar en el metabolismo de varios ésteres, como procaína, bupivacaína, suxametonio, ácido acetilsalicílico, o sustancias tóxicas, participa en el metabolismo de lipoproteínas, en el mantenimiento de la mielina y en mecanismos de adhesión tisular y neurogénesis. En la epidermis y las glándulas de la piel, esta enzima parece participar en la síntesis de los productos de secreción y en el pulmón parece intervenir en el sistema surfactante (Picco, 2009).

Las ChEs suelen ser empleadas como eficiente biomarcadores de contaminación. Entre las ChEs utilizadas destacan la AChE y BuChE. La inhibición de la actividad de ChEs ha sido asociada con la exposición a insecticidas organofosforados, carbamatos y otros xenobióticos (Habig & Di Giulio, 1991). Se han realizado estudios en *Lepisosteus oculatus* (Catán pinto) como bioindicadores de contaminantes múltiples en la región baja del Río Mississippi en los que se observó una disminución significativa de la actividad

enzimática de AChE y BuChE en organismos de zonas contaminadas con hidrocarburos clorinados tales como hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno y metales pesados (Huang *et al.*, 1997).

VII. Transaminasas

El hígado es el órgano más grande y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica desarrollada en el organismo. Entre sus innumerables funciones se destaca la detoxificación de sustancias endógenas, bacterias y sustancias exógenas. Existen pruebas que informan sobre posible lesión hepatocelular, entre dichas pruebas destacan las transaminasas o aminotransferasas (Hyder *et al.*, 2013). Éstas representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutárico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero las transaminasas con mayor valor clínico para evaluar daño crónico en hígado son 1) aspartato-aminotransferasa o transaminasa glutámicooxalacética (AST o GOT), localizada en citosol, mitocondria de hepatocitos, corazón, riñones, eritrocitos y leucocitos y 2) alaninoaminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT o GPT), que se encuentra exclusivamente en el citosol del hepatocito. La elevación sérica de transaminasas se correlaciona con el vertido a la sangre del contenido enzimático de los hepatocitos afectados, por lo tanto, se considera al daño hepático como la causa del aumento de la actividad de la GOT, así como GPT (Hyder *et al.*, 2013). Fosfatasa alcalina (FA) y Gama glutamil

transpeptidasa (GGT) son transaminasas que, si bien no son específicas del hígado, pueden ayudar a conocer el estado de salud de un organismo, siendo modificada su actividad en algunas patologías de hígado (Hyder *et al.*, 2013).

d. *Crocodylus moreletii*

I. Características generales

El cocodrilo de pantano (*C.moreletii*) presenta un hocico relativamente corto y redondeado en la punta, tiene 13 dientes maxilares y 15 mandibulares. Presentan una hilera de 4 a 6 escamas post-occipitales; dos pares de escamas nucales en tándem (la primera hilera con cuatro y la segunda con dos). Las escamas del tronco están separadas de las nucales, las primeras poseen osteodermos más o menos regulares, arreglados en 16 o 17 hileras transversales y de 4 a 6 longitudinales; las hileras laterales de las extremidades son lisas y aplanadas (INE, 1999).

Poseen un fleco escamoso distintivo sobre los márgenes de ambos pares de extremidades. La superficie dorsal de los adultos es generalmente amarillo-verdosa y puede llegar a ser casi negra. En los juveniles se presentan pequeños flecos amarillentos formando bandas cruzadas y la superficie ventral es blanca amarillenta sin marcas. El tamaño máximo aproximado de esta especie es de 3.50 m, con promedio de 2 a 2.50 m. Al eclosionar, las crías miden de 22 a 29 cm de longitud (INE, 1999).

II. Distribución

El Instituto Nacional de Ecología reportó que *C. moreletii* se distribuye en Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo, Belice y norte de Guatemala (INE, 1999). Puede encontrarse en arroyos, ciénagas, lagunas dentro de bosques y selvas y en ríos de corriente lenta; no existen reportes de su presencia en aguas salobres.

III. Alimentación

C. moreletii es una especie eminentemente cazadora; los ejemplares recién nacidos capturan insectos nadadores, terrestres y voladores, así como moluscos. Mientras que los ejemplares mayores capturan pequeños peces y crustáceos, llegando a capturar ranas, otros anfibios y aves; conforme aumenta su tamaño, incrementa el tamaño de sus presas, pueden ingerir desde serpientes y tortugas hasta mamíferos grandes (Álvarez del Toro y Sigler, 2001).

e. Estudios sobre contaminantes en cocodrilos

Los cocodrilos son indicadores apropiados de contaminación debido a sus procesos biológicos, ya que suelen exhibir una correlación entre las concentraciones de distintos xenobióticos en sus tejidos con las concentraciones de contaminantes en el ambiente, típicamente agua, sedimento o ambos (Manolis *et al.*, 2002).

En comparación con las aves y los mamíferos, los reptiles tienen rangos metabólicos bajos, menores demandas energéticas y menos exposición

alimenticia, además se piensa que su sistema de detoxificación enzimática está menos desarrollado que en los endotermos, lo que podría minimizar los procesos de detoxificación que eliminan los metales pesados del cuerpo. Como consecuencia, cuando los reptiles utilizan las reservas de energía almacenada como lípidos en el hígado, los contaminantes que previamente estaban almacenados se movilizan, pudiendo causar efectos tóxicos, modificando la acumulación de contaminantes en otras partes (Xu *et al.*, 2006). Debido a la diversidad de estrategias de alimentación habrá diferencias en la asimilación de contaminantes dependiendo del tipo de comida que se ingiera (Schneider *et al.* 2013).

Si bien las concentraciones en estos animales pueden variar de un sitio a otro, debido a que muchos contaminantes son persistentes en tejidos, pueden bioacumularse y/o biomagnificarse a lo largo del tiempo hasta alcanzar niveles tóxicos o letales. El tener un ciclo de vida largo (aproximadamente 60 años en vida silvestre), da a los cocodrilos la posibilidad de exponerse a largo plazo a contaminantes (Schardt, 2008). La edad, el tamaño, así como los patrones no migratorios son factores que afectan la respuesta del organismo, asimismo, al vivir en áreas contaminadas, podrían acumular concentraciones sustanciales en diversos tejidos, reflejando los cambios en un área por períodos largos de tiempo (Schneider *et al.* 2013).

Conforme crece el cocodrilo, puede ingerir presas más grandes, como consecuencia, el consumo de diferentes presas lo expone a diferentes concentraciones de distintos contaminantes. Además, la acumulación se

considera diferente entre machos y hembras debido a los efectos reproductivos y al comportamiento de cortejo, por ejemplo, las hembras tienen la posibilidad de excretar algunos contaminantes en sus huevos (Hopkins *et al.*, 2006).

Los cocodrilos más grandes pueden acumular mayores cargas tóxicas debido a su metabolismo, lo cual ralentiza la eliminación de contaminantes y digestión de presas en comparación con cocodrilos más pequeños (Platt *et al.*, 2013). Este cambio en la dieta crea una diferencia en las concentraciones de contaminantes absorbidos por los cocodrilos en relación con su tamaño (Platt *et al.*, 2013).

Es sabido que los metales tóxicos en reptiles suelen ser excretados a través de la orina, heces, piel y huevos. En *Alligator mississippiensis* se ha encontrado que suelen tener concentraciones altas de estos compuestos en el hígado y en los riñones, y bajas en la glandula biliar. Las muestras de hígado y músculo se consideran las más eficientes para determinar si existe una acumulación en las poblaciones expuestas a contaminantes, sin embargo, el análisis de sangre es un procedimiento de muestreo no letal que no afecta la salud del animal (Swanepoel *et atl.*, 2000).

Los estudios sobre contaminantes son escasos para la gran mayoría de las especies de cocodrilos existentes. Entre estos estudios, los más importantes se han llevado a cabo en *Alligator mississippiensis* y han estado principalmente enfocados a contaminantes con efectos endócrinos (Guillette *et al.*, 1994, 1995a, 1996, 1999; Vonier *et al.*, 1996; Crain *et al.*, 1997; Semenza *et al.*, 1997), a pesar que dicha información es valiosa, aún faltan investigaciones sobre cocodrilianos

en materia de contaminación, principalmente en lo que respecta a metales pesados.

Manolis *et al.*, realizan en 2002 un compendio en el que presentan trabajos que confirman la importancia de los cocodrilos y otros reptiles como organismos bioindicadores de contaminación por metales pesados, así como pesticidas organoclorados. Ya que además de estos, existen otros compuestos que pueden ser letales a dosis pequeñas en la herpetofauna, lo que enfatiza la importancia de considerar estos organismos en estudios de impacto ambiental.

Se ha observado que los metales pesados tienen una ocurrencia cada vez mayor en vida silvestre (Heinz *et al.*, 1991, Rainwater *et al.*, 2007); dicha exposición podría presentar una amenaza para las poblaciones de cocodrilos.

Si bien en muchas ocasiones se han encontrado a plaguicidas y bifenilos policlorinados (PCBs) como agentes causales de anomalías (Cobb *et al.*, 1997; Guillette, 1995; Guillette *et al.*, 1999; Lind *et al.*, 2004), el declive de poblaciones, no se ha podido asociar en su totalidad con el fallo reproductivo (Crain *et al.*, 1998; Guillette *et al.*, 1995; Guillette & Guillette, 1996) y por tanto, pueden no ser los únicos agentes causales de éstos.

En los pocos estudios realizados, se ha observado que las poblaciones expuestas a metales pesados muestran una baja en la reproducción, siendo el Pb en dichos casos, el metal con mayores niveles en los tejidos de los organismos, llegando hasta 10 veces más de lo esperado incluso en los huevos y por tanto, el probable agente causal de muerte temprana de embriones (Lance *et al.*, 2006). Una de las posibles causas de estos niveles tan altos es la ingesta de carne

contaminada con Pb (Lance *et al.*, 2006), lo que respalda la idea de la biomagnificación en la cadena alimenticia (Delany *et al.*, 1988; Guillette, 1995).

El Cd, a pesar de estar presente en todos los casos de contaminantes analizados tanto en adultos como en huevos de cocodrilianos (Burley *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 2006), aún se desconocen los efectos que puede tener sobre la reproducción. Sin embargo, Fernández *et al.*, en el 2013, mencionan el posible papel crucial del Cd en el metabolismo del calcio que resulta en anomalías del huevo, tales como la calcificación irregular con nódulos calcínicos o arrugas superficiales al extremo de los huevos, así como la calcificación irregular con brechas estructurales y una cáscara adelgazada.

En *Alligator sinensis* se ha observado la capacidad de secuestrar ciertos contaminantes en los huevos, principalmente metales pesados, estando altamente correlacionadas las concentraciones entre hembras y huevos, mientras que en machos los niveles son bajos. Se cree que de esta forma existe una reducción en la carga de sustancias tóxicas en el cuerpo (Xu *et al.*, 2006), lo que influirá en gran medida sobre los contaminantes encontrados en los huevos, en cuyos casos serán mayores las concentraciones del huevo, que en cáscara o en la membrana corioalantóica (primera barrera de protección del huevo contra contaminantes ambientales).

3. JUSTIFICACIÓN

El cocodrilo de pantano es una especie de suma importancia ecológica y económica tanto en el Estado de Tabasco como en el país. Por tanto, es de suma importancia realizar investigaciones continuas para conocer el estado en el que se encuentran las poblaciones de cocodrilos, debido al impacto que pueden llegar a tener la presencia de los asentamientos humanos, la destrucción del hábitat, la contaminación originada por actividades antropogénicas, entre otros.

A pesar de que otros cocodrilianos han sido estudiados, debe considerarse que las observaciones realizadas no pueden generalizarse para todas las especies, debido a las diferencias en las adaptaciones según el tipo de ambiente. Los trabajos sobre la presencia de Pb o Cd en *C. moreletii* son escasos, así como el impacto en la salud de los organismos, razón por la cual este estudio pretende evaluar las concentraciones en plasma sanguíneo de ambos elementos, así como su relación en la modificación de parámetros enzimáticos en hembras y machos reproductores, juveniles y crías provenientes de la Laguna de las Ilusiones, generando un primer acercamiento a la información necesaria para conocer el estado de salud general en el que se encuentran los organismos de éste cuerpo de agua. Es de suma importancia sentar las bases de futuras investigaciones que puedan relacionar factores ambientales y antropogénicos, cuyo efecto podría intervenir en el éxito reproductivo de la especie. Además de proporcionar una visión precisa sobre la situación actual, así como del estado de conservación de esta especie.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La población del Cocodrilo de Pantano en una laguna urbana se encuentra expuesta a contaminantes que modifican la actividad de enzimas relacionadas a funciones hepáticas de los individuos?

5. HIPÓTESIS

Si la población de Cocodrilo de Pantano de la Laguna de las Ilusiones está expuesta de manera constante a contaminantes persistentes, como el Pb y el Cd, entonces, los niveles de dichos metales en el plasma se relacionarán con diferencias en las actividades de distintas enzimas y moléculas indicadoras de daño en hepático.

6. OBJETIVOS

a. General

Determinar los niveles de Pb y Cd en el plasma sanguíneo del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) y evaluar su relación con marcadores enzimáticos de daño en tejidos.

b. Específicos

- I. Establecer el intervalo de concentraciones de Pb y Cd en el plasma sanguíneo de hembras y machos reproductores y crías de *Crocodylus moreletii* de la Laguna de las Ilusiones y de una UMA.
- II. Comparar concentraciones de metales pesados entre adultos y crías de ambos sitios.

- III. Comparar concentraciones de metales pesados en plasma sanguíneo con metales en muestras de agua en la Laguna de las Ilusiones.
- IV. Establecer la posible relación entre las concentraciones de Pb o Cd con cambios en parámetros bioquímicos (actividades enzimáticas indicadoras de daño tisular, contenido de proteínas totales, albúmina).

7. ÁREAS DE ESTUDIO

a. Laguna de las Ilusiones

La Laguna de las Ilusiones es un cuerpo de agua urbano localizado en el municipio de Centro, en la cabecera municipal de Villahermosa, Tabasco. Fue decretada el 8 de febrero de 1995 como Reserva Ecológica. La superficie comprendida en esta Reserva está destinada a la protección, conservación y restauración de los ecosistemas naturales del Estado de Tabasco, con la finalidad de brindar espacios para la recreación, educación, aprovechamiento e investigación ecológica (Gobierno del Estado de Tabasco, 2000).

Se encuentra localizada entre las coordenadas 17° 59' 39.9" de latitud Norte, 92° 56' 14.7" de longitud Oeste y cuenta con una superficie de 259,773 ha. Su clima es cálido húmedo con lluvias en verano y su temperatura anual promedio es de 24.64°C. La precipitación anual promedio es de 5.26 mm y la evaporización es cercana a 4.38 mm anuales (INEGI, 2000).

La Laguna íntegra fue modificada por dragados y contracciones de contenedores, bordos y una compuerta, haciendo que algunas zonas tengan características artificiales. En la periferia de este cuerpo de agua urbano se

encuentra el Parque Tomás Garrido Canabal, el Parque Museo La Venta, la zona de la cultura Universitaria, 11 colonias y cinco fraccionamientos de Villahermosa, Tabasco (Méndez, 2000).

b. Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas (CICEA)

El CICEA es una unidad de manejo con una extensión de 2 hectáreas, la cual está destinada al mantenimiento y recuperación de Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*). Se encuentra entre las coordenadas 17°59'23.90" Norte y 92°58'29.97" Oeste, en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en el Km. 0.5, carretera Villahermosa-Cárdenas entronque a Bosques de Saloya, en Villahermosa, Tabasco.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Trabajo de campo

I. Obtención de muestras sanguíneas

El presente estudio se llevó a cabo a lo largo de un año, en dos temporadas clave en la reproducción (época de anidación y época de reproducción) en las cuales se capturaron hembras y machos de *C. moreletii* juveniles (4), reproductores (22) y crías (10) de dos poblaciones, una silvestre y una en cautiverio, empleando la segunda como grupo de referencia (CICEA). Se obtuvieron muestras de cocodrilos de diferentes tallas y pesos para contar con una variedad en los datos. Para ambos grupos, se registraron datos de

sexo, talla (longitud total), peso, así como la ubicación de procedencia (zona de captura, para el caso del grupo silvestre).

Se obtuvieron muestras sanguíneas por el método de punción en seno occipital (2 ml de sangre por individuo, excepto en crías donde se tomaron menos de 1 ml) con jeringas plásticas (previamente lavadas con EDTA) con aguja de calibre 21 para adultos y juveniles, así como calibre 25 para crías, desinfectando la zona de punción antes y después de la extracción.

Las muestras se mantuvieron en tubos al vacío (Vacutainers, E.U.A.) heparinizados con capacidad de 4 ml en una hielera convencional (4-8°C) para su conservación y traslado al Departamento de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

II. Localización de ejemplares

Durante la temporada de reproducción y anidación del cocodrilo de pantano, se realizaron búsquedas nocturnas en tres distintas ocasiones en la Laguna de las Ilusiones (Julio y Agosto del 2015, Marzo del 2016). Cada visita se inició con un recorrido por agua utilizando una lancha de aluminio de 4 m de largo con motor fuera de borda de 8 Hp, a una velocidad no mayor a 15km/h y a una distancia de entre 5 y 10 m de la orilla. Cada uno de los recorridos abarcó un sector de la laguna haciendo énfasis en aquellas zonas en donde suelen encontrarse más individuos, localizándolos con ayuda de una linterna.

III. Toma de muestras del medio

La toma de muestras de agua se llevó a cabo en el mes de Agosto, en las zonas donde se observó la presencia de cocodrilos. Estas se tomaron haciendo uso de recipientes de polietileno de alta densidad (previamente lavados con ácido nítrico diluido), enjuagándolos con agua de la laguna a muestrear. Posteriormente se trasladaron las muestras al laboratorio en nevera a una temperatura de 4°C. En el laboratorio, las muestras se filtraron a través de una membrana de acetato celulosa de 0.45 µm para eliminar las arcillas finas. Tras la filtración se acidificaron a pH 2 con ácido nítrico con el objeto de evitar intercambio de iones y precipitación de hidróxidos, conservándose en un congelador a -20°C hasta su análisis.

En suelos, todas las herramientas empleadas fueron de plástico resistente. En el punto de muestreo seleccionado, se retiró la vegetación para dejar a la vista la capa superficial de suelo, hincando una pala de para sacar una tajada del suelo. La muestra se empacó en una bolsa plástica nueva (previamente enjuagada con EDTA), se cerró e identificó adecuadamente (repitiendo el procedimiento en los demás sitios de muestreo seleccionados). Se colocaron las bolsas en una nevera cuidando de no romperlas para evitar pérdidas de muestra o contaminación de las mismas.

Ya en el laboratorio, se secaron las muestras para tamizarlas a través de un filtro de 2mm; posteriormente se molieron en un mortero de ágata alrededor de 5g y se usó un tamiz de 0.5 mm de grosor. La muestra seca y molida fue ocupada para medir el porcentaje de materia orgánica presente.

b. Trabajo de laboratorio

Cada muestra sanguínea, así como de agua fue sometida a las técnicas estandarizadas por los Departamentos de Ciencias de la Salud e Hidrobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

I. Análisis de plasma y agua

i. Determinación del contenido de plomo y cadmio por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS)

La determinación de metales pesados en sangre por medio de cámara de grafito/espectrofotometría de absorción atómica, es un método recomendado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), el cual ha sido evaluado según determinados criterios de validación y que ha sido suficientemente probado mediante ensayos de colaboración entre distintos laboratorios del INSHT.

El espectrómetro de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS) permite trabajar con muestras de volumen muy reducido (inferior a 100 μL) o directamente sobre muestras orgánicas líquidas. Todo el material de vidrio utilizado en el análisis después de su lavado con un detergente, se mantuvo sumergido varios minutos en ácido nítrico al 50% (V/V) y fue cuidadosamente enjuagado con agua destilada.

- **Preparación de la muestra.** La sangre se homogeneizó perfectamente en un agitador, una vez alcanzada la temperatura ambiente se

pipetearon 600 μl de modificador de matriz (que es un componente con la capacidad de evitar la evaporación prematura de los metales en la muestra en un horno) en un cubilete de fondo cónico. Se añadieron 50 μl de sangre con pipeta automática y con el mismo cono de plástico utilizado se removió el contenido hasta conseguir una completa homogeneización. La muestra así preparada se introdujo directamente en el horno de grafito.

- **Preparación de patrones y curva de calibración. Disoluciones de trabajo** A partir de la disolución patrón de Pb de 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y con las diluciones pertinentes, se prepararon las disoluciones de trabajo de 0.2; 0.4; y 0.8 μl de Pb por ml de agua. Se pipetearon 600 μl de modificador de matriz en los cubiletes de fondo cónico en los cuales se prepararon los patrones. Se añadieron 50 μl de cada una de las disoluciones de trabajo preparadas a los cubiletes que contenían modificador de matriz y se agitó el contenido. **Blanco de reactivos** corresponde a la adición de 50 μl de agua destilada a 600 μl de modificador de matriz. Su lectura se restó de la obtenida para patrones y muestras antes de construir la curva de calibración.

- **Determinación.** Se introdujeron 10 μl de patrones y muestras preparadas en el horno de grafito con una pipeta automática. El análisis se efectuó con un programa de temperaturas y tiempos. Se midió el área del pico registrado, durante la etapa de atomización a los nm indicados para cada compuesto. Las determinaciones de muestras y patrones se realizaron por duplicado.

- **Curva de calibración.** De las lecturas, en área de pico, obtenidas para los patrones preparados que correspondieron a concentraciones de 0.2, 0.4, y 0,8 µl Pb/ml de sangre, se resta la lectura obtenida para el blanco de reactivos. Se representaron los valores corregidos de área de pico frente a sus correspondientes concentraciones, obteniéndose así la curva área de pico-concentración.

ii. Estimación de las actividades: gama glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), alanina aminotransferasa (ALT/GPT) y aspartato aminotransferasa (AST/GOT) por tiras de reflotron

El principio de medición del Reflotron® se basa en la fotometría de reflexión: "Medida del cambio de color producido en el reactivo seco". La pieza clave del sistema de medición óptico es la esfera de Ulbricht.

El desarrollo de la prueba estuvo controlado mediante un microprocesador gobernado por el código magnético de la tira; este microprocesador realizó el cálculo de los resultados, autocalibración, entre otros. Los resultados se visualizaron en un display luminoso, fueron impresos y guardados.

iii. Cuantificación de la albúmina sérica por el método de cresolsulfonftaleína (verde de bromocresol)

Para cuantificar la concentración de albúmina, se sometieron las muestras de suero a reaccionar específicamente con la forma aniónica del

3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína, en presencia de un exceso de colorante y en solución amortiguadora a pH 3.9. El aumento de absorbancia a 620 nm de longitud de onda, fue proporcional a la cantidad de albúmina presente en las muestras. Para establecer la concentración de albúmina se realizó una curva de calibración a partir de un estándar puro de albúmina con 3% de glicación, se preparó una solución patrón de 20 mg/ml y de esta se tomaron diferentes volúmenes. Las lecturas fueron tomadas a 530 nm.

iv. Cuantificación del contenido total de proteínas por método de Bradford

Para la determinación del contenido de proteínas en suero se empleó el método de Bradford (1976), éste es un ensayo de unión proteína-colorante basado en el cambio de color en respuesta a varias concentraciones de proteína. La determinación del contenido de proteínas se relaciona a la unión de Azul Brillante de Coomasie G-250 con los residuos de Arg y, en menor grado, con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de la proteína. La unión del Azul Brillante de Coomasie G-250 a las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. El colorante existe en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une el colorante a la proteína.

Para valorar proteínas se usó un micrométodo, para lo que se elaboraron dos curvas de calibración usando albúmina de suero bovino como proteína estándar. Se prepararon dos soluciones; una con 5 µg/10 mL y otra con 28.2

$\mu\text{g}/10\text{ mL}$, se repartieron los volúmenes de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL y se completaron a 10 μL con agua bidestilada; los volúmenes de muestra (de dilución 1:10) fueron de 10 μL . Cada muestra se preparó, por tetraplicado, agregando 200 μL del reactivo de Bradford a cada una de las muestras y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos.

v. Identificación de proteínas mediante la reacción el Biuret

La reacción debe su nombre a una molécula formada a partir de dos de urea ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), que es la más sencilla que da positiva esta reacción (la presencia de proteínas en una mezcla se puede determinar mediante la reacción del Biuret). El reactivo de Biuret contiene CuSO_4 en solución acuosa alcalina (de NaOH o KOH). La reacción se basa en la formación de un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 540 nm. Esta reacción da positivo en todos los compuestos que tengan dos o más enlaces peptídicos consecutivos en sus moléculas.

vi. Estimación de la actividad colinesterásica

Las actividades de AChE y BuChE se valoraron mediante el método espectrofotométrico de Ellman y colaboradores (1961), utilizando los tioanálogos de los sustratos naturales; acetiltiocolina (ATCh) y butiriltiocolina (BuTCh), respectivamente. En este método se aprovechó la capacidad del cromógeno ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para oxidar a los grupos tioles libres. Aunque la especificidad de las ChEs hacia su sustrato específico

es elevada, es conveniente usar inhibidores selectivos, por ello cuando se realizó la estimación de la actividad se incorporó a la mezcla de reacción Tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA), inhibidor relativamente selectivo para la BuChE. Cuando se determine la actividad BuChE habrá en la mezcla de reacción Dibromuro de 1,5-bis-alildimetilamoniofenil-pentan-3-ona (BW284C51), siendo un inhibidor selectivo para la AChE. Las ChEs hidrolizan los ésteres de la acetil- o butiriltiocolina, liberando acetato o butirato, respectivamente, y la propia tiocolina, que reacciona rápidamente con el DTNB, produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, que presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412 nm de longitud de onda, lo que facilita su medida en espectrofotómetro (Gómez-Olivares, 2000).

c. Análisis estadístico

En el análisis estadístico, se empleó el paquete NCSS para corroborar que los grupos de datos presenten una distribución normal, se aplicó una prueba de ANOVA ($p < 0.05$), para analizar si existían diferencias significativas entre concentraciones en sangre (CICEA y silvestre), diferencia significativa actividad enzimática entre distintos grupos de edad, sexo y sitios, así como diferencia significativa en concentraciones en sangre (machos y hembras). Se empleó ANCOVA para determinar si existía una correlación significativa entre actividad enzimática y niveles de contaminantes, así como correlación entre niveles de contaminantes en sangre y contaminantes en agua. Igualmente se aplicó el

ANCOVA para determinar si existía relación entre las concentraciones de los contaminantes con las edades de los organismos analizados, así como Correlación múltiple para evaluar las interacciones de los parámetros propios de los organismos con los cambios observados en enzimas marcadoras de daño en hígado.

9. RESULTADOS

a. Muestreo de organismos

La distribución de las crías en la Laguna se observó relativamente homogénea, encontrándose al menos un individuo en la orilla de cada sitio muestreado. En tanto, que los juveniles se encontraron principalmente en zonas alejadas de casas. En el caso de organismos reproductores, hubo una gran cantidad de avistamientos en la zona del “*Vaso Cencal*” y cerca del Parque Tomás Garrido. Mientras, que en los brazos de la Laguna fueron menos comunes durante los meses de Abril y Junio. En cambio, durante la temporada de anidación y próxima a las eclosiones en Agosto se observó una distribución más amplia de hembras en los distintos brazos de la Laguna.

Del grupo en cautiverio (CICEA), se capturaron 5 Hembras y 4 Machos. Y de la Laguna de las Ilusiones, 5 Hembras y 6 Machos todos reproductores (longitud mayor a 1.50 m); además, se capturaron 4 juveniles (un macho y una hembra tanto de Laguna como del CICEA) y 10 crías (5 por cada sitio).

Cabe resaltar que durante las actividades de captura, se encontró a una hembra con un cable atado frente a las patas posteriores, con el cual parecía ya

haber pasado bastante tiempo. Dicho hallazgo es importante, ya que revela no sólo el riesgo por contaminantes. Sino también, el riesgo por personas que intenten atraparlos dentro de la laguna. Al tener dichos objetos un diámetro determinado, al crecer el animal podría provocar daños quizá irreversibles en aparato reproductor al estar tan cercano a la cloaca, además, si esta fuese una práctica común, puede llevar a la mortalidad de un gran número de individuos cuando falle la captura y al escapar dicho individuo sin poder retirarse el objeto, tenga impedimentos para la alimentación, desplazamiento, flotación o se convierta en una presa más fácil para otros organismos.

b. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo y agua

De acuerdo con el método de Walkley-Black (1934), el contenido de materia orgánica (MO) en suelos se clasifica de la siguiente manera:

| Nivel | Muy bajo | Bajo | Normal | Alto | Muy alto |
|-------|----------|---------|-----------|-----------|----------|
| %MO | < 0.9 | 1 - 1.9 | 2.0 – 2.5 | 2.6 – 3.5 | >3.6 |

Tomando en cuenta dichos valores, se considera entonces que la mayoría de los sitios muestreados presentan un nivel muy alto de materia orgánica en descomposición, otros pocos presentan un nivel bajo. En zonas que parecían estar altamente urbanizadas se encontraron niveles muy altos de materia orgánica, mientras que en otras áreas relativamente libres de grandes rasgos de urbanización, se encontraron niveles bajos (mapa 1).



Mapa 1. Sitios de muestreo de suelos con clasificación respecto al nivel de MO de acuerdo con el método de Walkley-Black.

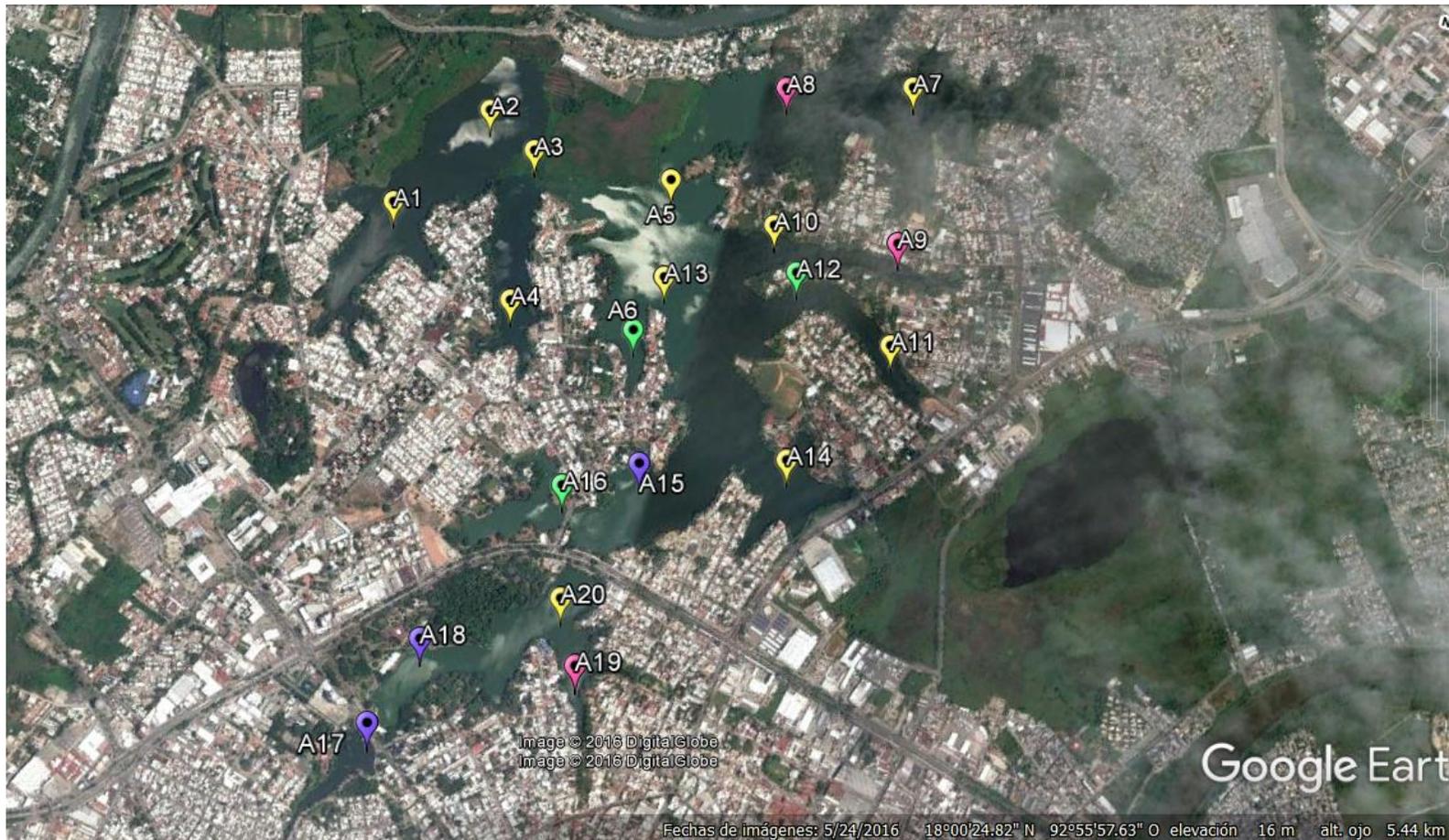


De acuerdo con Bain y Stevenson (1999) en muestras de agua, los rangos de concentración de oxígeno disuelto (OD) y las consecuencias ecológicas son

| OD (mg/L) | Condición | Consecuencias |
|-----------|---------------|---|
| 0 | Anoxia | Muerte masiva de organismos aerobios |
| 0-5 | Hipoxia | Desaparición de organismos y especies sensibles |
| 5-8 | Aceptable | Condiciones adecuadas para la vida de la gran mayoría de especies de peces y otros organismos acuáticos |
| 8-12 | Buena | |
| >12 | Sobresaturada | Sistemas en plena producción fotosintética |

En las muestras de agua (Mapa 2), tomadas en agosto, se observaron distintos niveles de OD. Mientras que se encontró poca variabilidad en pH y temperatura (superficial y de fondo) .

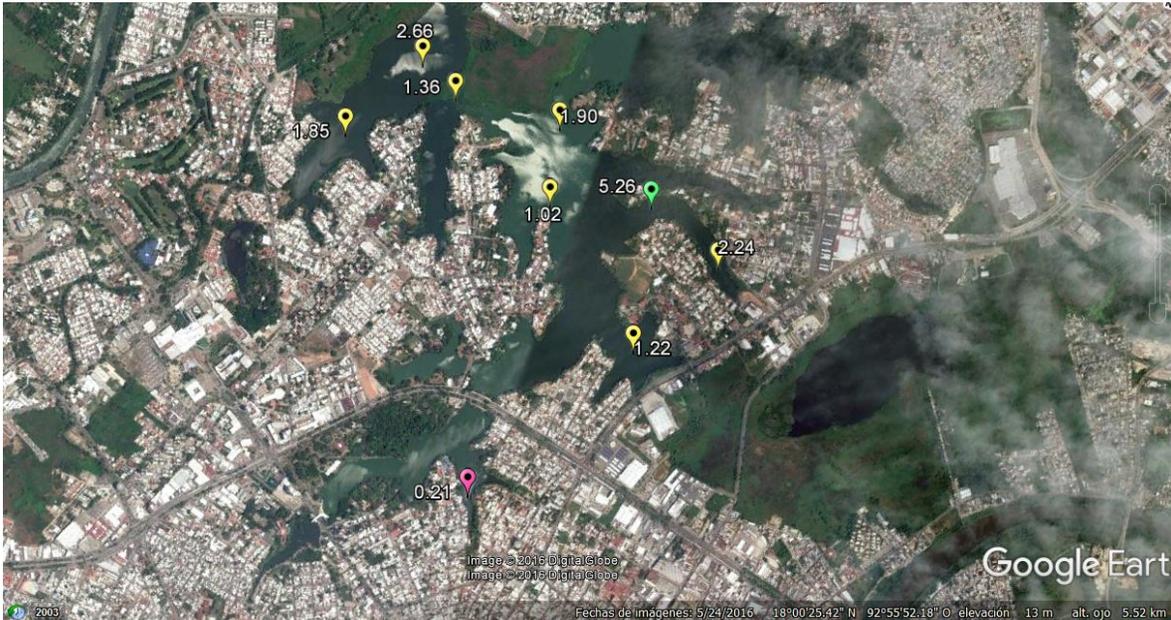
| Sitio | O2 | pH | Temp (Sup/Fon) | Sitio | O2 | pH | Temp (Sup/Fon) |
|-------|-----|-----|----------------|-------|------|-----|----------------|
| 1 | 6.4 | 9 | 33.3 32 | 11 | 7.5 | 9.3 | 32.8 30 |
| 2 | 7.2 | 9 | 32.7 31.5 | 12 | 8.1 | 9.4 | 32 31 |
| 3 | 6.2 | 9.1 | 32.9 31.5 | 13 | 7.9 | 9.6 | 34 33.5 |
| 4 | 7.4 | 8.9 | 33.5 31 | 14 | 5.9 | 9.6 | 32.1 31.5 |
| 5 | 7.1 | 9 | 34.3 32 | 15 | 13 | 9.8 | 34.6 33 |
| 6 | 9 | 9.1 | 33.6 33 | 16 | 8.4 | 9.2 | 33.6 32 |
| 7 | 6.3 | 8.9 | 32.1 30.5 | 17 | 17 | 9 | 34.5 32.5 |
| 8 | 4.8 | 9 | 32.1 30.5 | 18 | 13.5 | 10 | 34.3 33 |
| 9 | 1.8 | 9.1 | 31.6 29.5 | 19 | 4.4 | 9.5 | 34.2 34 |
| 10 | 7.6 | 9.1 | 31.9 31 | 20 | 6.2 | 10 | 34.5 33 |



Mapa 2. Sitios de muestreo de agua con clasificación respecto al nivel de OD de acuerdo con los criterios de Bain & Stevenson (1999).

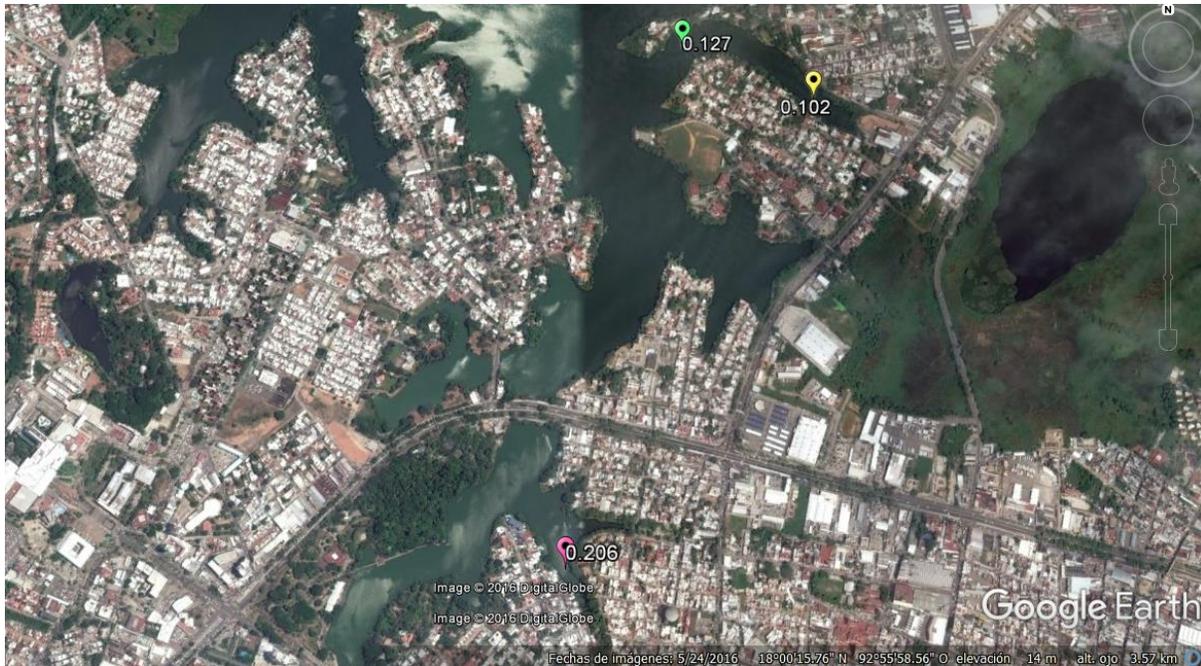


Los sitios muestreados que presentaron una mayor concentración de Pb (ppb) se encontraron principalmente en los brazos del cuerpo de agua (ver Mapa 3), donde el oxígeno estuvo en concentraciones variables y el pH cercano a 9.



Mapa 3. Puntos de muestreo agua con mayores niveles de Pb. Los números representan las cantidades encontradas en cada sitio (ppb) en la Laguna de las Ilusiones.

Ninguno de los puntos muestreados presentó una concentración de Cd (ppb) mayor a 1, siendo encontrados los puntos más altos en áreas cercanas a zonas residenciales (Mapa 4), las más altas (0.1-0.2 ppb), donde los niveles de oxígeno eran relativamente altos (con excepción del punto 19) y el pH era igualmente elevado.



Mapa 4. Puntos de muestreo agua con mayores niveles de Cd. Los números representan las cantidades encontradas en cada sitio (ppb) en la Laguna de las Ilusiones.

c. Actividad enzimática en plasma de cocodrilos reproductores

Los niveles de albúmina plasmática se encontraron en un rango de 0.52 a 2.31 (g/dL), con un promedio en las hembras de 1.177 g/dL (CICEA) y 0.418 g/dL (Laguna), mientras que en los machos fue de 0.665 g/dL (CICEA) y 0.615 g/dL (Laguna). El contenido de albúmina fue significativamente menor en las hembras de la Laguna que en las hembras del CICEA. En cambio, en los machos la diferencia no fue significativa. Como se observa, en los organismos silvestres los niveles de albúmina siempre fueron menores que en los animales en cautiverio, con excepción de los cocodrilos juveniles donde se encontró una concentración de albúmina de 1.85 d/dL, siendo la concentración más alta de todos los grupos analizados (Figura 1).

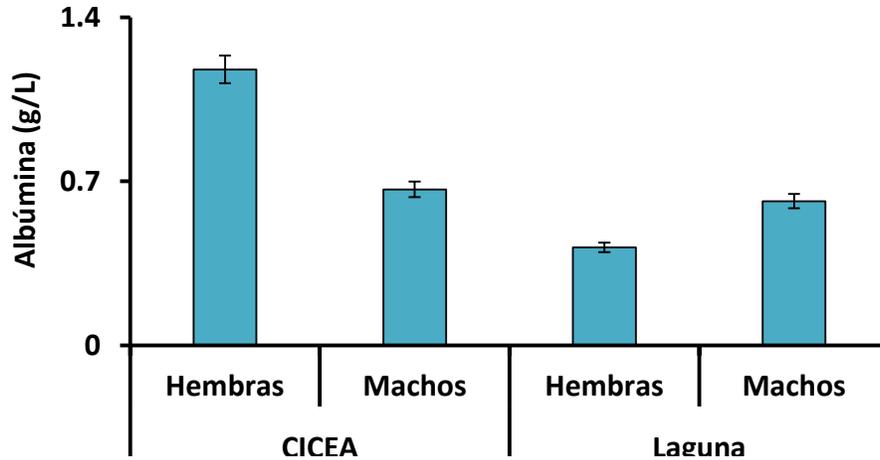


Figura 1. Comparación de albúmina en plasma de cocodrilos adultos Reproductores de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de n=5, cada muestra estimada por cuadruplicado. * p < 0.05.

En cuanto a proteínas totales, tanto las hembras del CICEA como los machos de la Laguna (por individuo, así como por grupo) presentaron los valores más altos (3.6 – 3.8 g/dL), los machos silvestres con un nivel intermedio presentaron en promedio 2.71 g/dL de proteínas y finalmente las hembras silvestres presentaron un promedio de 1.81 g/dL. Tanto en machos como en hembras de la Laguna, el contenido protéico fue variable, mientras que en los organismos del CICEA estos niveles fueron similares (Figura 2).

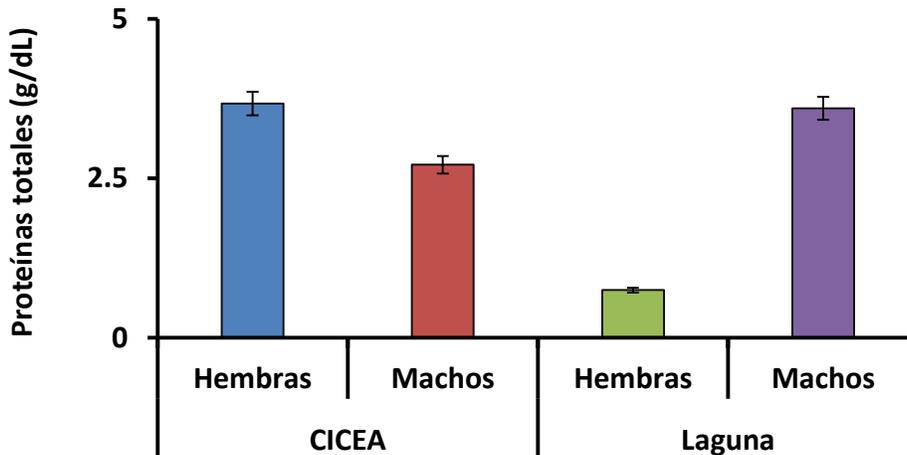


Figura 2. Contenido de proteínas plasmáticas totales. Los valores representan el promedio de 5 cocodrilos adultos reproductores. * p < 0.05

La actividad de la AChE, en promedio, fue distinto en organismos de ambos sitios de captura (Figura 2). La actividad de AChE fue mayor en hembras (0.273 u/mg proteína) que en machos (0.213 u/mg proteína) en la Laguna de las Ilusiones, Se observó un comportamiento similar en cautiverio, donde las hembras presentaron una actividad de 0.113 u/mL y los machos 0.094 u/mg proteína. En ambos casos, los niveles de AChE en organismos silvestres ($\bar{x}=0.2400559$ U/mg proteína) fue mayor que en los de cautiverio ($\bar{x}=0.1040209$ U/mg proteína).

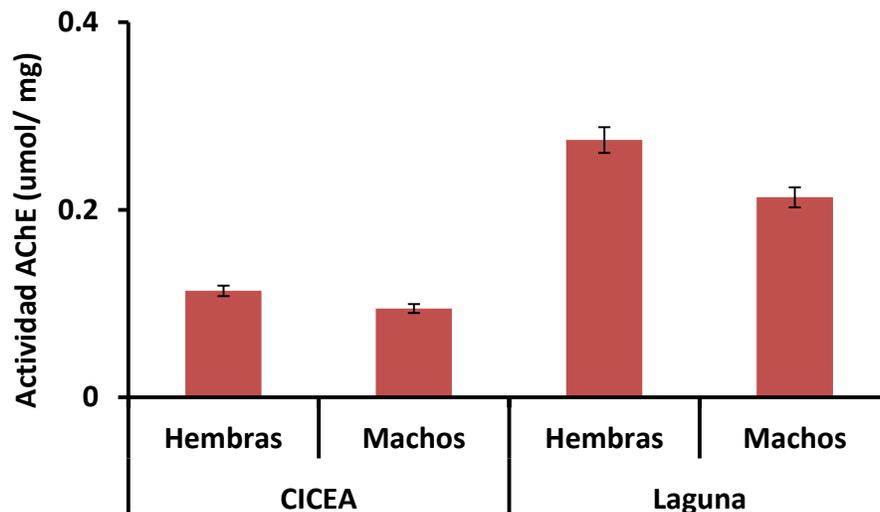


Figura 3. Actividad específica de acetilcolinesterasa en adultos reproductores de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. $p < 0.05$.

En el caso de BuChE, se encontraron valores menores que AChE (Figura 4), donde el promedio en hembras (0.036 u/mg proteína) en cautiverio fue menor que en machos (0.049 u/mg proteína) del mismo lugar. En los organismos de la Laguna ocurrió lo contrario, ya que las hembras (0.191 u/mg proteína) tuvieron mayor actividad de BuChE que machos (0.121 u/mg proteína).

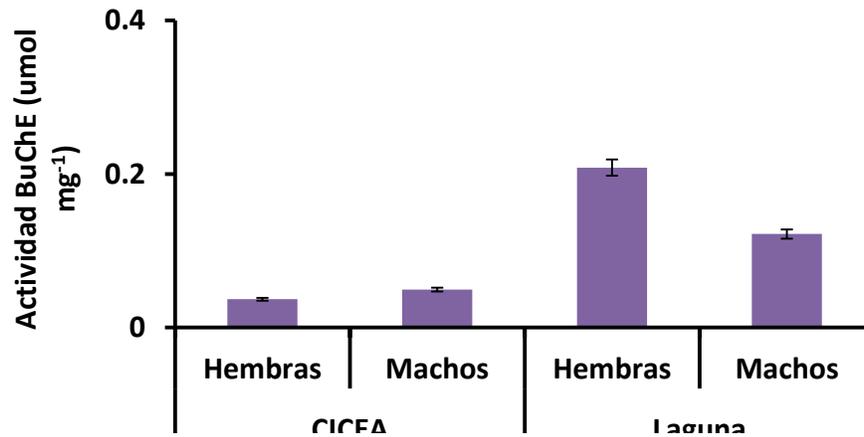


Figura 4. Actividad específica de la butirilcolinesterasa en plasma de adultos reproductores de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

En los organismos del CICEA se observó que la actividad de transaminasas no sobrepasa las 30 u/mg proteína, es decir, su actividad es relativamente baja, mientras que en los organismos silvestres se alcanza un valor de casi 100 u/mg proteína en una de las enzimas asociadas a daño necrótico en hígado (GOT) (Figura 5).

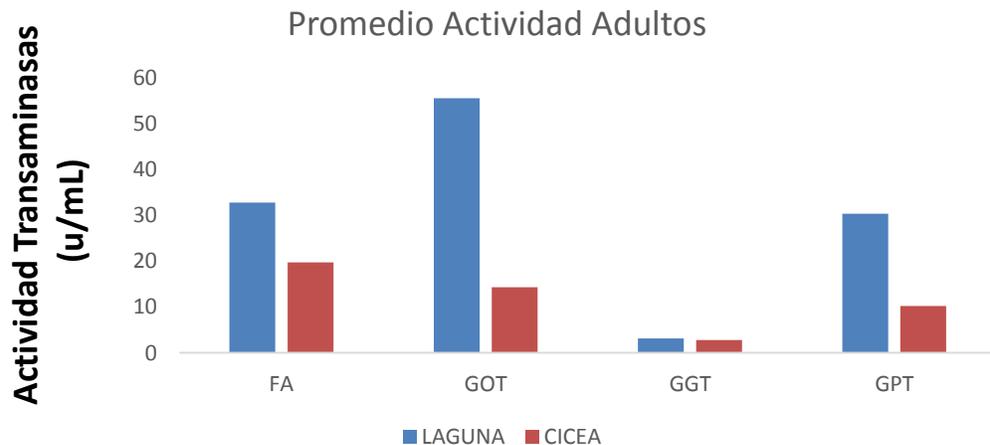


Figura 5. Actividad de transaminasas en Hembras y Machos Reproductores de *C. moreletii* en la Laguna de las Ilusiones

Se puede observar en los organismos silvestres que la actividad de GOT y GPT, se encuentran mucho más elevadas que en organismos del CICEA, sin embargo, la actividad de la FA, aunque mayor que en el grupo en cautiverio, es menor que GOT y en la mayoría de los casos, menor que GPT, además GGT se encuentra en niveles similares a los machos y hembras tanto silvestres como de grupo en cautiverio (Figura 5).

d. Actividad enzimática en juveniles y crías

En cocodrilos juveniles y crías los niveles promedio por individuo de albúmina fueron de 1.008 a 2.9 g/dL. Las crías tuvieron un promedio de albúmina cuantificada de 2.038 g/dL (CICEA) y 1.37 g/dL (Laguna). Mientras, que los juveniles presentaron 3.858 g/dL (CICEA) y 1.850 g/dL (Laguna) (Figuras 6 y 7).

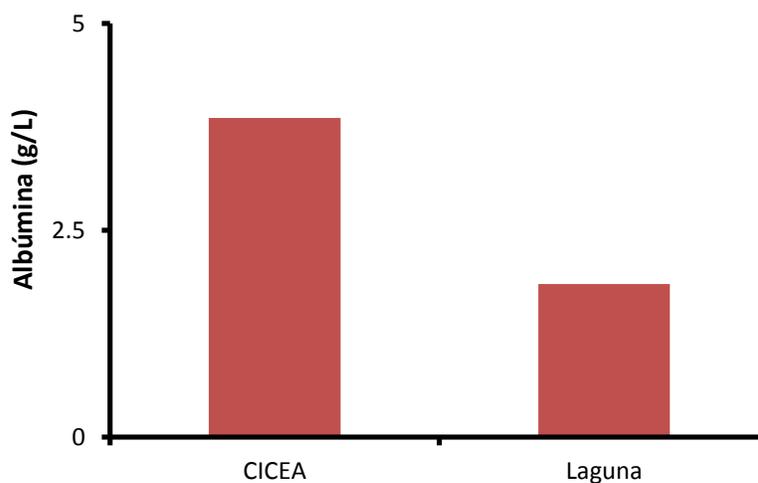


Figura 6. Concentración promedio de albúmina en juveniles de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 2 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

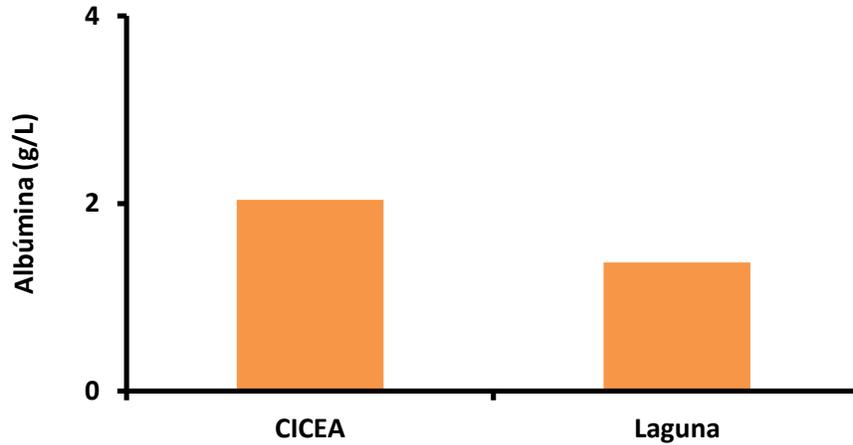


Figura 7. Concentración promedio de albúmina en crías de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

En cocodrilos juveniles de la Laguna, el contenido de albúmina fue menor ($x = 1.850172$) que aquellos del CICEA ($x=3.858326$) (Figura 6), en crías la diferencia fue menos notoria (Figura 7), sin embargo, en los organismos silvestres los niveles de albúmina siempre fueron menores que en el grupo en cautiverio.

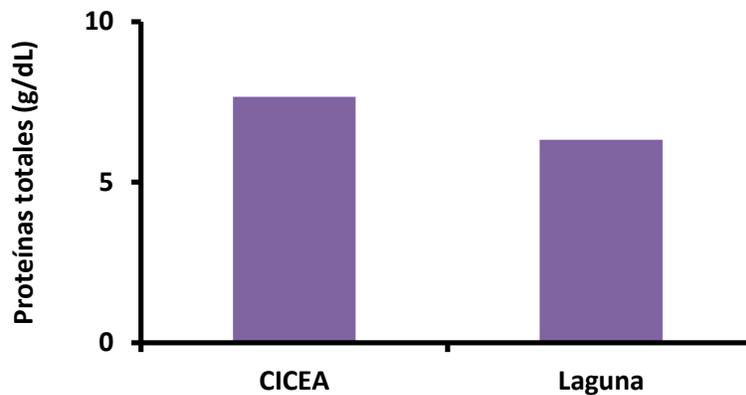


Figura 8. Valores promedio de proteínas totales en juveniles de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 2 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

Las proteínas totales cuantificadas fueron en promedio mayores en los cocodrilos juveniles del CICEA ($x= 7.65$ g/dL) en comparación con los juveniles silvestres ($x= 6.32$ d/dL), aunque la diferencia no fue significativa (Figura 8). En lo que respecta a las crías, hubo una variación mínima en el contenido de proteínas, con un promedio en organismos silvestres de 5.089 g/dL y de 5.572 g/dL en los organismos en cautiverio (Figura 9). Tanto en juveniles como en crías el contenido de proteínas totales siempre fue mayor que en los cocodrilos adultos reproductores.

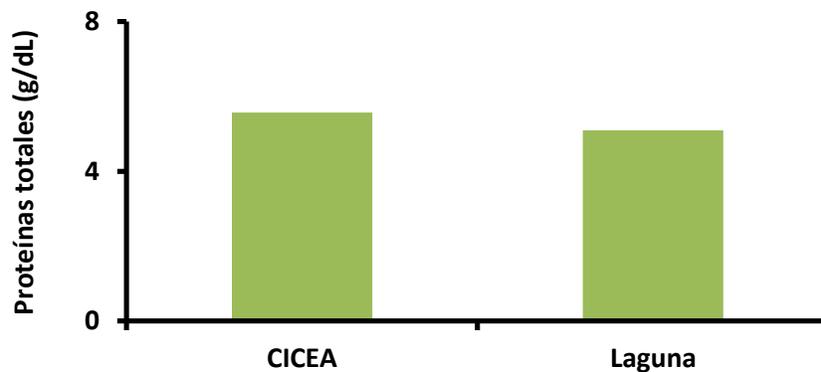


Figura 9. Contenido promedio de proteínas totales en crías de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

En crías se observó un comportamiento similar al de los adultos, siendo la actividad de AChE mayor en organismos provenientes de la Laguna ($x= 1.53$ U/mg proteína) que en organismos del CICEA ($x= 0.85$ U/mg proteína) (Figura 10), a diferencia de la actividad de BuChE, que es muy similar entre ambos grupos (Figura 11).

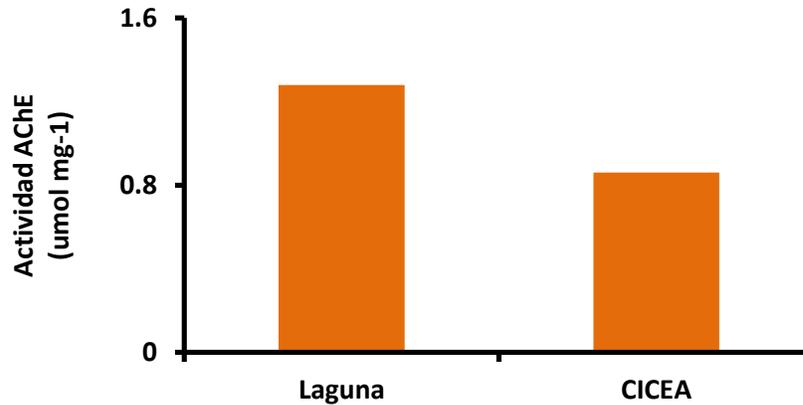


Figura 10. Actividad acetilcolinesterasa en crías de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

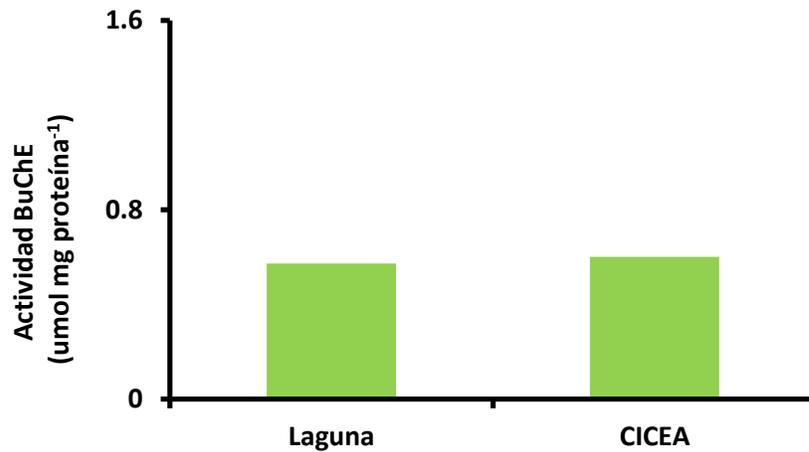


Figura 11. Actividad butirilcolinesterasa en crías de *C. moreletii*. Los valores representan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

La actividad de AChE en la hembra perteneciente al grupo de las crías de la Laguna de las Ilusiones fue la más alta, mientras que en las 2 crías hembras del CICEA, la actividad fue la menor de dicho grupo. Además, en todos los grupos de edad, las crías presentaron los índices más altos en

actividad colinesterásica (principalmente AChE), seguidos por los juveniles y, finalmente los adultos.

En juveniles parecen invertirse los valores, debido a que ambos juveniles del CICEA presentaron mayor actividad AChE ($x=0.58$ U/mg proteína) y BuChE ($x=0.39$ U/mg proteína), siendo ligeramente mayor la actividad en hembras que en machos. A diferencia de los juveniles de la Laguna de las ilusiones, en los cuales la actividad tanto de AChE ($x=0.26$ U/mg proteína) como de BuChE ($x=0.12$ U/mg proteína), son mucho menores, además de ser ligeramente mayor la actividad en Machos que en hembras (Figura 12).

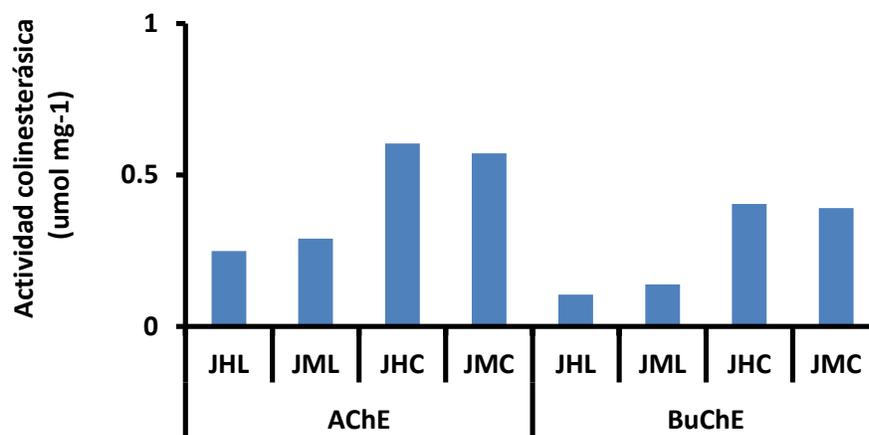


Figura 12. Actividades acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) plasmáticas en organismos juveniles de la Laguna y del CICEA. Los valores respresentan el promedio de 2 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

Tanto en juveniles como en crías de ambos grupos, los niveles de GGT no sobrepasan las 2.80 u/L. En juveniles, FA conserva niveles muy similares en ambos grupos, no así en el caso de GOT y GPT, los cuales son mucho más elevados en juveniles silvestres que en organismos del CICEA, seguida por el

macho del mismo sitio, con niveles de GOT incluso un poco menores a los niveles de GPT. En organismos del CICEA, todos los valores se mantienen en niveles similares (Figura 13).

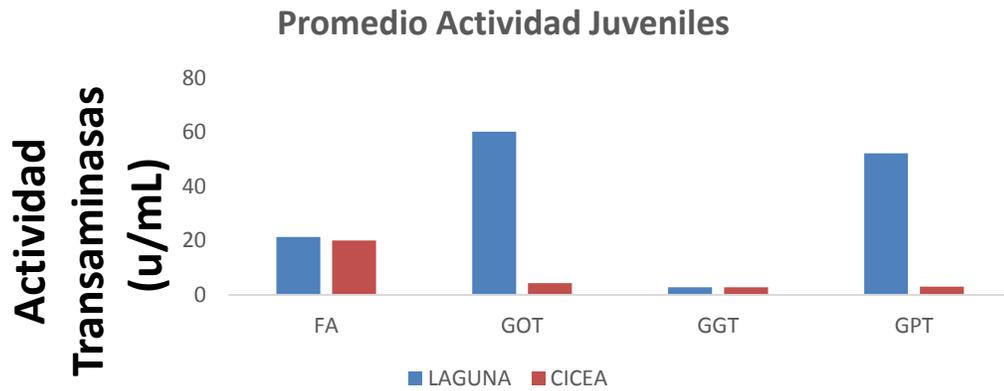


Figura 13. Actividades de transaminasas en organismos juveniles de la Laguna y del CICEA. Los valores representan el promedio de 2 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

Se puede observar en los juveniles silvestres que la actividad de GOT y GPT, se encuentran más elevadas que en organismos del CICEA. En crías, la actividad de FA es igual en todos los organismos y la más elevada de todos, seguida por GPT y GOT en organismos de la Laguna. En las crías del CICEA, GOT es la segunda enzima con mayor actividad, mientras que GPT suele conservarse en niveles similares en ambos grupos (Figura 14).

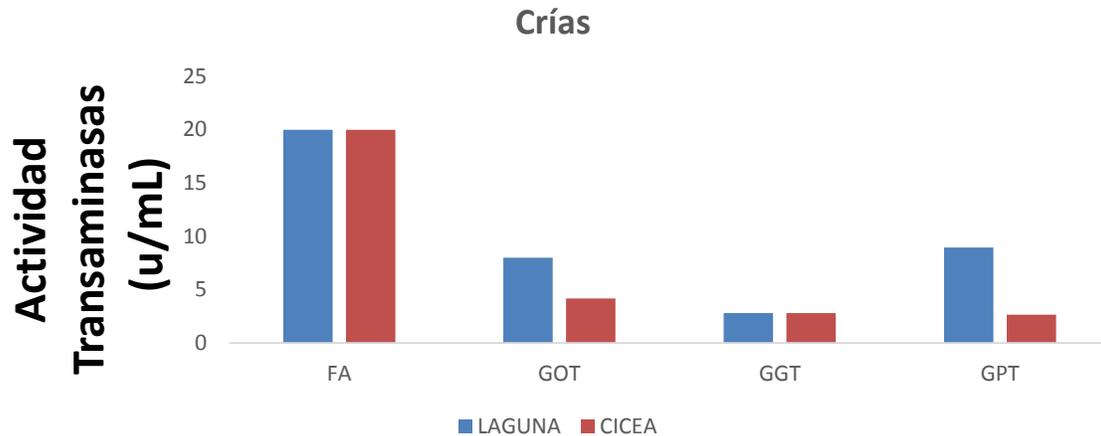


Figura 14. Actividades de transaminasas en crías de la Laguna y del CICEA. Los valores respresentan el promedio de 5 animales por grupo. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado. * $p < 0.05$.

e. Metales pesados

Al realizar la medición de Pb en sangre total, se observó que los machos provenientes de la Laguna, fueron los organismos con la mayor concentración de Pb analizada ($10.79156 \mu\text{g/dL}$), seguidos por las hembras ($8.4981 \mu\text{g/dL}$) y crías ($7.929 \mu\text{g/dL}$) del CICEA. Las hembras provenientes de la laguna, las cuales tuvieron una mayor actividad de enzimas indicadoras de estrés hepático, fueron las que mostraron los niveles más bajos de Pb en sangre ($2.739357 \mu\text{g/dL}$). Debe tomarse en cuenta que algunas hembras fueron capturadas posterior a la época de anidación, lo que podría haber influido en los niveles de Pb en sangre (Figura 15).

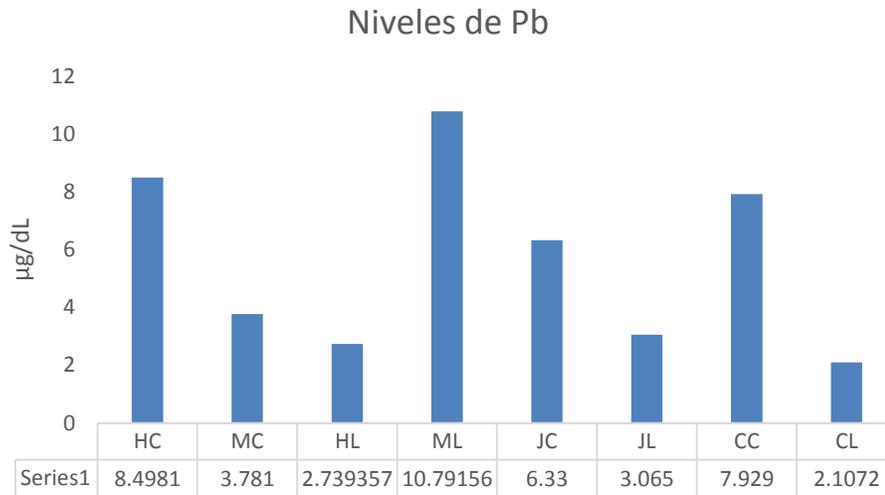


Figura 15. Contenido de Pb en sangre total de cocodrilos de la Laguna de las Ilusiones y el CICEA

Los niveles de Cd se mantuvieron similares entre los organismos de ambos sitios, siendo ligeramente mayores las concentraciones en organismos del CICEA que en organismos provenientes de la Laguna. En ningún caso las concentraciones rebasaron los 0.09 µg/Dl (Figura 16), lo que indica una exposición mínima a dicho metal en comparación con Pb.

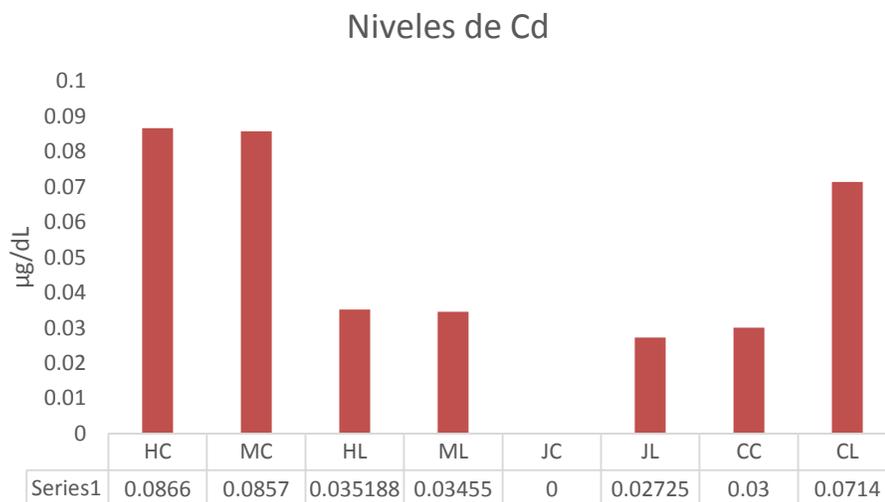


Figura 16. Comparación de contenidos de cadmio en sangre total en cocodrilos de la Laguna de las Ilusiones y del CICEA

f. Análisis global

El ANDEVA muestra que la actividad AChE está altamente relacionada con las variables sitio, sexo y edad. Así mismo, se muestra que la interacción de dichas variables afectará significativamente la actividad de AChE (Tabla 1). Caso contrario a la actividad de BuChE, donde se observa una relación poco significativa respecto a sitio y sexo por sí mismos, así como sus interacciones, con excepción de la edad. Igualmente, la combinación de factores como sitio y edad sí afectan la actividad medible de BuChE, indicando que existe una diferencia en actividad de ésta enzima entre ambos sitios (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados ANDEVA para la actividad acetilcolinesterasa (AChE).

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|--------|----------|
| A: Sitio | 1 | 9.49 | 0.005292 |
| B: Sexo | 1 | 6.53 | 0.017676 |
| AB | 1 | 7.65 | 0.01098 |
| C: Edad | 2 | 124.81 | 0 |
| AC | 2 | 27.6 | 0.000001 |
| BC | 2 | 4.36 | 0.024736 |
| ABC | 2 | 8.59 | 0.00164 |

Tabla 2. Resultados ANDEVA para la actividad butirilcolinesterasa (BuChE).

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|----------|----------|
| A: Sitio | 1 | 0.79 | 0.382057 |
| B: Sexo | 1 | 0.14 | 0.712666 |
| AB | 1 | 0.41 | 0.530653 |
| C: Edad | 2 | 30.92 | 0 |
| AC | 2 | 5.07E+00 | 0.015 |
| BC | 2 | 0.09 | 0.917438 |
| ABC | 2 | 3.30E-01 | 0.723381 |

La actividad de GOT, así como de GPT están altamente relacionadas con el sitio y la edad, además, la interacción de ambas variables afectaron significativamente la actividad de dichas enzimas. Tanto el sexo como el resto de las interacciones no afectaron significativamente a ambas enzimas, por lo que la actividad podría ser sólo influenciada por el lugar que habiten los organismos, así como la edad en que se encuentren. (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Resultados ANDEVA para la actividad glutámico-oxalacético transaminasa.

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|-------|----------|
| A: Sitio | 1 | 23.15 | 0.000074 |
| B: Sexo | 1 | 0.6 | 0.445327 |
| AB | 1 | 1.23 | 0.27945 |
| C: Edad | 2 | 6.79 | 0.004809 |
| AC | 2 | 4.72 | 0.019175 |
| BC | 2 | 1.78 | 0.191521 |
| ABC | 2 | 1.16 | 0.332494 |

Tabla 4. Resultados ANDEVA para la actividad glutámico-pirúvico transaminasa.

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|-------|----------|
| A: Sitio | 1 | 26.73 | 0.000031 |
| B: Sexo | 1 | 0.44 | 0.515489 |
| AB | 1 | 0.89 | 0.355143 |
| C: Edad | 2 | 7.57 | 0.002971 |
| AC | 2 | 7.29 | 0.003522 |
| BC | 2 | 1.19 | 0.32307 |
| ABC | 2 | 0.91 | 0.415552 |

GGT y FA no mostraron una relación significativa con ninguna de las variables, así como con las interacciones de las mismas, lo que se traduce con

que la actividad de dichas enzimas no es influenciada por ninguna de las variables, al no ser significativa su relación (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Resultados ANDEVA para la actividad gama-glutamil transpeptidasa.

| Variable | GL | F | Prob |
|-----------------|-----------|----------|-------------|
| A: Sitio | 1 | 0.11 | 0.740998 |
| B: Sexo | 1 | 0.11 | 0.740998 |
| AB | 1 | 0.11 | 0.740998 |
| C: Edad | 2 | 0.11 | 0.894598 |
| AC | 2 | 0.11 | 0.894598 |
| BC | 2 | 0.11 | 0.894598 |
| ABC | 2 | 0.11 | 0.894598 |

Tabla 6. Resultados ANDEVA para actividad fosfatasa alcalina.

| Variable | GL | F | Prob |
|-----------------|-----------|----------|-------------|
| A: Sitio | 1 | 0.01 | 0.938095 |
| B: Sexo | 1 | 0.08 | 0.785668 |
| AB | 1 | 0.46 | 0.502706 |
| C: Edad | 2 | 1.23 | 0.310711 |
| AC | 2 | 0 | 0.997351 |
| BC | 2 | 0.13 | 0.87504 |
| ABC | 2 | 0.35 | 0.705339 |

Los contenidos de albúmina están altamente relacionados con el sitio y la edad. Sin embargo, la interacción de dichas variables no afectó significativamente la concentración de albúmina (Tabla 7). El conteo de proteínas totales no mostró una relación significativa respecto al sitio, sexo o a las interacciones de estas variables, indicando que existe una diferencia en proteínas totales únicamente entre edades (Tabla 8).

Tabla 7. Resultados ANDEVA para el contenido de albumina.

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|-------|----------|
| A: Sitio | 1 | 5.83 | 0.024129 |
| B: Sexo | 1 | 0.78 | 0.386631 |
| AB | 1 | 0.63 | 0.434237 |
| C: Edad | 2 | 10.68 | 0.000524 |
| AC | 2 | 2.45 | 0.108144 |
| BC | 2 | 0.49 | 0.615975 |
| 2 | | 1.74 | 0.197533 |

Tabla 8. Resultados ANDEVA para el contenido de proteínas totales.

| Variable | GL | F | Prob |
|----------|----|------|----------|
| A: Sitio | 1 | 0.55 | 0.464661 |
| B: Sexo | 1 | 0.13 | 0.725364 |
| AB | 1 | 0.41 | 0.52744 |
| C: Edad | 2 | 5.92 | 0.008452 |
| AC | 2 | 0.08 | 0.924259 |
| BC | 2 | 0.71 | 0.502134 |
| ABC | 2 | 0.59 | 0.562801 |

Se estableció que las concentraciones de Pb en sangre estuvieron significativamente relacionadas a la edad de los organismos, con el sitio en el que se encuentran, así como el sexo, y el sitio de procedencia. Además, la co-variable peso influye significativamente en los niveles de Pb encontrados en sangre. En el caso del Cd se observó que la concentración estuvo en función de la edad y el sexo del organismo analizado (Tabla 9).

La actividad enzimática, conteo protéico y niveles de albúmina están significativamente relacionadas con los niveles tanto de Cd como de Pb, así como la interacción de ambos metales en sangre, con algunas pocas excepciones marcadas con celdas azules (Tabla 10).

Tabla 9. Relación de concentraciones plomo y cadmio con variables pertenecientes a los organismos y al medio.

| Pb | | | | Cd | | | |
|-------------|----|------|----------|-------------|----|------|----------|
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| X(Longitud) | 1 | 1.36 | 0.261025 | X(Longitud) | 1 | 0.5 | 0.487666 |
| X(Peso) | 1 | 8.13 | 0.011535 | X(Peso) | 1 | 0.52 | 0.481736 |
| A: Edad | 2 | 0.28 | 0.75595 | A: Edad | 2 | 3.7 | 0.047839 |
| B: Sexo | 1 | 1.6 | 0.224098 | B: Sexo | 1 | 6.5 | 0.021462 |
| AB | 2 | 2.33 | 0.129675 | AB | 2 | 1.31 | 0.297664 |
| C: Sitio | 1 | 3.66 | 0.073713 | C: Sitio | 1 | 1.81 | 0.19763 |
| AC | 2 | 9.34 | 0.002054 | AC | 2 | 1.71 | 0.21315 |
| BC | 1 | 4.89 | 0.041936 | BC | 1 | 0.06 | 0.813611 |
| ABC | 2 | 7 | 0.006554 | ABC | 2 | 1.76 | 0.204326 |

Tabla 10. Correlación múltiple de actividades enzimáticas, proteínas totales y niveles de albúmina con niveles de plomo y cadmio en sangre total.

| AChE | | | | BuChE | | | |
|----------|----|--------|--------|----------|----|--------|--------|
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| Cd | 1 | 19.929 | 0.0001 | Cd | 1 | 12.839 | 0.0011 |
| Pb | 1 | 12.603 | 0.0012 | Pb | 1 | 15.542 | 0.0004 |
| Cd*Pd | 1 | 6.46 | 0.0161 | Cd*Pd | 1 | 6.45 | 0.0162 |
| GOT | | | | GPT | | | |
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| Cd | 1 | 4.516 | 0.0414 | Cd | 1 | 4.126 | 0.0506 |
| Pb | 1 | 11.7 | 0.0017 | Pb | 1 | 7.086 | 0.0121 |
| Cd*Pd | 1 | 1.594 | 0.2159 | Cd*Pd | 1 | 1.308 | 0.2612 |
| GGT | | | | FA | | | |
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| Cd | 1 | 39.792 | 0 | Cd | 1 | 11.781 | 0.0017 |
| Pb | 1 | 29.334 | 0 | Pb | 1 | 16.259 | 0.0003 |
| Cd*Pd | 1 | 10.963 | 0.0023 | Cd*Pd | 1 | 2.089 | 0.1581 |
| ALB | | | | PT | | | |
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| Cd | 1 | 21.875 | 0.0001 | Cd | 1 | 21.426 | 0.0001 |
| Pb | 1 | 29.836 | 0 | Pb | 1 | 15.618 | 0.0004 |
| Cd*Pd | 1 | 22.852 | 0 | Cd*Pd | 1 | 12.739 | 0.0012 |

Al realizar ANDEVAS para cada variable ambiental respecto a las concentraciones encontradas tanto de Pb como de Cd en muestras de agua, ambas concentraciones están significativamente afectadas por el factor pH, no así por el oxígeno disuelto en agua. También puede observarse que sólo la concentración de Pb se encuentra significativamente correlacionada con la temperatura promedio de cada punto (Tabla 11).

Tabla 11. ANDEVAS de parámetros medio ambientales medidos y niveles Pb y Cd encontrados en muestras de agua.

| Pb | | | | Cd | | | |
|----------|----|--------|----------|----------|----|-------|----------|
| Variable | GL | F | Prob | Variable | GL | F | Prob |
| Ph | 9 | 33.94 | 0.000002 | Ph | 9 | 15.9 | 0.000084 |
| O2 | 18 | 28.41 | 0.14673 | O2 | 18 | 6.9 | 0.29215 |
| Temp | 17 | 106.04 | 0.009381 | Temp | 17 | 14.18 | 0.067842 |

10. DISCUSION

Los estudios relacionados a ChEs como biomarcadores se han concentrado principalmente a las implicaciones neurotóxicas de la AChE (Richetti *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015). Sin embargo, la AChE es un buen marcador de exposición relacionado con daños originados por distintas fuentes (Diamantino *et al.*, 2000; Roex *et al.*, 2003; Carvalho-Correa *et al.*, 2008).

En el presente estudio observamos que la actividad de AChE en juveniles fue inhibida, mientras que en adultos se observó un efecto contrario, éste comportamiento no fue previsto, sin embargo, López-Hernández *et al.*, (2015), observaron la misma respuesta en ratones CD-1 expuestos a Pb. Por tanto, siguiendo éste modelo, se infiere que efectivamente la actividad de dicha enzima

está íntimamente relacionada no sólo a la magnitud del daño, sino también a la edad del organismo que esté sufriendo daño inflamatorio.

Además, hemos observado en laboratorio que, si bien puede existir una inhibición de AChE y BuChE en suero de animales expuestos a Pb, dicho cambio se encuentra íntimamente relacionado al aumento de estas enzimas dentro del hígado de los organismos (observación en ratones del laboratorio), por lo que, una mayor concentración en sangre podría significar un proceso constante que busca ser compensado por enzimas que inhiban a moléculas proinflamatorias, por tanto, aunque estén expuestos a contaminantes que inhiban actividad colinesterásica en exposición aguda, el resultado podría ser totalmente opuesto en exposiciones crónicas.

La acetilcolina (ACh) es una proteína que tiene la capacidad de inhibir moléculas proinflamatorias. El aumento de ACh, indica la presencia de un estresor externo, dando como resultado una respuesta que busca detener el daño inflamatorio. Si en los organismos de la laguna observamos que hay un aumento de AChE (enzima degradadora de ACh), disminuye la presencia de ACh, dando paso a un proceso inflamatorio mayor. Esto indica un estrés constante en los organismos por agentes exógenos, así como procesos inflamatorios y daño en tejidos colinérgicos como el hígado de manera crónica. La actividad colinesterásica en suero es menor que en otros tejidos (Honeyfield *et al.*, 2008), la elevada actividad de las ChEs observada en organismos silvestres, está relacionada en humanos a enfermedades con elevada síntesis de albúmina como nefrosis, enteropatías exudativas, entre otras, por lo que, en hepatopatías, así como daños crónicos de

tejidos, la reducción de actividad colinesterásica es más una excepción que una regla.

Podemos también afirmar que efectivamente existe daño hepático en organismos de la laguna debido a la actividad de transaminasas observada, al ser GOT y GPT indicadores específicos de estrés por hepatotoxicidad, nos muestran de manera indirecta la presencia de daños en la estructura histológica del tejido hepático (El-Sayed *et al.*, 2007).

La actividad enzimática de los organismos de éste estudio presenta un comportamiento similar al observado en organismos de *Alligator mississippiensis*, cuya población sufrió un declive en 2002 y 2008 principalmente. Donde se observó que los organismos de cuerpos de agua con alta mortalidad, presentaron una actividad elevada de GOT y GPT, ligeramente más elevada de FA y sin diferencias significativas en proteínas totales, así como en albúmina (Schoeb *et al.*, 2002; Honeyfield *et al.*, 2008). Cabe destacar que, a diferencia de los cocodrilos de este estudio, los organismos de estudios previos con cocodrilianos asociados a actividad colinesterásica presentaron un comportamiento en actividad enzimática distinto, al haber una disminución y no un aumento en actividad de AChE, mientras que BuChe presentó un ligero aumento en la actividad (Honeyfield *et al.* 2008).

De acuerdo con. Attademo *et al.* (2012) los cocodrilianos podrían ser más sensibles que otras especies de reptiles a la exposición a contaminantes como los organofosforados. Attademo encontró diferencias significativas en la actividad enzimática entre especies, sin embargo, como en éste estudio, la actividad no varió significativamente entre sexos.

Tomando como referencia que en *A. mississippiensis* las concentraciones de GOT son significativamente mayores en hígado, seguido por pulmones e intestino. GPT está más relacionado con riñón y, en mucho menor grado, con músculo esquelético. FA fue detectado principalmente en hígado, riñón o intestino, sin diferencias significativas entre dichos tejidos y, finalmente, GGT no mostró una diferencia significativa entre riñón e intestino, donde fue mayormente encontrado por Bogan y Mitchell (2014), podremos corroborar una vez más que los valores de dichas transaminasas encontradas en suero de los organismos provenientes de la Laguna de las Ilusiones nos indican la presencia de daño hepático. Dichos niveles, en especial GOT y GPT, han sido asociados en humanos a daño hepático como fibrosis y cirrosis (Halim *et al.*, 1997), mostrando una exposición crónica a contaminantes hepatotóxicos como Pb y Cd.

El Cd puede introducirse en el suelo por el uso de agroquímicos en los campos cercanos, el contacto con aguas residuales de los asentamientos que rodean a la laguna, el uso de aguas de riego que contengan este elemento o por la deposición sobre la superficie de partículas húmedas y secas que son arrastradas por el aire provenientes de procesos industriales. El Cd se moviliza a través del suelo dependiendo de factores como el pH y el contenido de materia orgánica, a este último se adhiere fuertemente hasta entrar en contacto con la superficie de las plantas, lo que le proporciona una vía de entrada por medio de la cadena trófica (Galvao & Corey, 1987).

El Pb entra a los suelos por la deposición de partículas arrastradas por el viento, el contacto con aguas residuales industriales, el riego jardines aledaños con aguas que contengan pequeñas fracciones de este metal, y aguas de escorrentía

provenientes de apilamientos minerales. En el suelo el Pb tiene una gran afinidad con las sustancias húmicas, así como el pH y depende de ellos para fijarse, pero debido a que es poco móvil permanece en los horizontes superiores y no es asimilado en grandes cantidades por las plantas, por lo que su ingreso a la cadena trófica es relativamente limitado (Doadrio-Villarejo, 2006; Núñez-Chávez, 2007)).

La mayoría de los metales pesados son tóxicos en general, dicha toxicidad en el medio no está dada directamente en función de sus características esenciales, sino por las concentraciones en las que se encuentran, así como los agregados que puedan formar.

Se sabe que los metales pesados pueden (1) quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación, (2) ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas o pueden pasar a la atmósfera por volatilización y (3) moverse a través de las aguas superficiales o subterráneas. De acuerdo con Acosta de Armas y Montilla-Peña (2011), los diversos factores que intervendrán en la movilización de los metales son:

a) El pH es un factor esencial en la biodisponibilidad de un metal. La mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido, además, es un parámetro importante para definir la movilidad del catión, debido a que en medios de pH moderadamente ácido se produce la precipitación como hidróxidos.

Si el pH es elevado entonces puede bajar la toxicidad metálica por precipitación como carbonatos e hidróxidos. La adsorción de los metales pesados está fuertemente condicionada por el pH del suelo (y por tanto, también

su solubilidad). Los resultados obtenidos por Basta *et al.* (1993) sugieren que el pH es la característica edáfica que más afecta a la adsorción de Cd, Cu y Pb. En ésta laguna se observó que en promedio el pH en agua fue de 9.28, es decir, es un pH bastante básico. Se sabe que en medios muy alcalinos, los metales pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxicomplejos, los cuales se originan por la disociación ácida de iones hidratados y son muy importantes para muchos metales en aguas naturales, ya que varios hidroxicomplejos forman polímeros polinucleares, que son pasos intermedios para su precipitación como oxihidróxidos (Rodríguez-Mellado & Marín-Galvin, 1999).

- b)** En aguas aireadas hay pocos complejos inorgánicos de metales traza que puedan ser las especies dominantes, aparte de los hidroxicomplejos, con excepción de los complejos carbonatados de cobre, así como complejos clorurados de Cd, plata y mercurio, en presencia de concentraciones altas de cloruro. En aguas anóxicas son importantes los complejos bisulfuro, tiosulfato y polisulfuro (Rodríguez-Mellado & Marín-Galvin, 1999).

Durante el día suelen encontrarse concentraciones mayores de oxígeno disuelto (OD) cuando la fotosíntesis llega a sus mayores niveles luego del mediodía, mientras se registran más bajas durante la noche, todas las muestras fueron tomadas durante el día para conocer los niveles de OD en las condiciones que se podrían considerar las óptimas.

El OD también es dependiente de la temperatura, la cual fue de 32.5 °C en promedio en toda la laguna. De acuerdo con Bain & Stevenson (1999), a dicha temperatura se esperaría un valor de OD (mg/L) de 7.32, debido a que aguas más cálidas son capaces de disolver menores cantidades de oxígeno, sin

embargo, al medir los niveles de OD en la Laguna de las Ilusiones, se obtuvieron valores bastante variables en distintas zonas de dicho cuerpo de agua, por lo que algunas partes de la Laguna se encuentran en condiciones de hipoxia, algunas en buenas en condiciones y la gran mayoría en condiciones aceptables. En lagos, el nivel de OD varía fundamentalmente con la profundidad, lo cual podría estar ocurriendo también en el sitio de estudio mientras que en ríos y arroyos, los cambios suelen estar más vinculados a la dimensión horizontal.

c) La materia orgánica (MO) puede absorber tan fuertemente algunos metales, que pueden quedar no disponibles incluso para las plantas. La unión a la MO del suelo es uno de los procesos que gobiernan la solubilidad y la biodisponibilidad de metales pesados. Sin embargo, la toxicidad de los metales pesados se potencia en gran medida por su fuerte tendencia a formar complejos organometálicos, lo que facilita su solubilidad, disponibilidad y dispersión. La estabilidad de muchos de estos complejos frente a la degradación por los organismos del suelo es una causa muy importante de la persistencia de la toxicidad. En las muestras de suelo tomadas en la laguna ocurrió un comportamiento similar al observado en muestras de agua, ya que la MO medida varió en distintos sitios del cuerpo de agua, siendo en su mayoría suelos con muy alto contenido de MO, seguidos por suelos con contenido bajo de MO, lo que, de seguir este patrón, se traduciría en áreas con mayor disponibilidad de metales pesados que otras.

La importancia de contaminantes persistentes como el Pb, es que no afectan únicamente al sistema nervioso. Se ha establecido que puede afectar todos los órganos, teniendo un posible impacto en la salud reproductiva debido a la existencia

de una posible asociación entre las concentraciones del metal y los efectos adversos en el sistema reproductor (Benoff *et al.*, 2002), así como la inducción de cambios a nivel molecular que podrían afectar los procesos metabólicos de los organismos (Zawia *et al.*, 2000), provocando problemas difícilmente visibles en poblaciones silvestres expuestas a este compuesto.

El Pb, está presente en dos grupos de especies químicas, las inorgánicas, de mayor trascendencia y, las orgánicas, habitualmente alquiladas. Las especies inorgánicas, dentro de las cadenas tróficas, están constituidas principalmente por Pb metal, los óxidos y una única especie iónica, el catión divalente Pb^{2+} (King, 1997). El Pb^{2+} , es soluble en agua en forma de bicarbonato, por su característica de ácido blando, forma complejos con ligandos biológicos, preferentemente con átomos dadores de azufre, siendo el aminoácido preferido la cisteína, con el cual forma un complejo estable. El Pb metal y el PbO , en forma de partículas, se encuentran en la atmósfera y son fuentes continuas de contaminación. De las especies orgánicas, las que más interés han suscitado son el tetraetil y tetrametil Pb, estas especies son liposolubles y fácilmente absorbibles, acumulándose en glóbulos rojos y pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Núñez-Chávez, 2007).

El contenido de Pb en tejidos dependerá de la dieta. Se estima que la absorción diaria de Pb en el humano es de 31.5 μg , de los que 16 se eliminan por riñón (24 μg total se eliminan contando con los 8 de las heces), distribuyéndose 9.5 en tejidos duros y 4.5 en blandos aproximadamente. La intoxicación crónica de Pb en humanos presenta un cuadro clínico caracterizado por irritaciones gastrointestinales, anomalías hematológicas con anemia, alteraciones renales, que

son muy intensas y con lesiones tubulares por acumulación de Pb en el glomérulo, afecciones que parecen ser indicadas por la actividad de transaminasas.

El cuadro clínico de una intoxicación por los derivados metélicos y etélicos de Pb (IV) está caracterizado por una anemia y por neuropatías, periféricas, afectando al sistema nervioso central, como la encefalopatía la cual lleva a la letargia en casos graves, lo cual ha sido observado en campo al manejar algunos organismos. Además, el Pb es abortivo y provoca malformaciones fetales, (Strasimirova *et al.*, 1977; Albahary, 1985; Yule, 1992).

El Cd puede encontrarse en asociación con distintos compuestos, de los cuales, los de mayor importancia son el acetato de Cd, cloruro de Cd, fluoruro de Cd, sulfato de Cd, nitrato de Cd, entre otros (Gunnar *et al.*, 2007). Puede acumularse en altas concentraciones en una gran variedad de organismos marinos y en algunas plantas, también puede depositarse en las riveras de ríos y costas marinas, aunque no se han descrito niveles que representen peligro para el ambiente.

La acumulación del Cd en animales es de gran importancia por el peligro que la ingestión prolongada de éstos puede significar, aunque hasta el momento no se han tenido evidencias de intoxicación por este mecanismo. También se sabe que los riñones y el hígado son los órganos de los peces en donde más se concentra el Cd. En ecosistemas acuáticos el Cd puede bioacumularse principalmente en moluscos y peces, los cuales forman parte de la dieta en distintas etapas en la vida de los cocodrilianos. La susceptibilidad al Cd puede variar ampliamente entre organismos acuáticos, por ejemplo, los organismos de agua salada son más resistentes al envenenamiento por Cd que los organismos de agua dulce (Galvao & Corey, 1987).

Las deficiencias de hierro, zinc, calcio y de proteínas en el organismo, facilitan la absorción de Cd, sin embargo, se ha observado que la administración simultánea de otros metales, como el zinc, tendrán efectos preventivos en los efectos deletéreos del Cd (Gunnar *et al.*, 2007). La exposición prolongada al Cd puede provocar efectos como anemia, alteraciones y trastornos hepáticos, cambios en metabolismo de los minerales, daño renal, además de provocar alteraciones cromosómicas y procesos de calcificación (Galvao & Corey, 1987; Gunnar *et al.*, 2007).

Debido a que tanto metales pesados como pesticidas suelen asociarse con la disminución en la actividad colinesterásica, existe la posibilidad de que la respuesta enzimática causada por un metal pesado pueda confundirse con aquella causada por pesticidas como los organofosforados. Además, se sabe que los metales pesados también pueden ser bioacumulados, con vida media larga y con efectos no sólo neurotóxicos, sino también nefrotóxicos, por lo que pueden presentar una amenaza igual o mayor a los pesticidas conocidos. Dieter & Ludke (1975) demostraron que la combinación de metales pesados con pesticidas (paratión y mercurio en este caso), puede tener efectos letales en concentraciones en las cuales por separados serían inocuos, además, los efectos bioquímicos subletales causados individualmente por dichos compuestos, se potencian en gran medida al combinarse. En sus resultados el paratión inhibe hasta el 90% de ChEs, sin embargo, al presentarse también los metales pesados, existía una potenciación en los efectos del pesticida sobre los organismos, estando directamente relacionado una mayor inhibición de ChEs en cerebro en exposiciones agudas, efecto que también se ha observado con PCBs y Organofosforados (Jett *et al.*, 1999).

Oliveira *et al.* (2015) probaron los cambios que podrían provocar 3 contaminantes orgánicos por sí solos, así como la combinación de estos sobre actividad de AChE en cerebro y músculo del pez *Rhamdia quelen*. Encontraron que la exposición por sí sola, principalmente de DDT y TBT, incrementaba significativamente la actividad de AChE (con excepción de BaP, la cual reducía la actividad de AChE en músculo) en ambos tejidos en exposiciones agudas y subcrónicas, siendo mayor el aumento en individuos expuestos subcrónicamente (en músculo para BaP y TBT, mientras que en cerebro fue BaP y DDT), lo cual sugiere un efecto acumulativo en dichos tejidos. Sin embargo, observaron que la combinación de los compuestos tuvo un efecto completamente distinto en la actividad enzimática, al suprimir la actividad de AChE en exposiciones agudas, lo que sugiere un efecto sinérgico que juega un papel importante en la respuesta de los mecanismos antioxidantes y detoxificantes. Estas mezclas de contaminantes podrían modificar las respuestas biológicas de los organismos, que podría resultar en toxicidades inesperadas al comparar la exposición a contaminantes en circunstancias distintas, como ha ocurrido en este estudio.

Los cocodrilos de ésta laguna pueden ser empleados como biomonitores efectivos a largo plazo para evaluar la contaminación local, debido a que no existe una tendencia universal en la concentración de contaminantes, existiendo también diferencias en la respuesta de los organismos, revelando así los distintos niveles y tipos de contaminación ambiental (Delany *et al.*, 1988; Manolis, Webb & Britton, 2002). Delany *et al.*, 1988 confirma esto al evaluar la concentración de contaminantes en músculo de *Alligator mississippiensis*, demostrando la capacidad de dichos organismos para acumular metales y contaminantes orgánicos en dicho

tejido. En *Alligator sinensis* (Xu *et al.*, 2006) se midieron concentraciones de metales pesados en distintos tejidos de dos individuos para elucidar la distribución general de dichos componentes en el cuerpo, encontrando que la concentración de metales solía ser mayor en hígado, riñón y corazón, lo cual se refleja en la alta actividad de marcadores de daño hepático observada en la laguna, además de encontrar niveles altos de metales en heces, seguido por huevos, sugiriendo la capacidad de dichos organismos para reducir la carga de sustancias tóxicas principalmente por excreción fecal y, en menor magnitud, a través de la ovoposición en hembras.

Los niveles de Pb son mayores que aquellos de Cd, ambos son muy bajos, sin embargo, aún se desconoce la concentración necesaria para ocasionar efectos en cocodrilianos. Esto plantea dos posibles escenarios: (1) Existe una baja pero constante exposición a estos contaminantes, lo cual concordaría con la diferencia en la actividad enzimática indicadora de daño que varía con la edad de los organismos, así como con el comportamiento observado en campo, siendo el Pb el componente dañino principal; (2) Los cambios medibles con la actividad enzimática podrían ser ocasionados por la presencia de otros componentes cuyo efecto podría incluso ser potenciado por la presencia de dichos metales, como observó Vonier *et al.* (1996) en *Alligator mississippiensis*.

En cocodrilianos se desconoce aún las relaciones de potenciación o antagonismo entre otros compuestos contaminantes con metales pesados de manera natural, lo que da pie a muchas posibles interacciones desconocidas entre metales y otros contaminantes que podrían estar resultando en anomalías observadas en campo distintas a aquellas recreadas en laboratorio.

11. CONCLUSIONES

- ✓ Tanto adultos como crías presentan actividad elevada de AChE, lo cual no se esperaría observar en exposiciones agudas a contaminantes.
- ✓ La actividad colinesterásica en juveniles es similar a exposiciones agudas a contaminantes.
- ✓ Los niveles de Pb y Cd, aunque bajos, podrían estar provocando un daño de manera crónica en organismos pertenecientes a la Laguna de las Ilusiones.
- ✓ La actividad de ChEs indica la presencia de daño en tejidos, la actividad de transaminasas confirma la existencia de daño hepático.
- ✓ Los niveles inferiores de proteínas y albúmina indican una baja nutrición y salud en general en hembras provenientes de la Laguna de las Ilusiones.
- ✓ La actividad de fosfatasa alcalina y de gama glutamil transpeptidasa, no estuvo correlacionada con las concentraciones de Pb y Cd encontrados en sangre.
- ✓ Los organismos silvestres se encuentran expuestos de manera constante a contaminantes con efectos hepatotóxicos.
- ✓ Se recomienda la implementación de futuras investigaciones para determinar la presencia de otros compuestos en éste cuerpo de agua, así como la medición de otros parámetros bioquímicos, para hacer un diagnóstico más completo respecto al estado de salud en que se encuentran los organismos provenientes de la Laguna de las Ilusiones.
- ✓ Este estudio es el primero en mostrar actividad de ChEs, así como de transaminasas y su relación con metales pesados en *C. moreletii* en estado silvestre.

12. REFERENCIAS

- ✓ Aguirre-Álvarez, I.K. (2009). Estudio de genotoxicidad en una población de cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*) de la Laguna de las Ilusiones, mediante la técnica de Electroforesis Unicelular en Gel. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco.
- ✓ Álvarez del Toro, M., y Sigler, L. (2001). Los Crocodylia de México. 1º Edición. Instituto Mexicano de Recursos. Naturales Renovables (IMERNAR), PROFEPA. México. 134 pp.
- ✓ Arveláez, L. & Eblen-Zajjur, A. (2013). Inhibición de butirilcolinesterasa por exposición a malatión: efectos sobre nocicepción y motricidad en ratas. *Salus*. 17(2): 41-49.
- ✓ Attademo, M.A., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Bassó, A., Junges, C. & Cabagna-Zenklusen, M. (2012). Plasma B-esterase and Glutathione S-transferase Activities in the South American Reptiles *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae) and *Phrynops hilarii* (Testudines, Chelidae). *Water, air, soil Pollution: Springer*.
- ✓ Bain, M.B. & Stevenson, N.J. (1999). Aquatic habitat assessment: common methods. American Fisheries Society. 1ª Edición. Bethesda Maryland. 136 pp.
- ✓ Benoff, S., Centola, G.M., Millan, C., Napolitano, B., Marmar, J.L. & Hurley, I.R. (2002). Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF. *Human reproduction*. 18(2): 374-383.

- ✓ Bogan, J.E. & Mitchell, M.A. (2014). Characterizing Tissue Enzyme Activities in the American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*. 24(3-4): 77-81.
- ✓ Bogin, E., Otto, F., Ibañez, A., Lippi, E., Wittwer, F. & Uriarte, G. (1989). *Patología Clínica Veterinaria. Memoria del Seminario-Taller sobre Patología Clínica*. 192 pp.
- ✓ Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafanta, E., Pounds, J., Robson, M. (2003). Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 56: 20-31.
- ✓ Burley, R.W., Back, J.F., Wellington, J.E. & Grigg, G.C. (1988). Proteins and Lipoproteins in Yolk from Eggs of the Estuarine Crocodile (*Crocodylus porosus*); a Comparison with Egg Yolk of the Hen (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 91(1): 39-44.
- ✓ Carvalho-Correa, M., Maldonado, P., Saydelles da Rosa, C., Lunkes, G., Sausen-Lunkes, D., Rodrigues-Kaizer, R., Ahmed, M., Morsch, V.M., Pereira, M.E. & Schetinger, M.R. (2008) Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 62(5): 317-324.
- ✓ Casas-Andreu, G., Barrios-Quiroz, G. y Macip-Ríos, R. (2011). Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Rev. Mex. Biodiv.* 82: 261-273.
- ✓ Cobb, G.P., Wood, P.D. & O'Quinn, M. (1997). Polychlorinated biphenyls in eggs and chorioallantoic membranes of American alligators (*Alligator*

- mississippiensis*) from coastal South Carolina. Environmental Toxicology and Chemistry. 16(7): 1456-1462.
- ✓ Crain, D.A., Guillette., L.J., Rooney, A.A., Pickford, D.B. (1997). Alterations in Steroidogenesis in Alligators (*Alligator mississippiensis*) Exposed Naturally and Experimentally to Environmental Contaminants. Environmental Health Perspectives. 105 (5): 528-533.
 - ✓ Crain, D.A., Guillette, L.J., Pickford, D.B., Percival, H.F. & Woodward, A.R. (1998). Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. Environmental Toxicology and Chemistry. 17(3): 446-452.
 - ✓ Delany, M.F., Bell, J.U., & Sundlof, S.F. (1988). Concentrations of contaminants in muscle of the American Alligator in Florida. Journal of Wildlife Diseases. 24(1): 62-66.
 - ✓ Diamantino C.T., Guilhermino, L., Almeida, E. & Soares, A.M.V.M. (2000) Toxicity of Sodium Molybdate and Sodium Dichromate to *Daphnia magna* Straus Evaluated in Acute, Chronic, and Acetylcholinesterase Inhibition Tests. Ecotoxicology and Environmental Safety. 45(3): 253-259.
 - ✓ Díaz-Portillo, J., Fernández del Barrio, M.T. & Parede-Salido, F. (1997). Aspectos básicos de bioquímica clínica. 1ª Edición. Editorial Diaz de Santos. 297 pp
 - ✓ Dieter, M.P. & Ludke, J.L. (1975). Studies on Combined Effects of Organophosphates and Heavy Metals in Birds. I. Plasma and Brain Cholinesterase in Coturnix Quail Fed Methyl Mercury and Orally Dosed with

- Parathion. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 13(3): 257-262.
- ✓ Doadrio-Villarejo, A.L. (2006). Ecotoxicología y acción toxicológica del plomo. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 72: 409-422.
 - ✓ El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., El-Bahr, S.M. (2007). Acute intoxication of deltamethrin monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2: 212–217.
 - ✓ Fernández, M.S., Simoncini, M.S. & Dyke, G. (2013). Irregularly calcified eggs and eggshells of *Caiman latirostris* (Alligatoridae: Crocodylia). Naturwissenschaften. 100(5): 451-457.
 - ✓ Fyfe, W.S. (1998). Towards 2050: The past is not the key to the future- challenges for the science of geochemistry. Environmental Geology. 33:92-95.
 - ✓ Galvao, L.A.C. & Corey, G. (1987). Cadmio. En serie vigilancia 4. Centro panamericano de Ecología Humana y Salud, OMS. Metepec, México. 69 pp
 - ✓ García-Fernández, A.J. (1994). Impregnación por plomo y cadmio en aves silvestres de la Región de Murcia. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.
 - ✓ García-Fernández, A.J., Sánchez-García, J.A., Jiménez-Montalbán, P., Luna, A. (1995). Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain. Environmental Toxicology and Chemistry. 12: 2049-2058
 - ✓ García-Fernández, A.J. y María-Mojica, P. (2000). Contaminantes ambientales y su repercusión sobre la fauna Silvestre. En: Fernández, F.,

- Pablos, M.V., Tarazona, J.V. (Eds.). Globalización Medioambiental: Perspectivas Agrosanitarias y Urbanas. Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. pp 215-227.
- ✓ Gobierno del Edo. de Tabasco (2000). Áreas Naturales Protegidas del Edo. De Tabasco.
 - ✓ Gómez-Olivares, J. L. (2000). Propiedades estructurales de las colinesterasas de corazón, eritrocito e hígado de ratones normales y distróficos Lama2dy. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia, España
 - ✓ Goyer, R.A. (1996). Toxic effects of metals. En: Klaasen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. (Eds.). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Edition 5th. McGraw-Hill. pp 691-736.
 - ✓ Granada-Grisales, N. & Escobar-López, D.F. (2012). Análisis y cuantificación de metales pesados (Pb, Cd, Ni y Hg) en agua, sedimentos y bioacumulación en la especie *Rhandia wagne* (barbudo) del río cauca en el municipio de la Virginia. Tesis Licenciatura. Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.
 - ✓ Groombridge, B. (1987). The distribution and status of world crocodilians. En: Webb, G.J., Manolis, S.C., Whitehead, P.J. (Eds.). Wildlife Management: Crocodiles and Alligators. Surrey Beatty and Sons Pty. Sydney, Australia: 9-21.
 - ✓ Guillette, L.J. (1995). Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 1(2): 25-36.

- ✓ Guillette, L.J. & Guillette, E.A. (1996). Environmental Contaminants and Reproductive Abnormalities in Wildlife: Implications for Public Health? *Toxicology and Industrial Health*. 12:537-550.
- ✓ Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health. Persp.* 102: 680–688.
- ✓ Guillette, L.J., Gross, T.S., Gross, D.A., Rooney, A.A. and Percival, F. (1995). Gonadal Steroidogenesis *in Vitro* from Juvenile Alligators Obtained from Contaminated or Control Lakes. *Environmental Health Perspectives*. 103(4): 31-36. Guillette, L.J., Pickford, D.B., Crain, D.A., Rooney, A.A. and Percival, H.F. (1996). Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. *General and Comparative Endocrinology*. 101: 32-42.
- ✓ Guillette, L.J., Woodward, A.R., Crain, D.A., Pickford, D.B., Rooney, A.A. and Percival, H.F. (1999). Plasma Steroid Concentrations in Male Phallus Size in Juvenile Alligators from Seven Florida Lakes. *General and Comparative Endocrinology*. 116: 356-372.
- ✓ Gunnar, F.F., Nogawa, K., Nordberg, M. & Friberg, L.T (2007). Cadmium. *En Handbook on the toxicology of metals de Gunnar, F.F., Nogawa, K., Nordberg, M. & Friberg, L.. 3ª Edición. Academic Press Inc. Amsterdam, NL. 445-486 pp.*

- ✓ Habig, C. & Di Giulio, R.T. (1991). Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. En: P., I.M. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Elsevier, Amsterdam. 19-33.
- ✓ Halim, A.B, El-Ahmady, O., Hassab-Allah, S., Abdel-Galil, F, Hafez, Y. & Darwish, A. (1997). Biochemical effect of antioxidant on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. Annals of Clinical Biochemistry. 34: 656-663.
- ✓ Hall, R.J., Kaiser, T.E., Robertson, W.B. Jr., and Patty, P.C. (1979). Organochlorine Residues in Eggs of the Endangered American Crocodile (*Crocodylus acutus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 23: 087-090.
- ✓ Heinz, G.H., Percival, H.F. & Jennings, M.L. (1991). Contaminants in American Alligator eggs for Lake Apopka, Lake Griffin, and Lake Okeechobee, Florida. Environmental Monitoring and Assessment. 16: 277-285.
- ✓ Honeyfield, D.C. et al., (2008). Pathology, physiologic parameters, tissue contaminants and tissue thiamine in morbid and healthy central florida adult american alligators (*Alligator mississippiensis*). Journal of Wildlife Diseases. 44(2):280-294.
- ✓ Hopkins, W.A., DuRant, W.E., Staub, B.P., Rowe, C.L. & Jackson, B.P. (2006). Reproduction, embryonic development and maternal transfer of contaminants in the amphibian *Gastrophryne carolinensis*. Environmental Health Perspectives. 114: 661-666.

- ✓ Huang, T. L., Obih P. O., Jaiswal R., Hartley W. R. & Thiyagarajah A. (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 58: 688-695.
- ✓ Hyder, M.A., Hasan, M. & Mohieldein, A.H. (2013). Comparative Levels of AST, ALT, ALP and GGT in Liver associated Diseases. *European Journal of Experimental Biology*. 3(2): 280-284.
- ✓ Instituto Nacional de Ecología (1999). Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Crocodylia de México (COMACROM). México. 107p.
- ✓ Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2000. Cuaderno Estadístico del Municipio del Centro. INEGI. 105 pp.
- ✓ Jett, D.A., Navoa, R.V. & Lyons Jr., M.A. (1999). Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity *in vitro*. *Toxicology letters*. 105(3):223-229.
- ✓ Lance, V.A., Horn, T.R., Elsey, R.M. & Peyster, A. (2006). Chronic incidental lead ingestion in a group of captive-reared alligators (*Alligator mississippiensis*): Possible contribution to reproductive failure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*. 142(1-2): 30-35.
- ✓ Lehninger, A.L. & Cox, M.M. (2006). Principios de bioquímica. 4a Edición Editorial Omega. 1232 pp
- ✓ Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Örberg, J. & Guillette, L.J. (2004). Abnormal Bone Composition in Female Juvenile American

- Alligators from a Pesticide-Polluted Lake (Lake Apopka, Florida).
Environmental Health Perspectives. 112(3):359-362.
- ✓ Livingstone, D.R. (1993). Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 57: 195-211.
 - ✓ Lopez-Barea, J. (1995). Biomarkers in ecotoxicology: an overview. Archives of Toxicology Supplement. 17: 57- 79.
 - ✓ López-Hernández, J., López-Duran, R., Trujillo-Vázquez, S.K., Salame-Méndez, A., García-Suárez, D., Serrano, H., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Salinas-Arreortua, N. & Gómez-Olivares, J.L. (2015). La exposición a bajas dosis de plomo en ratones CD-1 altera las actividades de las colinesterasas en órganos reproductores. Ciencia en la Frontera. 12: 69-82.
 - ✓ López-Luna, M.A. (2010). Ecología termal de la anidación del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*) en la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco. Tesis de Maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco.
 - ✓ Lumeij, J.T. (1985). Clinicopathologic aspects of lead poisoning in birds: a review. Vet. Quarter. 7: 133-138.
 - ✓ Maduabuchi, J. M. U., Nzegwu, C. N., Adigba, E. O., Aloke, R. U., Zomike, C. N., Okocha, C. E., et al. (2006). Pb and cadmium exposures from canned and non-canned beverages in Nigeria: a public health concern. *Sci. Total Environ.* 366(2-3): 621-626.

- ✓ Manolis, S.C., Webb, G.J. and Britton, A.R. (2002). Crocodilians and other Reptiles: Bioindicators of Pollution. *Wildlife Management International*. 65-69.
- ✓ Méndez, H. (2000). Reporte de la Laguna de las Ilusiones. Secretaría de Desarrollo y Protección al Ambiente. Programa de Rescate Ecológico de la Laguna de las Ilusiones. 66 pp.
- ✓ Milnes, M.R., Allen, D., Bryan, T.A., Sedacca, C.D., and Guillete, L.J. Jr. (2004). Developmental effects of embryonic exposure to toxaphene in the american alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 138: 81-87.
- ✓ Núñez-Chaves, R.A. (2007). Técnicas *in vitro* para biorremediación de cromo y plomo. Tesis para Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica.
- ✓ Oliveira, H.P., Liebel, S., Rossi, S.C., Azevedo, A.C.B., Barrera, E.A.L., EsquivelGarcía, J.R., Grötzner, S.R., Neto, F.F., Randi, M.A.F. & Ribeiro C.A.O. (2015). Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamndia quelen* than isolated exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122:106-115.
- ✓ Peakall, D. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*. 1: 55-60
- ✓ Pepper, C.B., Rainwater, T.R., Platt, S.G., Dever, J.A., Anderson, T.A. and McMurry S.T. (2004). Organochlorine pesticides in chorioallantoic membranes of morelet's crocodile eggs from Belize. *J. Wildlife Dis.* 40 (3): 493-500.

- ✓ Picco, E.J. (2009). Influencia de los estados fisiológicos en la disposición cinética de clorpirifos en bovinos. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- ✓ Platt, S.G. & Thorbjarnarson, J.B. (2013). Nesting Ecology of the American Crocodile in the Coastal Zone of Belize. *Copeia*. 3:869-873.
- Rainwater, T.R., Adair, B.M., Platt, S.G., Anderson, T.A., Cobb, G.P., and McMurry S.T. (2002). Mercury in Morelet's Crocodile Eggs from Northern Belize. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 42: 319-324.
- ✓ Rainwater, T.R., Wu, T.H., Finger, A.G., Cañas, J.E., Yu, L., Reynolds, K.D., Coimbatore, G., Barr, B., Platt, S.G., Cobb, G.P., Anderson, T.A. & McMurry, S.T. (2007). Metals and organochlorine pesticides in caudal scutes of crocodiles from Belize and Costa Rica. *Science of the Total Environment*. 373:146-156.
- ✓ Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio: Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina-Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 63(1): 51-64.
- ✓ Rentschlet, G., Kippler, M., Axmon, A., Ragib, R., Skerfving, S., Vahter, M. & Broberg, K. (2014). Cadmium concentrations in human blood and urine are associated with polymorphisms in zinc transporter genes. *Metallomics*. 6(4): 885-891.
- ✓ Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R. & Bonan, C.D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant

- capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*. 32:116-122.
- ✓ Rodríguez-Mellado, J.M. & Marín-Galvín, R. (1999). *Fisicoquímica de aguas*. Editorial Díaz de Santos. 2ª Edición. Madrid, España. 467 pp.
 - ✓ Roex, E.W.M., Keijzers, R. & van Gestel, C.A.M. (2003) Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*. 64(4): 451-460.
 - ✓ Rueda, J., Camacho, A., Mezquita, F., Hernández, R. & Roca, J.R. (2002). Effect of episodic and regular sewage discharges on the water chemistry and macroinvertebrate fauna of a Mediterranean stream. *Water, Air and Soil Pollution*. 140: 425-444.
 - ✓ Schardt, H. (2008). Why is this Crocodile Smiling? After being hunted to the edge of extinction, the American crocodile's US population has rebounded to its highest level in more than a century. *National Wildlife*. 46(6): 31.
 - ✓ Schlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*. 99(1-12): 48-53.
 - ✓ Schneider, L., Maher, W., Green, A. & Vogt, R.C. (2013) Mercury contamination in reptiles: An emerging problem with consequences for wildlife and human health. *Nova Science*. 1: 173-215.
 - ✓ Scheuhammer, A.M. (1987). The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: a review. *Environ. Poll.* 46:263-295.
 - ✓ Semenza, J.C., Tolbert, P.E., Rubin, C.H., Guillete, L.J. and Jackson, R.J. (1997). Reproductive Toxins an Alligator Abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environmental Health Perspectives*. 105 (10): 1030-1032.

- ✓ Sheehan, D. & Power, A. (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 123: 193-199.
- ✓ Schoeb, T.R. *et al.* (2002). Clinical and Necropsy findings associated with increased mortality among american alligators of lake griffin, Florida. *Journal of Wildlife Diseases*. 38(2): 320-337.
- ✓ Stendell, R.C. (1980). Dietary exposure of kestrels to lead. *J. Wildlife Manag.* 44: 527-530.
- ✓ Swanepoel, S., Boomker, J. & Kriek, N.P.J. (2000). Selected chemical parameters in the blood and metals in the organs of the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*, in the Kruger National Park. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 67: 141-148.
- ✓ Tellez, M. & Merchant, M. (2015). Biomonitoring Heavy Metal Pollution Using an Aquatic Apex Predator, the American Alligator, and Its Parasites. *PLoS ONE*. 10(11): 1-18.
- ✓ Thorbjarnarson, J.B. (1992). Crocodiles: An action plan for their conservation. En: Messel, H., King, F.W., Ross, J.P. (Eds.). *Species Survival Commission (SSC), International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), Gland, Switzerland*. 136 pp.
- ✓ Trujillo-Vázquez, S.K. (2011). Evaluación de la viabilidad en huevos de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en la Laguna de las Ilusiones, Tabasco. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco.

- ✓ Vonier, P.M, Crain, D.A., McLachlan, J.A., Guillete, L.J. and Arnold, S.F. (1996). Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the Oviduct of the American Alligator. *Environmental Health Perspectives*. 104: 1318-1322.
- ✓ Xu, Q., Fang, S., Wang, Z. & Wang, Z. (2006). Heavy Metal Distribution in Tissues and Eggs of Chinese Alligator (*Alligator sinensis*). *Environmental Contamination and Toxicology*. 50(4):580-586.
- ✓ Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B. (1997). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis Group. 4a Edición. Londres. 352 pp.
- ✓ Walkley, A. & Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37:29- 38.
- ✓ Xu,Q., Fang, S., Wang, Z. & Wang, Z. (2005). Heavy Metal Distribution in Tissues and Eggs of Chinese Alligator (*Alligator sinensis*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50(4): 580-586.
- ✓ Zawia, N.H., Crumpton, T., Brydie, M., Reddy, G.R. & Razmiafshari, M. (2000). Disruption of the zinc finger domain: A common target that underlies many of the effects of lead. *Neurotoxicology*. 21: 1069-1080.